

NOTA

Il presente fascicolo relativo alla relazione di perizia tecnico-biologica in merito al Procedimento Penale nr. 11/13 RG Assise Appello della Corte di Assise di Appello di Firenze nei confronti di Amanda Knox + 1, si compone, con l'esclusione delle copertine e dei fogli bianchi di separazione, di nr. 242 pagine così ripartite:

- *Nr. 91 pagine (compresa la presente) di relazione tecnico-biologica e di fascicolo fotografico del campione (traccia) I, oggetto di indagine peritale;*
- *Nr. 85 pagine di dati analitici*
- *nr. 66 pagine di atti.*

ACCERTAMENTI TECNICO-BIOLOGICI DI LABORATORIO

INDICE DELLE ATTIVITÀ PERITALI SVOLTE



1. INCARICO E CRONOLOGIA DELLE ATTIVITÀ PERITALI SVOLTE	1
2. MATERIALE BIOLOGICO OGGETTO DELL'ANALISI PERITALE	12
2.1 DESCRIZIONE DEL campione (TRACCIA) I	12
2.2 STATO E MODALITÀ DI CONSERVAZIONE	15
3. ANALISI DEL DNA NUCLEARE PER FINI DI IDENTIFICAZIONE PERSONALE.....	17
3.1 PREMESSA	17
3.2 MISURA DEL VOLUME DI ESTRATTO DI DNA DELLA TRACCIA I.....	22
3.3 QUANTIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO UMANO AMPLIFICABILE	22
3.3.1 Descrizione della metodica.....	22
3.3.2 Risultati della reazione di quantificazione del DNA umano	24
3.4 ANALISI DI TIPIZZAZIONE GENETICA DEI POLIMORFISMI STRs DEL DNA NUCLEARE E CRITERI INTERPRETATIVI DEI RISULTATI.....	28
3.4.1 Descrizione delle metodiche	28
3.4.2 Interpretazione dei profili genetici e comparazione con i profili genetici di confronto	40
3.4.3 Risultati delle analisi di tipizzazione genetica.....	48
3.4.4 Comparazioni con i profili genetici di confronto e valutazioni biostatistiche	55
3.5 SINTESI DEI RISULTATI DELLE ANALISI DI QUANTIFICAZIONE E TIPIZZAZIONE DEI POLIMORFISMI STRs DEL DNA NUCLEARE	75
4. CONSIDERAZIONI E DISCUSSIONI SUGLI ESITI DELLE ATTIVITÀ PERITALI	77
4.1 STATO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE (TRACCIA) I	77
4.2 ANALISI DI TIPIZZAZIONE GENETICA DELLA TRACCIA I.....	77
4.2.1 Discussioni sugli esiti analitici	77
4.2.2 Discussioni sugli esiti delle comparazioni con i soggetti di confronto	78
5. RISPOSTA AL QUESITO POSTO DALL'ILL.MO PRESIDENTE DELLA CORTE DI ASSISE DI APPELLO DI FIRENZE.....	84
6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	86

1. INCARICO E CRONOLOGIA DELLE ATTIVITÀ PERITALI SVOLTE

In data 4 ottobre dell'anno 2013 alle ore 09:00 presso la Seconda Sezione della Corte di Assise di Appello di Firenze, l'Ill.mo Presidente Dott. Alessandro Nencini, conferiva incarico ai sottoscritti Magg. inv. sc. Dott. Andrea Berti e Cap. CC inv. sc. Dott. Filippo Barni, in servizio presso il Reparto Carabinieri Investigazioni Scientifiche di Roma, di espletare una perizia in riferimento al Procedimento Penale nr. 11/13 RG Assise Appello nei confronti di Knox +1.

L'oggetto del quesito, così come formulato nel corpo del verbale di conferimento dell'incarico, recitava quanto segue:

“Esaminati gli atti di causa e segnatamente le risultanze della relazione di perizia depositata in grado di appello in data 29 giugno 2011 dai Periti di ufficio Prof.ssa Carla Vecchiotti e Prof. Stefano Conti, unitamente ai rilievi formulati dai consulenti delle parti Dott.ssa Patrizia Stefanoni e Prof. Giuseppe Novelli nei loro elaborati depositati alla udienza del 6 settembre 2011, e provveduto alla analisi del campione già precedentemente lavorato, dicano i Periti circa la attribuzione della traccia contrassegnata in atti con la lettera (I) rilevata sul reperto nr. 36 e se nella stessa sia identificabile DNA riferibile alla vittima Meredith Kercher ovvero al condannato Rudi Herman Guede.

In caso di impossibilità di esecuzione dell'esame del campione per mancanza, cattiva conservazione ovvero per qualsiasi altra causa, i Periti daranno immediata comunicazione alla Corte anche a mezzo telefax”.

Successivamente, in data 25.10.2013, il Presidente della Corte di Assise di Appello di Firenze, Dott. Alessandro Nencini, autorizzava i periti (lettera di autorizzazione allegata agli atti della presente perizia), ad effettuare una comparazione del profilo genetico della traccia I anche con i profili genetici di Raffaele Sollecito (RS) e di Amanda Marie Knox (AMK), richiesta questa inizialmente non inclusa nel quesito dell'incarico peritale.

Il termine per il deposito della relazione tecnica veniva fissato entro il 31.10.2013. L'inizio delle operazioni veniva fissato per il giorno 10.10.2013 alle ore 14:00 presso i Laboratori del RIS di Roma. Il Presidente autorizzava i Periti a:

- Utilizzare, ove necessario, il mezzo proprio;

- acquisire, qualora non reperibile dagli atti, il DNA di Rudy Hermann Guede;
- prendere contatti con il perito della Corte di Assise di Appello di Perugia, Prof.ssa Carla Vecchiotti, per il recupero del campione I.

Le operazioni peritali avevano inizio il giorno 10.10.2013, alle ore 14:00 presso la Sezione di Biologia del RIS di Roma alla presenza dei Consulenti Tecnici di Parte in particolare:

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

Dott.ssa Sarah Gino, consulente tecnico per Amanda Marie Knox.

Dott. Walter Patumi, consulente tecnico per Amanda Marie Knox.

Dott.ssa Monica Omedei, ausiliario tecnico nominato dalla Dott.ssa Gino.

Dott.ssa Ilenia Pietrangeli, ausiliario tecnico nominato dal Prof. Giuseppe Novelli.

Le operazioni sono proseguite presso il Laboratorio di Genetica Forense del Dipartimento di Medicina Legale e delle Assicurazioni dell'Università di Roma La Sapienza alla presenza dei periti nominati dalla Corte di Assise di Appello di Perugia, Prof.ssa Carla Vecchiotti e Prof. Stefano Conti. In tale circostanza erano presenti anche il Prof. Adriano Tagliabracci ed il Dott. Valerio Onofri, CCTTPP per Raffele Sollecito.

Le operazioni effettuate, meglio descritte nel verbale allegato, permettevano di:

1. identificare il frigo-congelatore dove era conservato il campione I (Figura 1);
2. verificare le condizioni di conservazione del campione attraverso la misurazione con sonda certificata della temperatura interna del cassetto dove era riposta la scatola contenete il campione I; dopo circa 10 minuti di attesa la temperatura interna risultava di -20.2°C (Figura 2);
3. verificare la presenza del campione I contenuto all'interno di una scatola di cartone riposta in un frigo-congelatore ubicato nel Laboratorio della Prof.ssa Vecchiotti (Figure 3-8).
4. verificare, visivamente, la presenza di un volume di liquido trasparente contenuto all'interno della provetta recante la dicitura "I" (Figura 9).



Figura 1. Frigo-congelatore marca Siemens dove risultava conservato il campione I.



Figura 2. Misurazione della temperatura del frigo-congelatore attraverso sonda certificata Testo 735-2.



Figura 3. Scatola di cartone presente all'interno del congelatore.

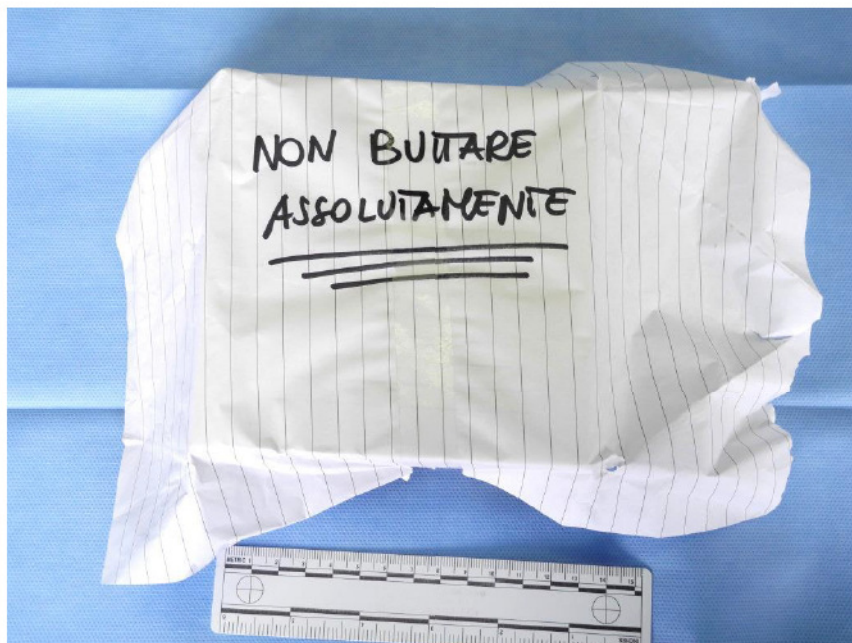


Figura 4. Scatola di cartone presente all'interno del congelatore.

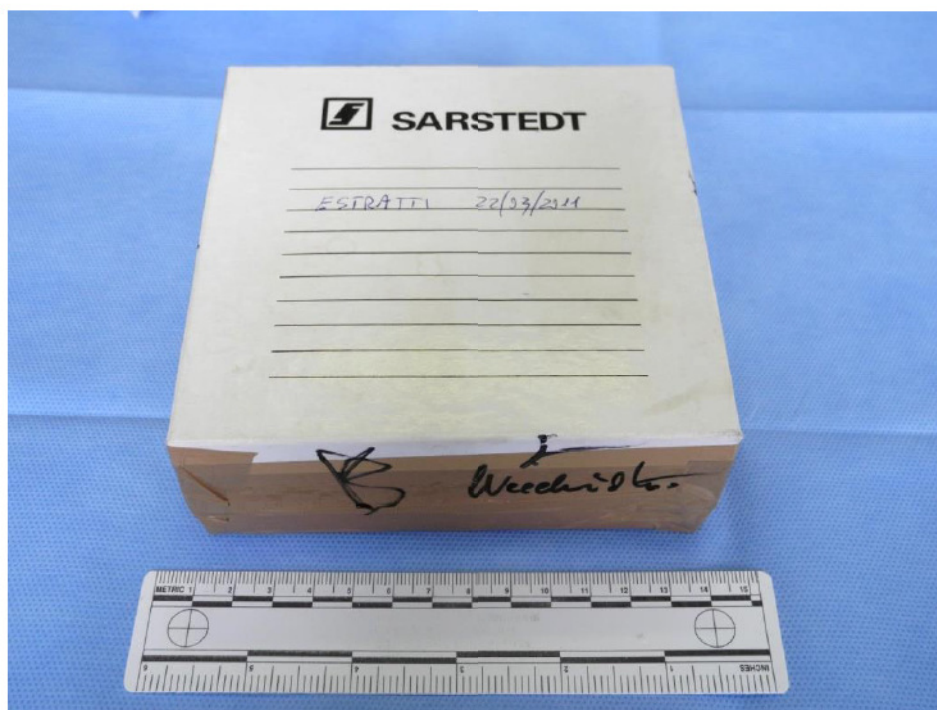


Figura 5. Scatola di cartone presente all'interno del congelatore.

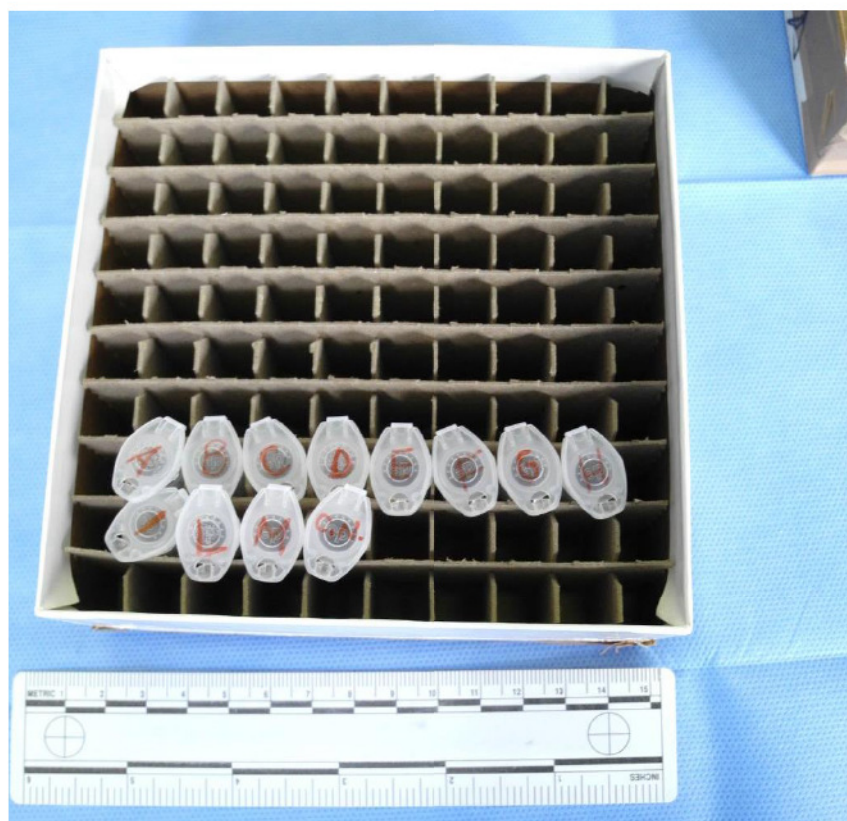


Figura 6. Provette contenute all'interno della scatola di cartone.

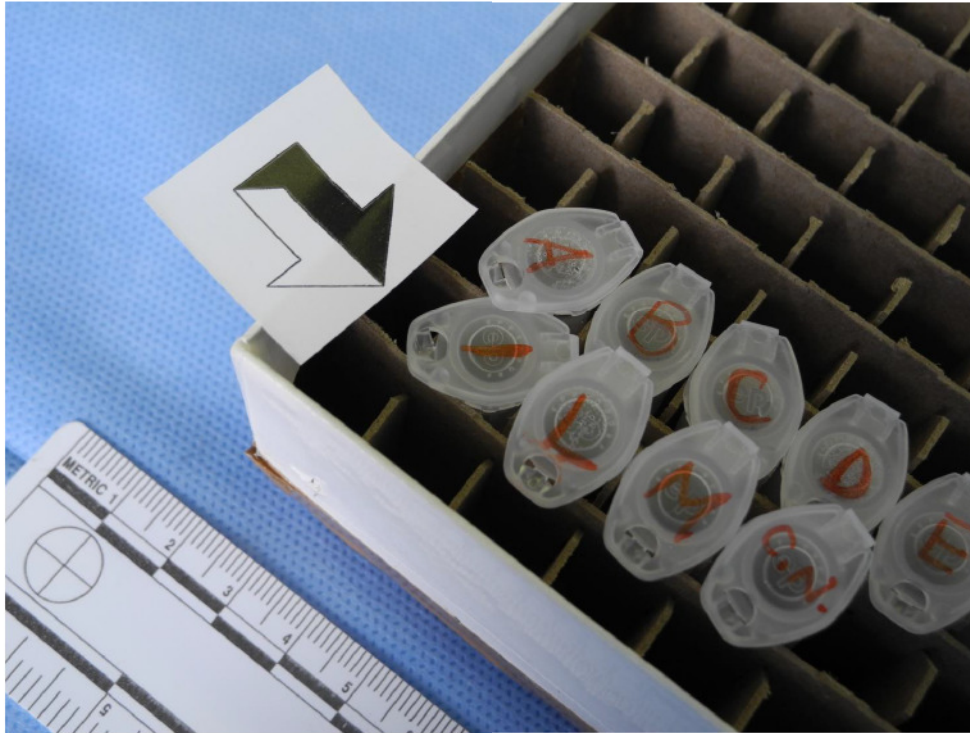


Figura 7. Provette contenute all'interno della scatola di cartone; la freccia indica il campione I.

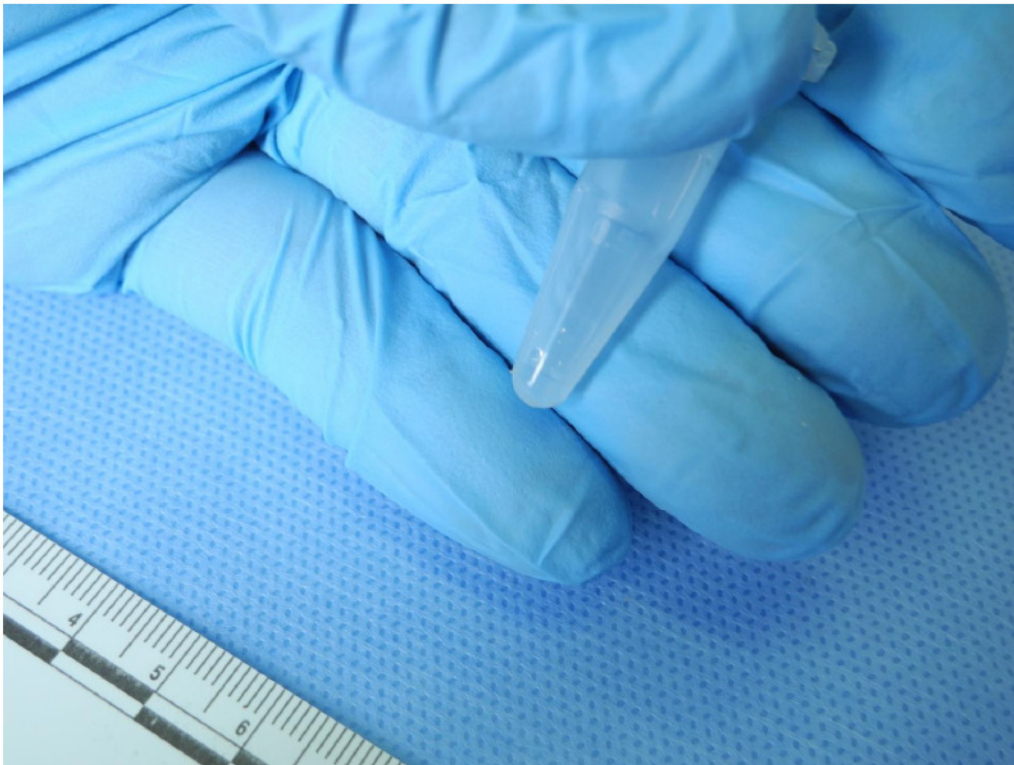


Figura 8. particolare del liquido contenuto all'interno della provetta siglata "I".

Il campione I veniva quindi avvolto in parafilm (una pellicola per lo specifico uso da laboratorio costituita da poliolefine e cera paraffinica), inserito all'interno di una provetta Falcon da 50 ml, riposto in apposito contenitore refrigerato su cui venivano apposti due sigilli di sicurezza (Figure 9 e 10) e veniva quindi trasportato presso i Laboratori del RIS di Roma.



Figura 9. Il campione I viene inserito all'interno del contenitore refrigerato per il trasporto presso i laboratori della Sezione di Biologia del RIS di Roma.



Figura 10. Il contenitore refrigerato viene sigillato per il trasporto presso i laboratori della Sezione di Biologia del RIS di Roma.

Alle ore 17.15 del 10 ottobre 2013 presso i Laboratori del RIS di Roma alla presenza dei CCTTPP:

- Prof. Giuseppe Novelli, consulente tecnico per la Procura Generale;
- Prof.ssa Francesca Torricelli, consulente tecnico per la parte civile;
- Dott. Valerio Onofri, consulente tecnico per Raffaele Sollecito;
- Dott.ssa Sarah Gino, consulente tecnico per Amanda M. Knox.
- Dott. Walter Patumi, consulente tecnico per Amanda M. Knox.
- Dott.ssa Monica Omedei, ausiliario tecnico nominato dalla Dott.ssa Gino.
- Dott.ssa Ilenia Pietrangeli ausiliario tecnico nominato dal Prof. Novelli.

Si procedeva alla verifica dell'integrità dei sigilli apposti sul contenitore ove era riposto il campione I ed alla misurazione della temperatura interna dello stesso che risultava essere, alle 17:29, di 1.8 °C.

Si procedeva successivamente alla misurazione del volume contenuto all'interno della provetta classificata "I" mediante pipetta certificata. Il volume misurato complessivo risultava di 16-17 µl circa.

Le operazioni quindi proseguivano attraverso il set up della reazione di quantificazione sotto cappa a flusso laminare utilizzando il sistema Investigator® Quantiplex HYres Kit (Qiagen, Hilden, Germany) Lot. nr. 145032875, aperto al momento.

La reazione di quantificazione aveva inizio alle ore 17:57 e terminava alle ore 18:50 circa su real-time PCR Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen, Hilden, Germany).

I risultati venivano mostrati ai consulenti presenti.

Veniva successivamente allestita la prima reazione di amplificazione della PCR con il kit AmpF&STR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) Lot. Nr. 1301027, inserendo i previsti controlli positivi e negativi. La reazione veniva avviata alle ore 19.55 circa su amplificatore Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La reazione veniva lasciata fino al termine dei cicli previsti per poi mantenere i campioni a 4°C per tutta la notte fino al prosieguo delle operazioni del giorno dopo. Il locale dove è installato lo strumento Veriti® Thermal Cycler veniva chiuso a chiave e sigillato mediante apposizione di sigillo di sicurezza nr. 0017024 per mantenere l'integrità del locale fino alla giornata successiva.

Il campione I residuo veniva posto, di comune accordo con le parti, in frigo a 4°C in attesa delle operazioni del giorno successivo.

Il giorno 11 ottobre 2013 alle ore 9:00 proseguivano le operazioni peritali alla presenza dei CCTTPP:

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

Dott. Valerio Onofri, consulente tecnico per Raffaele Sollecito;

Dott.ssa Sarah Gino, consulente tecnico per Amanda M. Knox;

Dott.ssa Monica Omedei ausiliario tecnico nominato dalla Dott.ssa Gino;

Dott.ssa Ilenia Pietrangeli ausiliario tecnico del Prof. Novelli.

Le operazioni avevano inizio alle ore 09:15 dell'11 ottobre 2013 circa con la verifica, alla presenza delle parti, dell'integrità dei sigilli apposti sulla porta di accesso alla stanza di amplificazione dove era avvenuta la prima reazione di amplificazione il giorno precedente.

Si procedeva quindi al set up della corsa elettroforetica nel locale adibito alla tipizzazione secondo protocollo. I campioni venivano inseriti all'interno dell'analizzatore genetico Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e l'analisi veniva avviata alle ore 9:50.

La corsa elettroforetica aveva termine alle ore 10:40 circa.

I file prodotti venivano analizzati con il software GeneMapper® ID-X Software v. 1.4 (Life

Technologies, Carlsbad, CA, USA), e stampati.

I risultati venivano mostrati ai consulenti presenti.

Veniva successivamente allestita la seconda reazione di amplificazione della PCR con il kit AmpF ℓ STR $^{\circ}$ NGM SElect $^{\text{TM}}$ PCR Amplification Kit Lot. Nr. 1301027, aperto il giorno precedente, inserendo i previsti controlli positivi e negativi. La reazione veniva avviata alle ore 11:10 circa su amplificatore Veriti $^{\circ}$ Thermal Cycler. Il locale dove è collocato lo strumento Veriti $^{\circ}$ Thermal Cycler veniva chiuso a chiave e sigillato mediante apposizione di sigillo di sicurezza nr. 0017025 per mantenere l'integrità del locale fino al termine della reazione di amplificazione. La reazione terminava alle ore 13:45 circa.

Alle ore 12:30 circa giungeva presso i Laboratori del RIS di Roma il Prof. Novelli.

Verificata l'integrità dei sigilli apposti nell'area di amplificazione si procedeva quindi al set up della corsa elettroforetica del secondo amplificato nel locale adibito alla tipizzazione. I campioni venivano inseriti all'interno dell'analizzatore genetico Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer e veniva avviata l'analisi alle ore 14:10 circa.

La corsa elettroforetica aveva termine alle ore 15:00 circa

I file prodotti venivano analizzati con il software GeneMapper $^{\circ}$ ID-X Software v. 1.4, e stampati.

I risultati venivano mostrati ai consulenti presenti.

Le operazioni avevano termine alle ore 15:30 dell'11 ottobre 2013.

Il giorno 30 ottobre 2013, come autorizzato dal Presidente Dott. Nencini su richiesta degli Avv. Bongiorno e Maori, veniva convocata presso la sede del RIS una riunione per effettuare le comparazioni con i soggetti imputati (verbale in atti).

I verbali di conferimento dell'incarico peritale, dell'inizio delle operazioni peritali e tutte le comunicazioni intercorse durante il periodo di espletamento delle attività peritali tra i Periti e la cancelleria della Corte di Assise di Appello di Firenze vengono allegati alla presente relazione di perizia tecnico-biologica.

2. MATERIALE BIOLOGICO OGGETTO DELL'ANALISI PERITALE

2.1 DESCRIZIONE DEL campione (TRACCIA) I

Il campione I, oggetto di incarico peritale, denominato nella presente relazione peritale anche come **traccia I** (trattandosi di un estratto di DNA comunque derivante da reperto forense), risultava, dagli atti a disposizione, essere costituito da un “estratto di DNA” derivante dal campionamento I effettuato sul coltello classificato come Reperto nr. 36. In particolare, a pag. 6 della perizia Vecchiotti-Conti si indicavano due campionature I ed H “*effettuate nel punto di contatto tra la lama e l’impugnatura sui versanti opposti del coltello*”.



Foto 11. Immagine tratta dalla perizia Vecchiotti-Conti relativa alla zona di prelievo della traccia I sul reperto nr. 36.

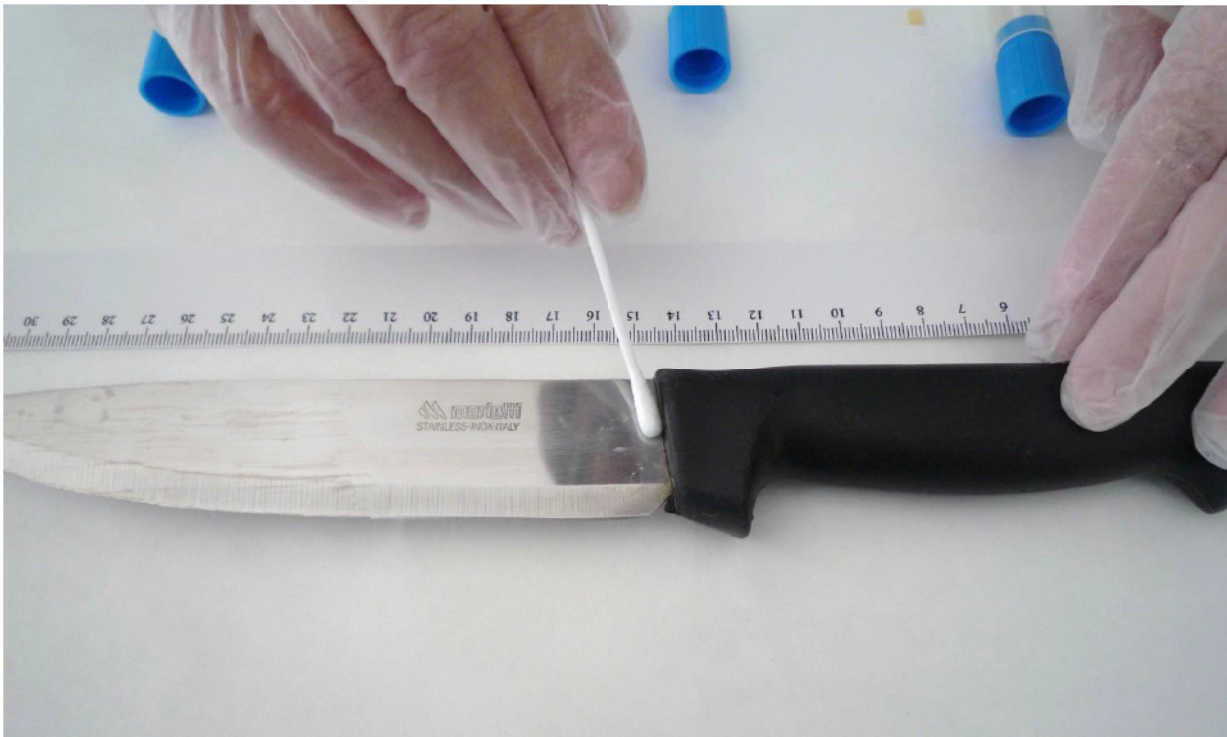


Foto 12. Immagine tratta dalla perizia Vecchiotti-Conti relativa alla zona di prelievo della traccia I sul reperto nr. 36.

La Prof.ssa Vecchiotti riportava di aver eseguito una estrazione del DNA come descritto a pag.11 della sua relazione:

“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)”.

A pag. 12 veniva riportato il volume di eluizione del campione I : *“aggiunta di 30 µL di Elution Buffer ed incubazione a 65°C per 5”*.

Successivamente il campione I veniva quantificato mediante Real Time PCR: *“Per l’analisi dei campioni di DNA è stato utilizzato il prodotto “Quantifiler Duo Quantification Kit”, (prodotto numero 4387746, lotto numero 1101024), acquistato dalla ditta Applied Biosystems (Foster City, USA). “*

A pag. 15 della perizia Vecchiotti-Conti si riporta che *“Le quantità necessarie di componenti sono state preparate in appositi tubi di polipropilene sterili e 23 µl 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 µl di DNA standard, 2 µl di DNA da analizzare e 2 µl di controllo (NTC) sono stati aggiunti ad ogni pozzetto per ottenere un volume finale di reazione di 25 µl/campione."

Quindi in totale il campione I residuo sarebbe dovuto essere teoricamente di **24 µl** considerando che il volume di eluizione indicato era di 30 µl e sono stati successivamente impiegati 6 µl per la quantificazione in triplicato del campione (2 µl per ogni replica).

Le operazioni peritali poste in essere nella giornata del 10 ottobre 2013 presso i Laboratori della Prof.ssa Vecchiotti hanno in effetti permesso di rinvenire all'interno di una scatola di cartone riposta in un frigo-congelatore una provetta etichettata con la lettera "I" al cui interno vi era del liquido trasparente. Il volume di tale liquido è stato successivamente determinato mediante centrifugazione dell'estratto e misurazione con pipetta certificata giungendo ad una stima di circa **16-17 µl** quale volume totale presente all'interno della provetta "I". Tale discrepanza può essere imputabile a diversi fattori con probabilità decrescente a giudizio dei periti:

1. il volume di eluizione teorico (30 µl) dopo estrazione del DNA (qualunque sia la tecnica usata) non è spesso quello reale e potrebbe invece essere stato già, al momento della quantificazione, inferiore ai 30 µl;
2. il campione potrebbe essere in parte evaporato durante la conservazione in frigocongelatore in quanto la provetta non era stata avvolta anche con pellicola parafilm;
3. premesso che le pipette da laboratorio sono comunque sempre associate ad una incertezza "fisiologica" di misura, quelle utilizzate durante le analisi di quantificazione svolte dai Proff. Vecchiotti e Conti, potevano non essere perfettamente tarate e, pertanto, essere associate ad un errore di prelievo diverso (superiore) dal previsto.

In ogni caso, pur ritenendo la prima ipotesi quella più probabile, i periti hanno potuto solo prendere atto che nella provetta siglata campione I vi era del liquido residuo con un volume di circa 16-17 µl.

2.2 STATO E MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Le operazioni peritali poste in essere nella giornata del 10 ottobre 2013 presso i Laboratori della Prof.ssa Vecchiotti hanno avuto anche lo scopo di raccogliere elementi sullo stato di conservazione del campione I al fine di rispondere al quesito posto dalla Corte di Assise di Appello di Firenze.

Al momento delle operazioni peritali, il campione I risultava essere conservato in un frigocongelatore presente, a vista, all'interno del Laboratorio di Genetica Forense.

Il frigo congelatore, marca Siemens, appariva in buone condizioni generali d'uso, relativamente recente come modello e collocato in modo da assicurare una corretta ventilazione del motore refrigerante. Si notava l'assenza di un sistema di registrazione delle temperature in tempo reale (Datalogger), confermato poi dalla Prof. Vecchiotti, come da verbale in atti. Ciò nonostante si procedeva alla misurazione con termometro Testo 735-2 certificato (Testo SpA, Settimo Milanese, MI, Italy) della temperatura all'interno del primo cassetto del congelatore ove era conservato il campione I. Tale operazione portava a misurare il valore di circa -20°C. Siffatto valore risulta conforme alle più recenti prescrizioni indicate nelle linee guida internazionali in merito alla conservazione dei reperti e campioni biologici. In particolare la pubblicazione del NIST a cura del Technical Working Group on Biological Evidence Preservation (April 2013) dal titolo "The Biological Evidence Preservation Handbook: Best Practices for Evidence Handlers" indica, a pag. 19, quale miglior metodo di conservazione per l'estratto di DNA, il congelamento (Figura 16). Congelamento che viene definito a pagina 17 della stessa pubblicazione come lo stato di un campione ad una temperatura al di sotto dei -10°C.

Ciò posto, alla luce delle osservazioni sopra riportate si ritiene che le condizioni di conservazione del campione I, nonostante non si abbia diretta evidenza di quanto sia avvenuto nel periodo antecedente alle operazioni peritali, siano da considerare ragionevolmente idonee a quanto previsto per questa tipologia di campioni.

Lo stato fisico del campione I come "estratto di DNA" e quindi prodotto ultimo di un processo di lisi e purificazione da altre componenti cellulari ed in particolare proteiche impedisce la possibilità di qualsiasi valutazione circa la natura biologica della traccia I.

I test utilizzati in ambito forense per la diagnosi della natura biologica di una traccia (cioè per comprendere di quale materiale biologico si tratti) utilizzano infatti principalmente sistemi immunocromatografici con anticorpi monoclonali che riconoscono epitopi di antigeni proteici

specifici per i singoli fluidi biologici. Il processo di estrazione del DNA di fatto ha esattamente lo scopo di separare la componente proteica dalla componente genetica rendendo disponibile solo quest'ultima a meno di protocolli specifici. Nel caso in parola la procedura di estrazione del campione I con il metodo DNA IQ™ System effettuata dai periti della CAA di Perugia non prevede il recupero di componenti proteiche e quindi rende impossibile qualsiasi tentativo di diagnosi della natura biologica del campione I. In alternativa esistono anche saggi che impiegano l'*mRNA* (RNA messaggero) per la diagnosi tissutale ma anche in questo caso occorre che la metodica di estrazione preveda la possibilità di co-purificare RNA e DNA dallo stesso campione. Il metodo DNA IQ™ System, utilizzato dai periti della CAA di Perugia, come molti altri utilizzati di routine in ambito forense, non prevede il recupero di mRNA e quindi rende impossibile una diagnosi attraverso questa metodologia.

Table III-2: Long-Term Storage Conditions Matrix¹

Type of Evidence ²	Frozen	Refrigerated	Temperature Controlled	Room Temperature
Liquid Blood	Never	Best		
Urine	Best			
Dry Biological Stained Items			Best	
Bones			Best	
Hair			Best	Acceptable
Swabs with Biological Material			Best (dried)	
Vaginal Smears			Best	
Feces	Best			
Buccal Swabs			Best	
DNA Extracts	Best (liquid)	Acceptable (liquid)	Acceptable (dried)	

Figura 13. Tabella III-2 estratta dalla pubblicazione "The Biological Evidence Preservation Handbook: Best Practices for Evidence Handlers" National Institute of Standards and Technology del National Institute of Justice (USA).

3. ANALISI DEL DNA NUCLEARE PER FINI DI IDENTIFICAZIONE PERSONALE

3.1 PREMESSA

Onde rispondere al quesito posto dalla Corte di Assise d'Appello di Firenze circa l'attribuzione dell'eventuale materiale genetico contenuto nell'estratto di DNA derivante dalla traccia I veniva stabilito e comunicato ai CCTPP, presenti nelle date del 10 e 11 ottobre 2013 presso la Sezione di Biologia del RIS di Roma, un piano di lavoro analitico finalizzato alla tipizzazione genetica dei polimorfismi di tipo STRs del DNA nucleare per l'estrapolazione di profili genetici (profili del DNA) utili ai fini identificativi.

3.1.1 Piano di lavoro delle attività peritali

Tale piano di analisi, condotto in accordo a linee-guida metodologiche e valutative (procedure operative standard e metodi interni) della Sezione di Biologia del RIS di Roma basate su validazioni interne di laboratorio e sui principali riferimenti bibliografici della Comunità Scientifica forense nazionale ed internazionale (di seguito indicati ed estesamente riportati in bibliografia), veniva ottimizzato in maniera tale da ottenere, dalla traccia I (tenendo in considerazione il volume di estratto di DNA presente), il massimo contenuto informativo possibile in termini di potenzialità identificative garantendo, al tempo stesso, il più alto grado di affidabilità delle risultanze analitiche.

I principali riferimenti bibliografici da cui i periti hanno attinto i criteri metodologici e valutativi impiegati nella presente perizia sono stati:

- Indagini genetiche-forensi di paternità e identificazione personale. Linee-guida Metodologico-Accertative-Criteriologico-Valutative (Tagliabracci A et al., 2007)¹;
- SWGDAM² Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories (Federal Bureau of Investigations, USA, 2010);

¹ Tale pubblicazione è stata sottoposta all'approvazione ed al consenso del Gruppo dei Genetisti Forensi Italiani (GeFI) e della Società Italiana di Medicina Legale e delle Assicurazioni (SIMLA).

- numerose pubblicazioni scientifiche internazionali, estesamente riportate nella allegata bibliografia, incluse le raccomandazioni della Società Internazionale di Genetica Forense (ISFG) con particolare riferimento a:
 - *DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Schneider PM, Weir BS. Forensic Sci Int. 2006 Jul 13;160(2-3):90-101.*
 - *DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. Gill P, Gusmão L, Haned H, Mayr WR, Morling N, Parson W, Prieto L, Prinz M, Schneider H, Schneider PM, Weir BS. Forensic Sci Int Genet. 2012 Dec;6(6):679-88.*

In particolare, nelle analisi peritali, si procedeva a:

- verificare il volume di estratto di DNA della traccia I presente nella provetta tipo Eppendorf consegnata ai periti dai Proff. Vecchiotti e Conti in data 10.10.2013;
- verificare nuovamente rispetto alle analisi già svolte dai periti Vecchiotti-Conti, il quantitativo, in termini di concentrazione, di DNA umano eventualmente presente onde valutare l'eventuale condizione di Low-Template DNA (LT DNA) o Low Copy Number (LCN) della traccia I e modulare di conseguenza il più corretto approccio analitico di tipizzazione genetica;
- effettuare procedure di tipizzazione genetica in repliche indipendenti a partire dallo stesso estratto di DNA della traccia I utilizzando:
 - reazioni di multiplex-PCR con un sistema di analisi di ultima generazione con elevatissime prestazioni analitiche in termini di limite di rilevabilità, robustezza, precisione ed esattezza e, quindi, di affidabilità;
 - altrettante procedure di separazione e di rilevazione degli ampliconi ottenuti dalle precedenti reazioni di multiplex-PCR (una per ogni amplificato di multiplex-PCR) tramite un sistema ad elettroforesi capillare di ultima generazione;
 - un idoneo software per l'analisi dei risultati delle precedenti elettroforesi capillari, costituiti da tracciati elettroforetici (elettroferogrammi) su cui sono impostati i criteri di accettabilità

² SWGDAM, Scientific Working Group on DNA Analysis Methods dell'FBI, Federal Bureau of Investigations, USA.

dei segnali allelici e dell'intero profilo genetico basati su procedure di validazione interne di laboratorio e/o sulla base della già citata letteratura scientifica;

- valutare qualitativamente e quantitativamente i risultati delle analisi indipendenti di tipizzazione sulla traccia I in linea con le raccomandazioni delle Comunità Scientifica forense, applicando alla interpretazione dei profili genetici ottenuti il cosiddetto *modello biologico* ed il cosiddetto *modello probabilistico* o *statistico* in maniera tale da fornire una misura quantitativa del contenuto e del significato informativo dei dati genetici;
- procedere alla comparazione dei profili genetici con quelli, desunti dagli atti a disposizione, di Meredith Susanna Cara Kercher, Rudy Hermann Guede e (su disposizione datata 25.10.2013 del Presidente della CAA di Firenze, Dott. Alessandro Nencini) di Raffaele Sollecito ea Amanda Marie Knox, onde valutare l'eventuale identificazione, l'eventuale esclusione, o l'eventuale inconclusività, anche in termini probabilistici, così come suggerito dalle più recenti linee-guida ISFG (Gill et al., 2012).

3.1.2 Tracce biologiche al limite delle attuali potenzialità analitiche "Low-Template DNA o Low Copy Number"

Low-Template DNA (LT-DNA) o, secondo una denominazione oggi meno utilizzata, Low Copy Number (LCN) è un'espressione che si utilizza, in biologia forense, per indicare una traccia in condizioni analitiche complesse dovute alla presenza di quantitativi assai esigui di DNA, convenzionalmente inferiori ai 100 pg (picogrammi, 10^{-12} grammi) che in termini biologici si riferisce alla presenza di poche decine di cellule e quindi di poche decine di copie di genomi, talvolta anche in condizioni di degradazione (Budowle et al., 2009; Butler, 2011; Budimlija e Caragine, 2012).

È ancora oggi dibattuto nella letteratura scientifica internazionale quali siano gli esatti criteri di individuazione di una situazione di LT-DNA; in linea generale le condizioni che consentono di considerare una traccia biologica in condizioni di LT-DNA sono una delle seguenti:

- dal punto di vista delle quantità e della qualità di DNA presente, la rilevazione di quantità di DNA genomico totale amplificabile estremamente basse, convenzionalmente inferiori ai succitati 100 pg di DNA;

- dal punto di vista dei risultati di tipizzazione, la osservazione nei tracciati elettroforetici di fenomeni stocastici, tipicamente dovuti all'incapacità dei sistemi di multiplex-PCR di riprodurre in maniera affidabile il reale contenuto genetico della traccia.

Quando il DNA si presenta in tali condizione estreme di LT DNA è infatti possibile che si verifichino dei fenomeni, denominati *effetti stocastici o casuali*, legati alla reazione di amplificazione del DNA per multiplex-PCR ed alla tecnica di separazione degli ampliconi per elettroforesi capillare che portano alla comparsa di artefatti analitici (Figura 14) (Graham, 2008; Buckleton, 2009; Butler, 2011): la comparsa di segnali analitici apparenti che non riflettono in maniera veritiera il profilo genetico realmente presente nella traccia biologica e la scomparsa di segnali analitici che sono invece realmente presenti nella traccia ma che i sistemi analitici non rilevano. Gli effetti stocastici determinano la comparsa di artefatti analitici ma non tutti gli artefatti analitici dipendono da effetti stocastici. È noto, infatti, che sistemi di analisi per multiplex-PCR e sistemi di rilevazione degli ampliconi tramite elettroforesi capillare portano comunque, anche non in condizioni di LT DNA, alla produzione di artefatti che sono noti e documentati in letteratura e nei manuali d'uso delle tecniche di analisi.

Gli effetti stocastici aggravano e talvolta fanno insorgere il fenomeno degli artefatti analitici compromettendo uno dei parametri fondamentali alla base della validità del dato, ovvero la sua precisione (ripetibilità e riproducibilità). Le principali tipologie di artefatti analitici nelle tracce LT DNA, causati in maniera rilevante dagli effetti stocastici, sono:

1. **Drop-in allelico** o contaminazione sporadica: presenza nell'elettroferogramma di alleli addizionali a causa di fenomeni di sporadica contaminazione dovuti a porzioni di cromosomi o a singoli cromosomi derivanti da residui cellulari in alcun modo correlati con l'evento criminoso. Si parla di drop-in allelico solo nel caso in cui l'evento che si verifica ovvero la comparsa di un allele non appartenente al donatore sia un evento casuale e non un evento consolidato (ripetibile o riproducibile). Se la comparsa dell'allele in questione risultasse un evento ripetibile nelle analisi successive saremmo infatti di fronte a una situazione ben diversa definita come contaminazione estesa.
2. **Drop-out allelico**: perdita di un allele ad un locus che si verifica quando uno dei due alleli di un locus eterozigote non viene amplificato a causa della scarsa quantità del materiale genetico presente nella traccia ed il locus eterozigote viene quindi erroneamente visualizzato come omozigote; accanto al fenomeno del drop-out allelico esiste anche il fenomeno, più raro, del drop-out dell'intero locus in cui la perdita riguarda entrambi gli alleli di un locus.

3. **Aumento dello sbilanciamento allelico:** si verifica quando due alleli appartenenti allo stesso locus eterozigote si presentano in quantità estremamente differenti (convenzionalmente quando l'intensità di un segnale allelico è $< 60\%$ dell'intensità dell'altro); nei casi più estremi di sbilanciamento ci si può trovare di fronte a una situazione di drop-out allelico.
4. **Aumento dei segnali analitici stutter:** gli stutter sono particolari artefatti analitici che possono originarsi durante la reazione di PCR; sono dovuti al fenomeno denominato *slippage* della polimerasi ovvero allo slittamento di questa sul DNA stampo che porta quindi a una corrispondenza errata tra il processo di appaiamento e quello replicativo. Tale fenomeno determina, in ultimo, la comparsa di segnali analitici (tipicamente in posizione n-4, ma non solo) che possono essere erroneamente interpretati come alleli reali.

Il materiale genetico in queste condizioni quantitativamente e qualitativamente sub-ottimali, determina situazioni analitiche assai complesse, sia in termini delle procedure di laboratorio, che in termini di corretto approccio interpretativo.

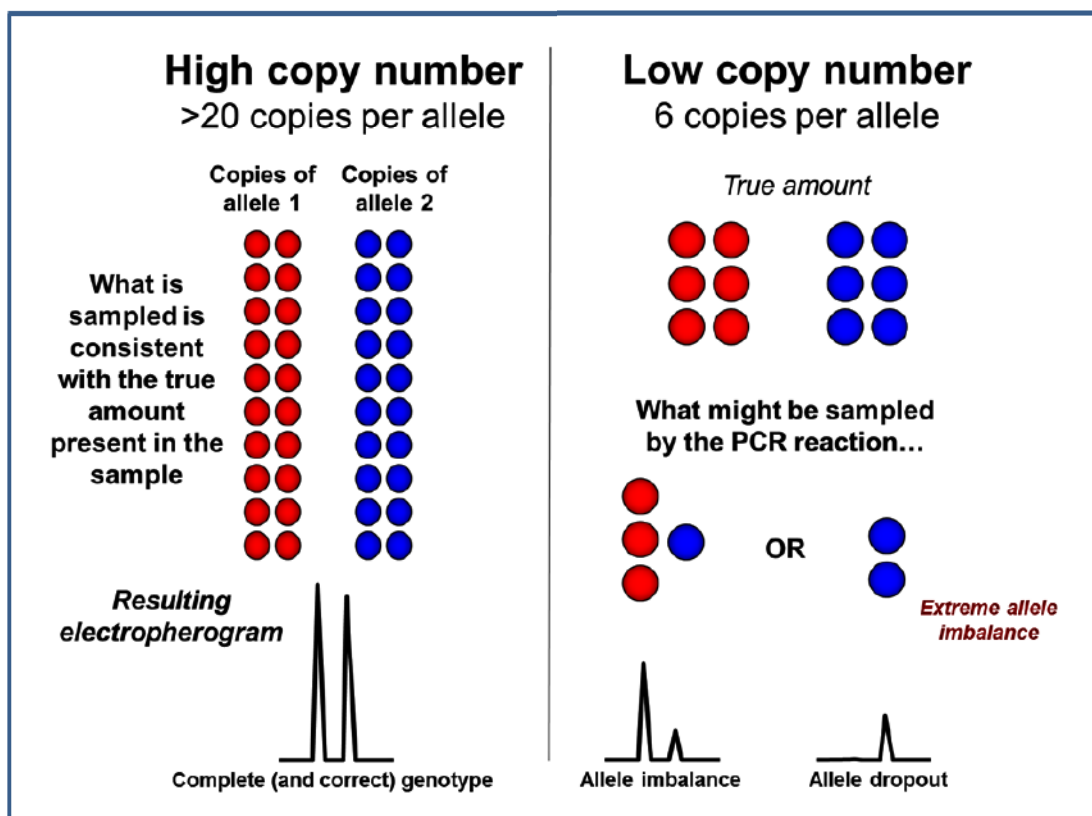


Figura 14. Rappresentazione schematica degli effetti stocastici; gli effetti stocastici sono dovuti a fenomeni di rilevazione non rappresentativa del reale contenuto genetico presente in una traccia (da: Butler, 2011).

3.2 MISURA DEL VOLUME DI ESTRATTO DI DNA DELLA TRACCIA I

La provetta tipo Eppendorf contenente il volume di liquido trasparente indicato come estratto di DNA della traccia I veniva centrifugata per pochi secondi onde consentire una completa raccolta dell'intero volume di liquido presente sul fondo della provetta e consentirne una misura più attendibile.

Utilizzando una pipetta PIPETMAN Classic™ modello P20 (Gilson, Villiers le Bel, France) con un errore sistematico pari a $\pm 0.20 \mu\text{l}$, un errore casuale massimo pari a $0.10 \mu\text{l}$ e, quindi, un errore complessivo pari a $\pm 0.30 \mu\text{l}$ (norme EN ISO 8655, utilizzate per le pipette e la relativa calibrazione), con calibrazione in corso di validità, è stata effettuata una misura in triplicato, con tre punte diverse, del volume di estratto di DNA presente nella provetta tipo Eppendorf che ha fornito un valore stimato di circa $16.33 \pm 0.58 \mu\text{l}$ di volume complessivo.

3.3 QUANTIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO UMANO AMPLIFICABILE

3.3.1 Descrizione della metodica

Per verificare la quantità e la qualità del DNA umano eventualmente presente nell'estratto ottenuto dalla traccia I si procedeva alla quantificazione del DNA genomico umano totale e di quello maschile.

La quantificazione del DNA è un processo finalizzato alla determinazione assoluta del quantitativo di DNA umano amplificabile recuperato dal precedente processo di estrazione. Questa informazione risulta fondamentale per comprendere quale sia la quantità e la qualità del DNA nelle tracce estratte e, quindi, capire quale sia la strategia di amplificazione migliore per estrapolare un profilo genetico utile ai fini identificativi e comparativi e per favorire una corretta amplificazione dei polimorfismi STRs del DNA mediante l'immissione nella reazione di PCR di idonei quantitativi di DNA stampo.

La valutazione della quantità e della qualità di DNA genomico amplificabile tramite multiplex-PCR è stata fatta utilizzando il sistema di quantificazione per real-time PCR Investigator® Quantiplex HYres Kit (Qiagen, Hilden, Germany) con software Rotor-Gene Q 2.1.0.9 (Qiagen, Hilden, Germany) su real-time PCR Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen, Hilden, Germany) (Di Pasquale et al., 2011; Thomas et al, 2013) particolarmente performante su quantità esigue di DNA, come dimostrato dalla letteratura e dalle validazioni interne del Laboratorio.

Il rilevamento dell'amplificazione viene effettuato utilizzando primer e sonda di complementarità Scorpions®. I primer-sonda Scorpions sono molecole bifunzionali contenenti un primer PCR in legame covalente con una sonda. Il fluorocromo in questa sonda interagisce con un quencher, anch'esso integrato nella sonda, che riduce la fluorescenza. Durante la PCR, quando la sonda si lega ai prodotti PCR, il fluorocromo e il quencher si separano. Ciò comporta un aumento della fluorescenza nella provetta di reazione. Il sistema è basato sulla rilevazione contemporanea di regioni specifiche del DNA. In particolare vengono rilevate:

- la regione multicopia 4NS1C®, che è una regione di 146 bp presente su diversi autosomi del genoma umano (in attesa di brevetto) selezionata per offrire elevata sensibilità ed elevata affidabilità fra diversi individui e popolazioni che permette la quantificazione del DNA totale (maschile e femminile) presente nel campione;
- la regione bersaglio maschile di quantificazione che viene rilevata come frammento di 129 bp del cromosoma Y e consente la quantificazione del cromosoma Y e quindi solo del DNA genomico maschile presente nel campione;
- un controllo interno (IC) da 200 bp che viene usato per testare l'avvenuta amplificazione e rilevare la presenza di eventuali inibitori della PCR.

La curva standard viene realizzata utilizzando sette differenti livelli di diluizioni scalari in duplicato di DNA di controllo Z1 fornito con il kit e contenente una miscela di DNA maschile e femminile, che imita il caso di un campione miscelato (1 µl di DNA di controllo Z1 contiene 20 ng di DNA umano, che include 6.66 ng di DNA maschile). L'intervallo dinamico lineare della curva standard va da un massimo di 20 ng/µl per il DNA genomico totale e 6.66 ng/µl per il DNA maschile fino a circa 4.88 pg/µl per il DNA genomico totale e 1.6 pg/µl per il DNA maschile. Come suggerito nel manuale d'uso non è stato tuttavia utilizzato l'ultimo valore maschile (0.001626 ng/µl) per tracciare la curva standard poiché, in alcuni casi, a causa di possibili effetti stocastici ciò comprometterebbe la qualità della curva stessa.

Il limite di rilevazione del sistema Investigator® Quantiplex HYres Kit è inferiore a 1 pg/μl, con una quantificazione precisa inferiore a 4.9 pg/μl. Come termine di paragone è bene ricordare che altri sistemi di quantificazione come il Quantifiler Duo impiegato nella perizia Vecchiotti-Conti ha un limite di quantificazione accurata dichiarato di 23 pg/μl, cioè circa 5 volte meno sensibile del sistema impiegato nella presente perizia.

La procedura di quantificazione è stata effettuata in accordo al protocollo fornito con il kit che, per ogni campione, prevede l'impiego di 2 μl di estratto di DNA. Sono stati pertanto sottoposti a procedura di quantificazione 2 μl dell'estratto della traccia I (che, pertanto, vengono "consumati" per l'analisi di quantificazione e si rendono inutilizzabili per la successiva fase di tipizzazione genetica) insieme a due controlli negativi di quantificazione (NTC, No Template Control) e ad un controllo positivo di quantificazione di DNA noto AmpFℓSTR® Control DNA 007 [100 pg/μl] (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Sono stati inoltre rispettati tutti i criteri valutativi della qualità ed i parametri analitici della reazione di quantificazione descritti nel manuale e suggeriti riferiti alla retta di taratura, alla efficienza di amplificazione ed al controllo interno.

Considerato il volume estremamente scarso di estratto di DNA a disposizione (tra i 16 ed i 17 μl) si è optato per effettuare una singola reazione di quantificazione i cui risultati sono stati pertanto utilizzati non come misura accurata, bensì come misura indicativa per verificare l'eventuale concordanza con le precedenti analisi di quantificazione con differente sistema (Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit su Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) dei Proff. Vecchiotti e Conti e per orientare ed ottimizzare la successiva fase di tipizzazione genetica.

3.3.2 Risultati della reazione di quantificazione del DNA umano

I principali parametri analitici ed i criteri valutativi dei risultati della reazione di real-time PCR utilizzando il suddetto kit e riferiti alla retta di taratura, alla efficienza di amplificazione ed al controllo interno (coefficiente di determinazione > 0.998; pendenza ≈ -3.3; efficienza di reazione > 0.997; valori di CT riferiti al controllo interno <32) hanno mostrato che la reazione di quantificazione si è svolta in maniera ottimale e nel rispetto rigoroso dei vincoli di qualità suggeriti nel manuale d'uso.

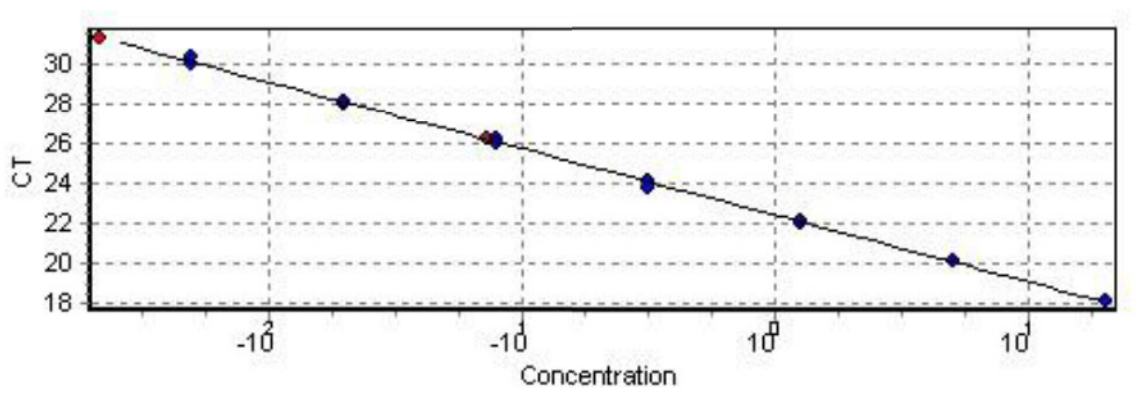
I risultati ottenuti hanno mostrato una quantità di DNA genomico umano totale pari a 2.14 pg/μl e, praticamente, una quantità di DNA maschile nulla (<0.1 pg/μl) suggerendo la presenza di scarsissime quantità di DNA genomico rilevabile molto probabilmente derivante da **uno o più soggetti femminili**. Tale dato, collocato al di sotto del limite di rilevazione della metodica per una quantificazione precisa (4.9 pg/μl) e tuttavia rilevabile dall'apparato di quantificazione:

- ha confermato sostanzialmente i risultati della precedente quantificazione dei Proff. Vecchiotti e Conti (concentrazione media di DNA pari a circa 5 pg/μl);
- ha dimostrato che l'estratto della traccia I si presentava in una situazione analitica complessa di LT DNA o LCN.

Di seguito viene riportato un estratto dei risultati di quantificazione (per i report completi si rimanda agli allegati dei dati analitici).

➤ Quantificazione DNA genomico totale

Standard Curve

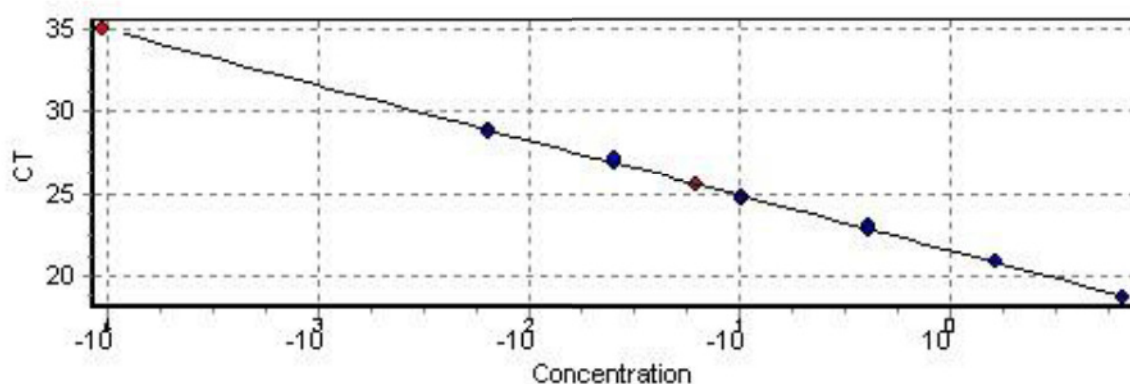


No	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)
1	■	Control DNA Z1 20ng/μl	Standard	18.16		20.000000000	18.6791463433
2	■	Control DNA Z1 20ng/μl	Standard	18.11		20.000000000	19.3445748165
3	■	Control DNA Z1 5ng/μl	Standard	20.06		5.000000000	5.0204116512
4	■	Control DNA Z1 5ng/μl	Standard	20.11		5.000000000	4.8597089366
5	■	Control DNA Z1 1,25ng/μl	Standard	21.98		1.250000000	1.3314014968
6	■	Control DNA Z1 1,25ng/μl	Standard	22.11		1.250000000	1.2138288154
7	■	Control DNA Z1 0,3125ng/μl	Standard	24.09		.312500000	.3101921095
8	■	Control DNA Z1 0,3125ng/μl	Standard	23.76		.312500000	.3887227797
9	■	Control DNA Z1 0,078125ng/μl	Standard	26.23		.078125000	.0703167831
10	■	Control DNA Z1 0,078125ng/μl	Standard	26.00		.078125000	.0821775777

No	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)
11	■	Control DNA Z1 0,01953125ng/ul	Standard	27.97		.0195312500	.0210826745
12	■	Control DNA Z1 0,01953125ng/ul	Standard	28.09		.0195312500	.0194798989
13	■	Control DNA Z1 0,0048828125ng/ul	Standard	29.98		.0048828130	.0052453422
14	■	Control DNA Z1 0,0048828125ng/ul	Standard	30.39		.0048828130	.0039609450
15	■	NTC	NTC				
16	■	NTC	NTC				
17	■	traccia I	Unknown	31.28			.0021417919
18	■	007	Unknown	26.20			.0718092337

➤ Quantificazione DNA maschile

Standard Curve



No	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)
1	■	Control DNA Z1 20ng/ul	Standard	18.82		6.6600000000	6.8397734253
2	■	Control DNA Z1 20ng/ul	Standard	18.75		6.6600000000	7.1571500146
3	■	Control DNA Z1 5ng/ul	Standard	20.95		1.6650000000	1.5590991087
4	■	Control DNA Z1 5ng/ul	Standard	20.91		1.6650000000	1.6100585998
5	■	Control DNA Z1 1,25ng/ul	Standard	23.05		.4162500000	.3642925715
6	■	Control DNA Z1 1,25ng/ul	Standard	22.81		.4162500000	.4317474634
7	■	Control DNA Z1 0,3125ng/ul	Standard	24.70		.1040625000	.1165421777
8	■	Control DNA Z1 0,3125ng/ul	Standard	24.79		.1040625000	.1091915565
9	■	Control DNA Z1 0,078125ng/ul	Standard	26.81		.0260156250	.0269737274
10	■	Control DNA Z1 0,078125ng/ul	Standard	27.10		.0260156250	.0220663628

No	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)
11	■	Control DNA Z1 0,01953125ng/μl	Standard	28.87		.0065039060	.0064684373
12	■	Control DNA Z1 0,01953125ng/μl	Standard	28.76		.0065039060	.0069754198
15	■	NTC	NTC				
16	■	NTC	NTC				
17	■	Traccia I	Unknown	34.95			.0000956398
18	■	007	Unknown	25.57			.0633851142

3.4 ANALISI DI TIPIZZAZIONE GENETICA DEI POLIMORFISMI STRs DEL DNA NUCLEARE E CRITERI INTERPRETATIVI DEI RISULTATI

3.4.1 Descrizione delle metodiche

Sul volume di estratto di DNA della traccia I rimanente (circa 14-15 µl) venivano effettuate le analisi per lo studio dei polimorfismi STRs autosomici del DNA nucleare umano consistenti:

- a. nell'amplificazione utilizzando un sistema di multiplex-PCR di ultima generazione per lo specifico impiego in genetica forense e con elevatissime prestazioni analitiche con i quali sono state analizzate le regioni STRs dei cromosomi autosomici ed il locus Amelogenina indicativo del sesso; la scelta di non utilizzare lo stesso sistema di amplificazione multiplex-PCR utilizzato dal Servizio di Polizia Scientifica della Polizia di Stato, l'AmpF&STR®*Identifiler* PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), ha comportato, da una parte la possibilità di poter confrontare soltanto 10 loci autosomici rispetto ai 16 disponibili, ma dall'altra ha permesso di utilizzare un sistema con prestazioni analitiche estremamente più elevate in grado di fornire risultati qualitativamente e quantitativamente migliori rispetto all'impiego di sistemi precedenti; tale caratteristica, a giudizio dei periti, in condizioni di campioni complessi come nel caso in parola, avrebbe consentito, come in effetti è stato, di ottenere un risultato utile a confronti.
- b. nella successiva fase di separazione e rilevazione degli amplificati mediante un sistema di ultima generazione ad elettroforesi capillare;
- c. nella analisi dei tracciati elettroforetici (*elettroferogrammi*) volta ad individuare i veri segnali allelici che rispondano a requisiti minimi di accettabilità e nella estrapolazione di eventuali profili genetici.

Vista la condizione di LT DNA e, quindi, di estrema complessità analitica della traccia I, ma tenuto anche in considerazione lo scarso volume di estratto di DNA disponibile, si è scelto di condurre le suddette analisi in duplicato, in accordo a quanto suggerito dalla più recente letteratura scientifica soprattutto nei casi di LT DNA che, nei casi di profili genetici complessi, raccomanda l'esecuzione

in replicato delle analisi di tipizzazione. La scelta di eseguire le analisi in duplicato è derivata dalla esigenza di:

- poter valutare la concordanza dei risultati analitici (elettroferogrammi) e, quindi, l'eventuale consolidamento del risultato onde garantire l'attendibilità e la valenza informativa dei dati genetici;
- evitare di suddividere ulteriormente il già scarso quantitativo di DNA dell'estratto della traccia I in un numero maggiore di reazioni di multiplex-PCR, vanificando in tal modo la possibilità di ottenere profili genetici utili dall'estratto e, quindi il contenuto informativo.

Le procedure analitiche impiegate vengono di seguito descritte.

a. Multiplex-PCR di loci STRs autosomici

Il sistema di multiplex-PCR impiegato nella presente perizia tecnico-biologica è stato l'AmpF ℓ STR $^{\circ}$ NGM SElect $^{\text{TM}}$ PCR Amplification Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (Green et al., 2013) che consente di coanalizzare 16 regioni polimorfiche autosomiche STRs denominate D10S1248, VWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391, SE33, più il locus Amelogenina per la determinazione del sesso. Il termociclatore impiegato per la reazione di PCR è stato il Veriti $^{\circ}$ Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Circa 7 μ l dell'estratto di DNA della traccia I sono stati utilizzati come DNA stampo per la prima reazione di amplificazione. I restanti 8 μ l circa dell'estratto di DNA della traccia I sono stati utilizzati come DNA stampo per la seconda reazione di amplificazione.

Sono stati inoltre sottoposti ad entrambe le reazioni di multiplex-PCR un controllo positivo di DNA noto AmpF ℓ STR $^{\circ}$ Control DNA 007 [100 pg/ μ l] in duplicato (lo stesso campione di controllo positivo utilizzato in fase di quantificazione) in quantità differenti (circa 6 μ l ed 8 μ l) e due controlli negativi di amplificazione.

Complessivamente i campioni amplificati con il sistema AmpF ℓ STR $^{\circ}$ NGM SElect $^{\text{TM}}$ PCR Amplification Kit in ciascuna delle reazioni di multiplex-PCR sono stati classificati come segue:

- **Traccia I.** Estratto di DNA della traccia I (circa 7 μ l nella prima amplificazione; circa 8 μ l nella seconda amplificazione).

- **CTR-(A).** Controllo negativo di amplificazione.
- **CTR+(6).** Controllo positivo di amplificazione AmpF ℓ STR $^{\circ}$ Control DNA 007 (circa 6 μ l).
- **CTR+(8).** Controllo positivo di amplificazione AmpF ℓ STR $^{\circ}$ Control DNA 007 (circa 8 μ l).
- **CTR-(B).** Controllo negativo di amplificazione.

Il protocollo di amplificazione relativo alla reazione di multiplex-PCR è stato condotto in accordo al manuale d'uso del kit sia in riferimento al set-up della PCR che al ciclo termico.

In particolare il profilo termico di amplificazione è stato quello raccomandato nel manuale d'uso del kit con una scelta del numero dei cicli di amplificazione pari a 29, anche in accordo con il metodo interno MI 5.4/BIO/B rev. 6 2012 (*"Identificazione personale tramite analisi dei marcatori del DNA (estrazione con biorobot)"*) accreditato UNI EN ISO/IEC 17025:2005. Vista la notevole sensibilità della metodica di multiplex-PCR impiegata, ed in accordo a numerosi protocolli di analisi di tracce LT DNA (vedasi ad es.: Benschop et al., 2012; Benschop et al., 2013; Green et al, 2013) che impiegato il medesimo profilo di PCR, si è dunque scelto di non incrementare il numero di cicli in maniera tale da limitare il numero di possibili artefatti analitici nei tracciati elettroforetici.

Sebbene il quantitativo ottimale di DNA per una reazione di multiplex-PCR ad alta efficienza sia indicato nei rispettivi manuali d'uso compreso tra 500 pg ed 1 ng, i limiti di rilevazione (LoD, Limit of Detection) in termini di quantità di DNA stampo dei sistemi di analisi di tipizzazione genetica impiegati descritti in letteratura per ottenere profili genetici completi è inferiore ai 125 pg di DNA genomico nei kit di multiplex-PCR (Barbaro et al, 2011; Lopes et al., 2011; Andrade et al. 2011; Gehrig et al. 2011; Welch et al., 2012; Green et al., 2013).

b. Separazione e rilevazione degli ampliconi di PCR tramite elettroforesi capillare

La separazione e la rilevazione degli amplificati ottenuti nelle due serie di multiplex-PCR della traccia I è stata effettuata mediante il sistema Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) basato sulla tecnologia di separazione tramite elettroforesi capillare e di rilevazione degli ampliconi tramite fluorescenza (Butler, 2010; Butler 2011; Pascali et al, 2012), in accordo al protocollo raccomandato nel manuale d'uso dell'AmpF ℓ STR $^{\circ}$ NGM SElect $^{\text{TM}}$ PCR Amplification Kit. Per ogni amplificato della traccia I è stata condotta una indipendente corsa elettroforetica ed una corrispondente rilevazione degli ampliconi.

In ogni corsa elettroforetica, oltre ad 1 µl di amplificato della traccia I, sono stati caricati anche 1 µl di ciascuno dei controlli riportati nel precedente paragrafo ed 1 µl di un DNA ladder allelico, l'AmpF ℓ STR® NGM SElect™ Allelic Ladder, in duplicato. Lo standard interno utilizzato (0.5 µl per pozzetto) è stato il GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v. 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

I campioni sottoposti ad elettroforesi capillare su Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer, per ogni replica, sono stati i seguenti:

- **Posizione A01. Traccia I.** Amplificato di DNA della traccia I dalla prima e dalla seconda amplificazione.
- **Posizione B01. CTR-(A).** Controllo negativo di amplificazione.
- **Posizione C01. CTR+(6).** Controllo positivo di amplificazione AmpF ℓ STR® Control DNA 007.
- **Posizione D01. CTR+(8).** Controllo positivo di amplificazione AmpF ℓ STR® Control DNA 007.
- **Posizione E01. CTR-(B).** Controllo negativo di amplificazione.
- **Posizione F01. AmpFISTR® NGM SElect™ Allelic Ladder.** Ladder allelico.
- **Posizione G01. AmpFISTR® NGM SElect™ Allelic Ladder.** Ladder allelico.

I dati sono stati acquisiti mediante il programma 3500 Series Data Collection Software v. 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Le principali impostazioni utilizzate nella corsa elettroforetica dei due indipendenti amplificati della traccia I vengono riportate nella seguente tabella (Tabella 1).

Tabella 1. Principali impostazioni di corsa elettroforetica impostate sul 3500 Series Data Collection Software v. 2.0.

Impostazioni di elettroforesi capillare sul 3500 Series Data Collection Software v. 2.0	
Impostazione	Tipologia/valore
<i>Polimero</i>	POP-4™
<i>Capillare</i>	36 cm
<i>Run voltage</i>	15 Kv per 1210 secondi
<i>Prerun voltage</i>	15 Kv per 180 secondi
<i>Injection voltage</i>	1.2 Kv per 15 secondi
<i>Dye Set</i>	G5
<i>Formamide</i>	Hi-Di™ Formamide
<i>Standard interno di DNA</i>	GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v. 2.0

c. Analisi degli elettroferogrammi ed estrapolazione di profili genetici

I dati grezzi della corsa elettroforetica acquisiti dal software 3500 Series Data Collection Software v. 2.0 sono stati memorizzati in formato .hid ed analizzati mediante il software GeneMapper® ID-X Software v. 1.4 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). I criteri o requisiti di accettabilità (soglie) dei segnali analitici osservati nei tracciati elettroforetici sono stati impostati in accordo alle già citate linee-guida metodologiche e valutative della Sezione di Biologia del RIS di Roma (paragrafo 2.1) ed automaticamente impostati sui metodi di analisi del software di genotipizzazione, GeneMapper® ID-X Software v. 1.4 e documentate sulla procedura operativa standard (SOP) nr.5.10/B/BIO.

Solo i segnali analitici rispondenti ai requisiti minimi di accettabilità ed riconoscibili in maniera attendibile come reali segnali allelici (quindi non artefatti) sono stati identificati nei tracciati elettroforetici e ad essi è stata attribuita la relativa denominazione allelica sulla base del confronto con il DNA ladder di riferimento. Tutti i segnali allelici ottenuti nelle singole regioni STRs del DNA analizzate sono stati valutati nel complesso come profilo genetico.

In particolare, per l'analisi dei dati della traccia I è stato utilizzato un metodo di analisi LCN, dedicato a tracce LT DNA, mentre per l'analisi dei controlli positivi di amplificazione CTR+(6) e

CTR+(8) (AmpF ℓ STR $^{\circ}$ Control DNA 007) e per i controlli negativi CTR-(A) e CTR-(B) e per i ladder allelici è stato impiegato un metodo di analisi standard per tracce in condizioni non LT DNA. Nessuna operazione manuale di cancellazione o modifica è stata effettuata dopo l'analisi automatica con il metodo prescelto da parte dei periti, mantenendo così esattamente la genuinità del processo analitico.

I principali parametri di analisi del software GeneMapper $^{\circ}$ ID-X Software v. 1.4 ed i relativi valori soglia di accettabilità vengono di seguito sinteticamente riportati nella seguente tabella riepilogativa (Tabella 2) e meglio dettagliati nelle immagini 15-A, 15-B, 15-C (parametri di analisi standard) e nelle immagini 16-A, 16-B, 16-C (parametri di analisi per tracce LT DNA).

Tabella 2. Principali requisiti di accettabilità dei segnali allelici nei tracciati elettroforetici.

Metodi di analisi impostati sul software GeneMapper$^{\circ}$ ID-X Software v. 1.4		
<i>Parametro analitico</i>	Metodo di analisi standard	Metodo di analisi LT DNA
<i>Limite rilevabilità (LoD)</i>	150 RFU	50 RFU
<i>Altezza minima picchi omozigoti (soglia effetti stocastici)</i>	200 RFU	75 RFU
<i>Valore massimo dell'altezza dei picchi</i>	30000 RFU	30000 RFU
<i>Valore soglia bande stutter</i>	15%	15%
<i>Valore Soglia sbilanciamento allelico</i>	60%	30%

Analysis Method Editor

General Allele Peak Detector Peak Quality SQ & GQ Settings

Bin Set: AmpFLSTR_Bins_v3X

☒ Use marker-specific stutter ratio and distance if available

Marker Repeat Type:		Tri	Tetra	Penta	Hexa
Global Cut-off Value		0.15	0.15	0.15	0.0
MinusA Ratio		0.0	0.0	0.0	0.0
MinusA Distance	From	0.0	0.0	0.0	0.0
	To	0.0	0.0	0.0	0.0
Global Minus Stutter Ratio		0.0	0.0	0.0	0.0
Global Minus Stutter Distance	From	0.0	3.25	0.0	0.0
	To	0.0	4.75	0.0	0.0
Global Plus Stutter Ratio		0.0	0.0	0.0	0.0
Global Plus Stutter Distance	From	0.0	0.0	0.0	0.0
	To	0.0	0.0	0.0	0.0

Amelogenin Cutoff 0.15

Range Filter... Factory Defaults

Save As Save Cancel Help

Figura 15-A. Schermata relativa al metodo di analisi standard impostato sul GeneMapper® ID-X Software v. 1.4, usato per l'analisi dei controlli e dei ladder allelici.

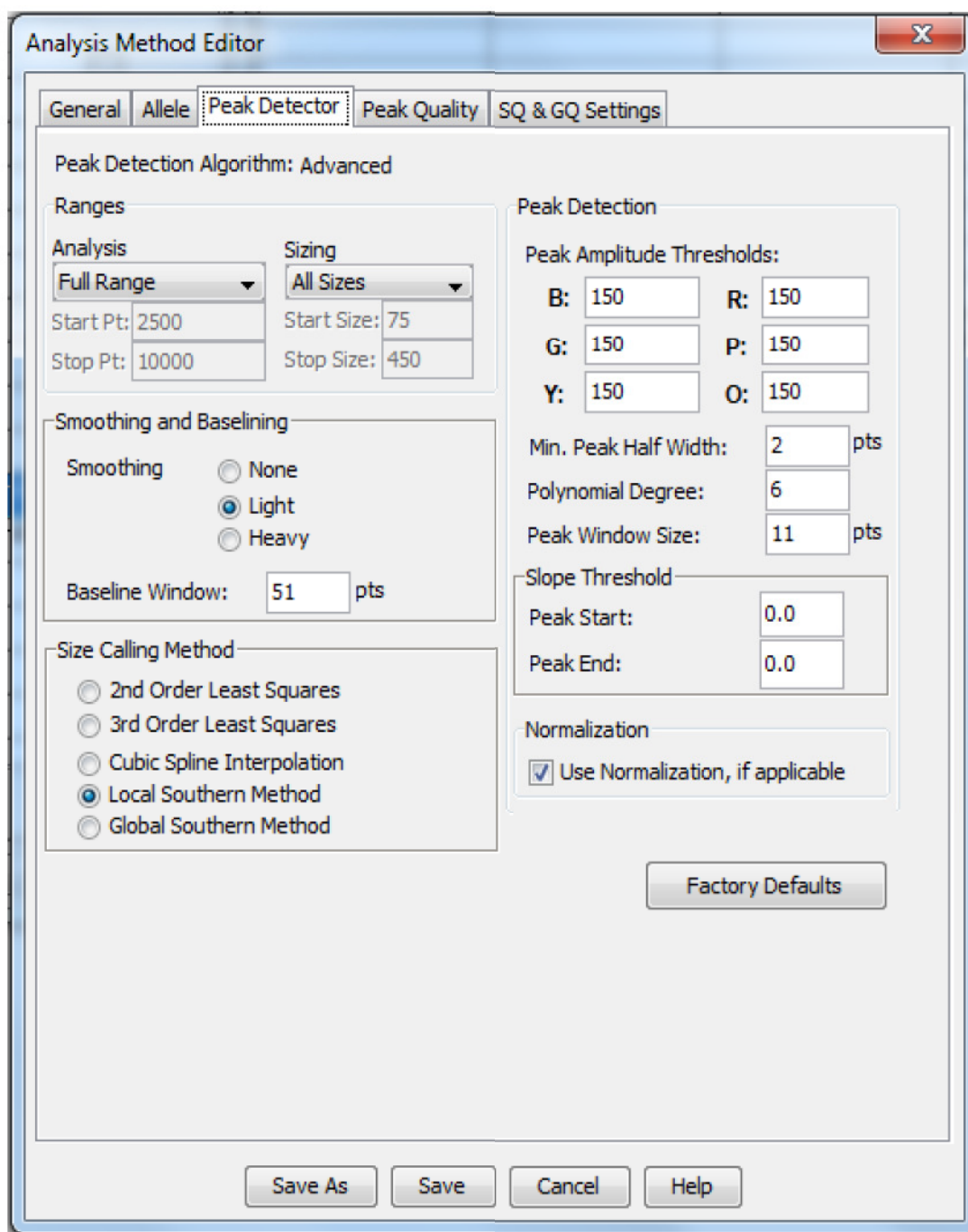


Figura 15-B. Schermata relativa al metodo di analisi standard impostato sul GeneMapper® ID-X Software v. 1.4, usato per l'analisi dei controlli e dei ladder allelici.

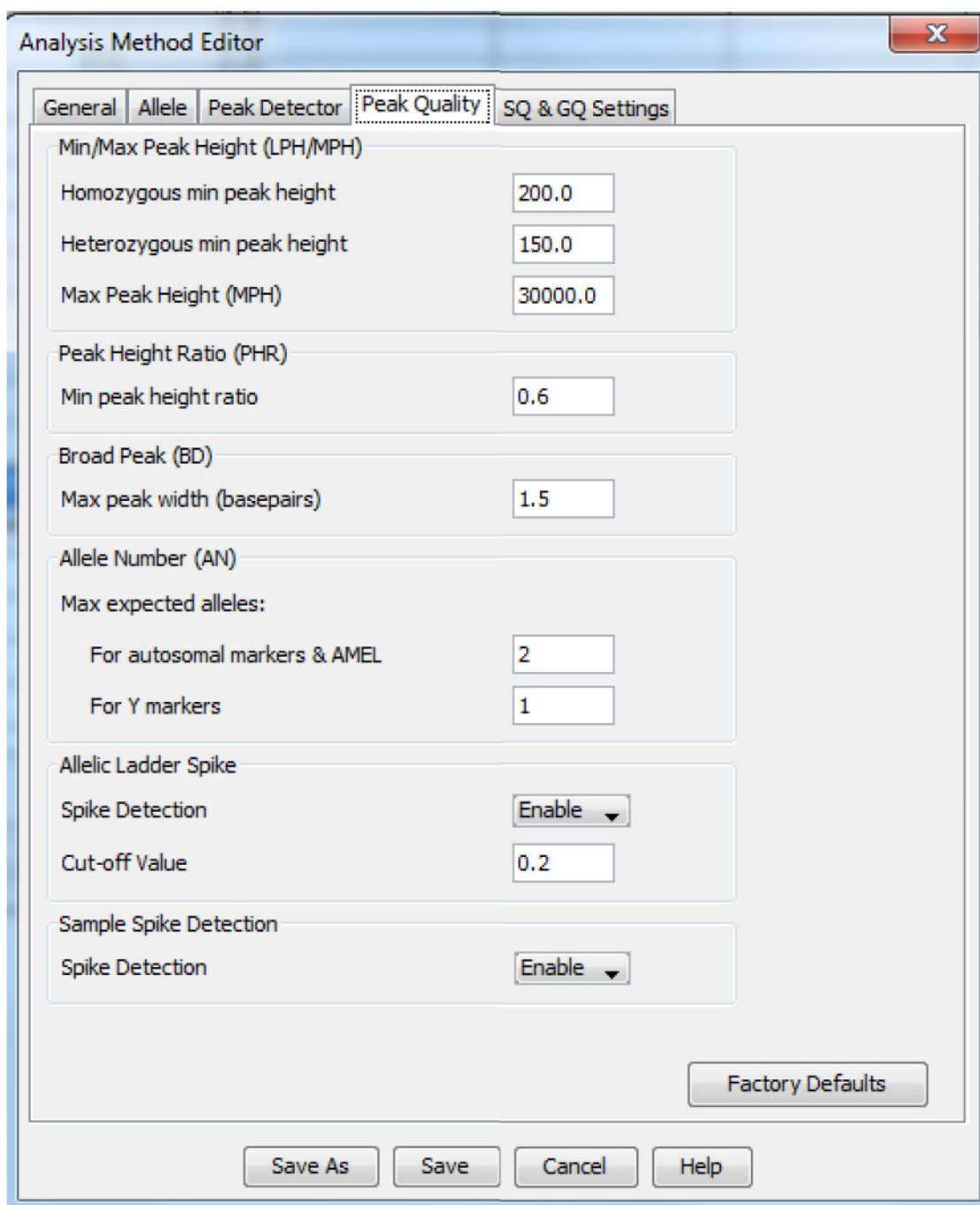


Figura 15-C. Schermata relativa al metodo di analisi standard impostato sul GeneMapper® ID-X Software v. 1.4, usato per l'analisi dei controlli e dei ladder allelici.

Analysis Method Editor

General Allele Peak Detector Peak Quality SQ & GQ Settings

Bin Set: AmpFLSTR_Bins_v3X

☒ Use marker-specific stutter ratio and distance if available

Marker Repeat Type:		Tri	Tetra	Penta	Hexa
Global Cut-off Value		0.15	0.15	0.15	0.0
MinusA Ratio		0.0	0.0	0.0	0.0
MinusA Distance	From	0.0	0.0	0.0	0.0
	To	0.0	0.0	0.0	0.0
Global Minus Stutter Ratio		0.0	0.0	0.0	0.0
Global Minus Stutter Distance	From	0.0	3.25	0.0	0.0
	To	0.0	4.75	0.0	0.0
Global Plus Stutter Ratio		0.0	0.0	0.0	0.0
Global Plus Stutter Distance	From	0.0	0.0	0.0	0.0
	To	0.0	0.0	0.0	0.0

Amelogenin Cutoff 0.15

Range Filter... Factory Defaults

Save As Save Cancel Help

Figura 16-A. Schermata relativa al metodo di analisi LCN, per tracce Low Template-DNA impostato sul GeneMapper® ID-X Software v. 1.4, utilizzato per l'analisi della traccia I.

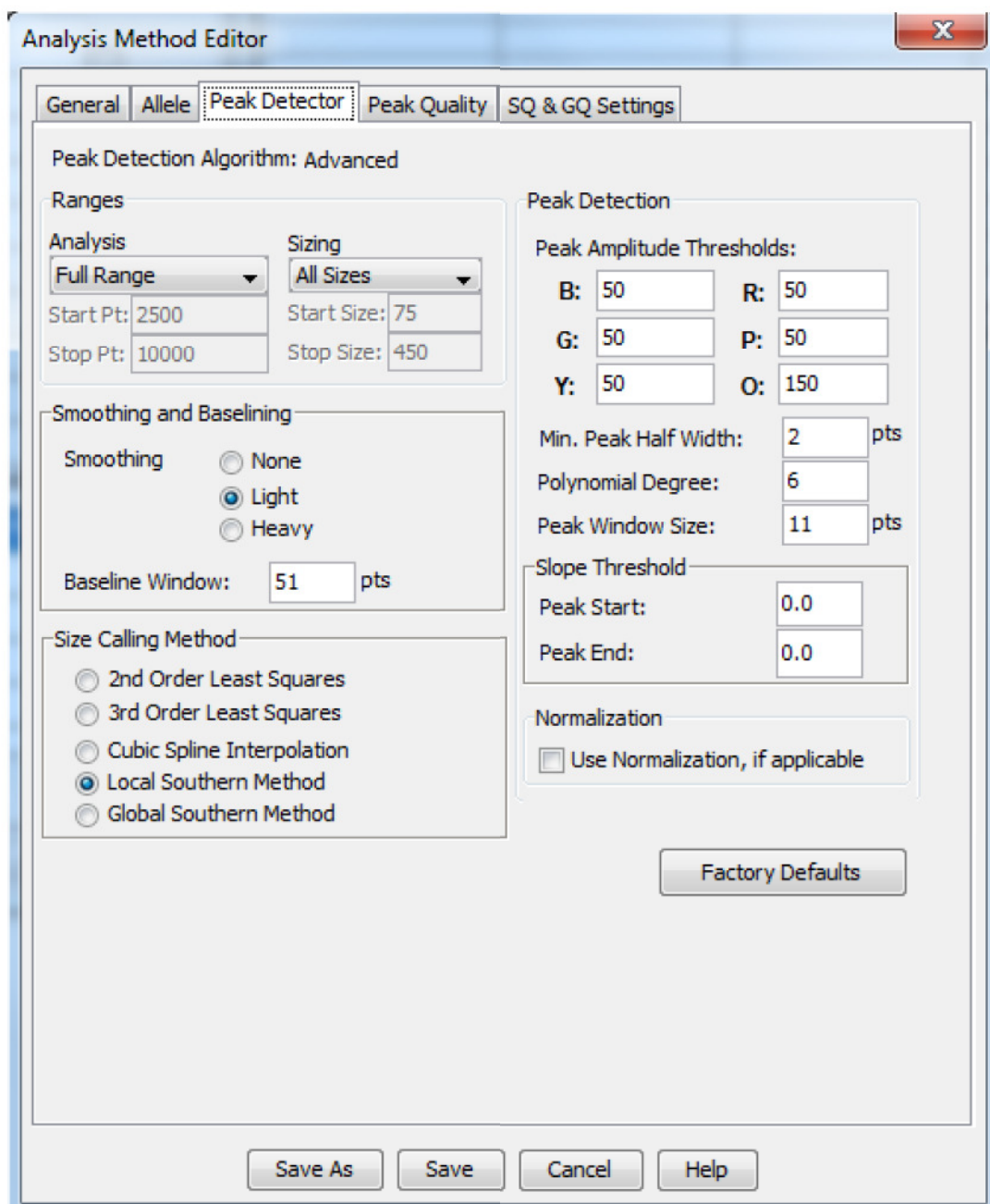


Figura 16-B. Schermata relativa al metodo di analisi LCN, per tracce Low Template-DNA impostato sul GeneMapper® ID-X Software v. 1.4, utilizzato per l'analisi della traccia I.

The screenshot shows the 'Analysis Method Editor' window with the 'Peak Quality' tab selected. The window contains several sections with input fields and dropdown menus. At the bottom right is a 'Factory Defaults' button, and at the bottom are 'Save As', 'Save', 'Cancel', and 'Help' buttons.

Section	Parameter	Value
Min/Max Peak Height (LPH/MPH)	Homozygous min peak height	75.0
	Heterozygous min peak height	50.0
	Max Peak Height (MPH)	30000.0
Peak Height Ratio (PHR)	Min peak height ratio	0.3
	Broad Peak (BD)	
	Max peak width (basepairs)	1.5
Allele Number (AN)	Max expected alleles:	
	For autosomal markers & AMEL	2
	For Y markers	1
Allelic Ladder Spike	Spike Detection	Enable
	Cut-off Value	0.2
Sample Spike Detection	Spike Detection	Enable

Figura 16-C. Schermata relativa al metodo di analisi LCN, per tracce Low Template-DNA impostato sul GeneMapper® ID-X Software v. 1.4, utilizzato per l'analisi della traccia I.

3.4.2 Interpretazione dei profili genetici e comparazione con i profili genetici di confronto

Per ciascuna delle due repliche di tipizzazione il profilo genetico ottenuto è stato valutato singolarmente per verificare la presenza di profili genetici parziali, completi o in miscela genetica multiallelica, e la loro eventuale utilizzabilità per comparazione con profili genetici di soggetti di confronto.

Vista la natura di LT DNA della traccia I, in accordo a quanto raccomandato dalla letteratura scientifica, si è deciso di applicare, come procedure interpretative, due modelli differenti: il **“classico” modello biologico** (Caragine et al., 2009; Benschop et al., 2011, Pfeifer et al., 2012) ed il **modello statistico o probabilistico** (Curran et al., 2005; Gill et al. 2008; Gill e Buckleton, 2009; Benschop et al., 2011; Gill e Haned, 2013). Tali modelli interpretativi consentono di ottenere il massimo e più affidabile contenuto informativo possibile da una traccia soprattutto in condizioni di LT DNA e/o di miscela genetica multiallelica considerando i fenomeni stocastici tipici di tali tipologia di tracce: l’incremento delle bande stutter, l’aumento degli sbilanciamenti allelici e, soprattutto, le perdite alleliche e/o di interi loci (drop-out) e le contaminazioni sporadiche, cioè limitate ad uno o pochi loci STRs di un profilo genetico (drop-in).

a. Interpretazione dei profili genetici secondo il modello biologico (modello “classico”)

I profili genetici relativi alla traccia I ottenuti da ciascuna replica sono stati interpretati non singolarmente, bensì in maniera integrata applicando il modello biologico di valutazione dei profili genetici che consiste nel prendere in considerazione non il profilo genetico ottenuto dalla singola replica ma entrambi i profili genetici.

In letteratura vengono descritti due principali approcci del modello biologico che sono stati entrambi applicati alla valutazione dei profili genetici della traccia I.

- Il *metodo consenso* (Gill et al. 2000; Benschop et al., 2011; Benschop et al., 2012; Benschop et al., 2013) che prevede che, per ogni locus, un allele ritenuto rispondente a criteri di accettabilità prestabiliti possa essere considerato affidabile e, quindi, contribuire ad un *profilo virtuale consenso*, utilizzabile per confronti, se e solo se si conferma nelle singole repliche; sono sufficienti due repliche di tipizzazione, sebbene la recente letteratura suggerisca, in via ottimale, l’esecuzione di tre o quattro repliche e di considerare affidabili i soli alleli che si confermino in almeno la metà dei profili genetici;

tale approccio consente di ovviare parzialmente agli eventuali fenomeni soprattutto di drop-in in quanto vengono considerati solo gli alleli consolidati nelle repliche (Benschop et al., 2011).

- Il *metodo composito* (Pfeifer et al., 2012; Bright et al., 2012) che invece prevede che, per ogni locus, ciascun allele ritenuto rispondente a criteri di accettabilità prestabiliti ed osservato nelle differenti repliche possa contribuire ad un *profilo virtuale composito* che consiste nella somma di tutti gli alleli osservati; tale approccio consente di ovviare parzialmente agli eventuali fenomeni soprattutto di drop-out in quanto vengono considerati tutti gli alleli delle repliche (Pfeifer et al., 2012).

Poiché tali metodi consentono, in linea di massima, di rilevare effetti stocastici differenti il loro utilizzo combinato può fornire un maggiore numero di informazioni utili per il confronto con profili genetici di soggetti noti che tuttavia devono essere valutate con attenzione, soprattutto considerando che il numero di analisi di tipizzazione in replicato è stato necessariamente limitato a due (Benschop et al., 2011; Pfeifer et al., 2012).

Per tale motivo i periti hanno deciso di verificare e supportare gli esiti delle analisi di tipizzazione genetica integrando le informazioni ottenute con il modello interpretativo biologico con quelle ottenute dal modello statistico.

b. Interpretazione dei profili genetici secondo il modello statistico

Per la valutazione del peso dell'evidenza della prova genetica tramite il calcolo del valore di LR (Likelihood Ratio, rapporto di verosimiglianza) esistono tre tipologie di metodi statistici, basati su altrettanti diversi algoritmi, classificati come metodi binari (metodi di calcolo tradizionali), metodi semi-continui e metodi continui (metodi di calcolo di più recente introduzione) (Taylor et al., 2013).

In pratica tutti i metodi statistici sopra indicati sono basati sul calcolo dell'LR, un valore adimensionale basato sui profili genetici ottenuti e su assunzioni ("propositions") che individua oggettivamente quale di due (e solo due) ipotesi possibili, mutualmente esclusive, in un determinato scenario risulta più probabile. In particolare l'LR applicato alla genetica forense consente di rapportare la probabilità di osservare un profilo genetico E sotto un'ipotesi, l'ipotesi di identificazione Hp, (probabilità indicata come $P(E|Hp, X)$), con la probabilità di osservare lo stesso profilo genetico E sotto l'ipotesi alternativa, l'ipotesi di

esclusione Hd, considerando una specifica popolazione di riferimento X (probabilità indicata come $P(E|H_d, X)$). L'ipotesi Hp, propria degli organi inquirenti, sostiene che il profilo genetico E derivante da una traccia lasciata sulla scena del crimine sia riconducibile al sospettato, mentre l'ipotesi Hd, propria degli organi difensivi, sostiene che profilo genetico E derivante da una traccia lasciata sulla scena del crimine sia riconducibile ad un soggetto diverso dal sospettato, appartenente alla stessa popolazione X, e con il quale incidentalmente, condivide lo stesso profilo genetico E.

In formalismo statistico:

$$LR = \frac{P(E|H_p, X)}{P(E|H_d, X)}$$

Numericamente il valore della LR può oscillare tra 0 (assoluta estraneità) e $+\infty$ (identificazione certa) e può esprimere, nei fatti, tre conseguenze processuali:

- $LR \gg 1$ significa "forti elementi di supporto all'ipotesi di identificazione";
- $LR \approx 1$ significa "neutralità", nel senso che il risultato della tipizzazione genetica non consente di propendere né per l'ipotesi di identificazione, né per quella di esclusione in quanto l'accertamento non ha prodotto risultati utili (cioè è risultato inconclusivo), quindi né a supporto di un'ipotesi, né dell'altra;
- $LR \ll 1$ significa "supporto all'ipotesi di esclusione" in maniera tanto più accentuata quanto più LR tende a 0; per $LR = 0$ si ha la certezza della non identità anonimo-sospettato.

In accordo alla letteratura scientifica internazionale (ad esempio: Evett e Weir, 1998; Aitken e Taroni, 2004; Buckleton et al. 2005; Association of Forensic Science Providers, 2009) esistono delle linee-guida per associare al valore numerico di LR una qualifica verbale che consenta di associare ad un valore numerico, un corrispondente significato informativo, più rispondente alle esigenze dibattimentali. Nella seguente tabella (Tabella 3) viene riportata una idonea scala di lettura dei valori di LR in relazione all'ipotesi di identificazione ed all'ipotesi di esclusione.

Tabella 3. Significato informativo, in termini verbali, del valore numerico di LR, in accordo a numerose pubblicazioni internazionali (ad es.: Evett e Weir, 1998; Aitken e Taroni, 2004; Buckleton et al. 2005; Association of Forensic Science Providers, 2009).

³ La variabile X, riferita alla popolazione di riferimento, riportata nel formalismo statistico sopra indicato viene spesso omessa e considerata sottintesa.

Tabella di equivalenza verbale del valore di LR	
Valutazione verbale	Valore numerico
Supporto estremamente forte alla ipotesi di esclusione	$LR \leq 0.0001$
Supporto forte alla ipotesi di esclusione	$LR \approx 0.001-0.0001$
Supporto moderatamente forte alla ipotesi di esclusione	$LR \approx 0.01-0.001$
Supporto moderato alla ipotesi di esclusione	$LR \approx 0.1-0.0.1$
Supporto limitato all'ipotesi di esclusione	$0.1 \leq LR < 1$
Nessun supporto ad alcuna delle due ipotesi (neutralità)	$LR \approx 1$
Supporto limitato alla ipotesi di identificazione	$1 < LR \leq 10$
Supporto moderato alla ipotesi di identificazione	$LR \approx 10-100$
Supporto moderatamente forte alla ipotesi di identificazione	$LR \approx 100-1000$
Supporto forte alla ipotesi di identificazione	$LR \approx 1000-10000$
Supporto estremamente forte alla ipotesi di identificazione	$LR \geq 10000$

Per la valutazione del peso dell'evidenza del profilo genetico della traccia I rispetto ai profili genetici dei soggetti di confronto si è scelto di applicare un algoritmo di calcolo semi-continuo che, considerando, in maniera indipendente, entrambi i profili genetici relativi alla traccia I valuta in termini di LR la possibilità che uno o più soggetti di confronto abbiano contribuito, con il proprio materiale genetico, ai profili genetici della traccia I, probabilizzando anche i possibili eventi stocastici di drop-out, denominata $Pr(D)$, e di drop-in, denominata $Pr(C)$. Tale scelta è stata basata sul fatto che l'impiego dei metodi statistici binari non è raccomandabile nei casi di tracce LT DNA dove possono verificarsi eventi stocastici. Inoltre, ad oggi, i metodi statistici continui che sfruttano tutte le informazioni quantitative (intensità dei segnali allelici), hanno trovato una ristretta applicazione in tracce LT DNA in quanto possono fornire informazioni fuorvianti quando i segnali sono di scarsa intensità, si è in presenza di fenomeni stocastici ed il rumore di fondo analitico è rilevante (Gill et al., 2007; Benschop et al., 2011; Taylor et al., 2013).

Il modello statistico impiegato per il calcolo del valore di LR è stato quello basato sui principi teorici descritti da Curran et al. (2005), Gill et al. (2007) e Gill et al. (2008), implementato in un software accessibile dal sito della Società Internazionale di Genetica Forense (ISFG) denominato *LRmix* (Haned e Gill, 2011; Haned et al. 2012; Gill e Haned, 2013) che tiene conto delle raccomandazioni dell'ISFG in merito alle procedure di interpretazione delle miscele genetiche multialleliche (Gill et al., 2006) e dei risultati di tipizzazione potenzialmente inficiati da effetti stocastici (drop-out, drop-in) (Gill et al. 2012).

LRmix è un software facente parte di un pacchetto di software per impiego in biologia forense denominato *Forensim* (Haned, 2011; Haned e Gill, 2011), sviluppato su piattaforma di programmazione *R*. *LRmix* è basato su un algoritmo che, informandosi a parametri forniti dalle circostanze del caso specifico, consente di probabilizzare, mediante calcolo del valore di LR (Likelihood Ratio, rapporto di verosimiglianza), l'inclusione o l'esclusione del profilo genetico di uno o più soggetti di confronto dal profilo genetico, singolo, parziale, misto, e/o in condizione di LT DNA, di una traccia biologica ignota.

I parametri che l'algoritmo richiede sono i seguenti:

- le informazioni (assunzioni) da valutare sia nell'ipotesi dell'inclusione, o ipotesi di identificazione o, convenzionalmente, ipotesi accusatoria (*H_p*) che nell'ipotesi di esclusione, o ipotesi di non identificazione o, convenzionalmente, ipotesi difensiva (*H_d*):
 - numero di soggetti contributori;
 - numero di individui noti ed ignoti;
- il profilo genetico o i profili genetici dei soggetti noti ("soggetti di confronto");
- il profilo genetico o i profili genetici (repliche analitiche) della traccia biologica ignota;
- la probabilità di drop-in, $Pr(C)$;
- la probabilità di drop-out, $Pr(D)$;
- un valore di *theta*, θ (opzionale);
- frequenze alleliche derivanti da un database popolazionistico di riferimento.

LRmix è in grado di considerare, nel calcolo dell'LR, più repliche di tipizzazione di una traccia, qualunque numero di contributori ad una traccia mista, eventuali effetti stocastici (drop-out e/o drop-in) ed, infine, eventuali effetti di suddivisione nella popolazione di riferimento (parametro θ). Il software *LRmix* è stato elaborato dal National Forensic Institute olandese ed è stato ampiamente utilizzato con successo in numerosi casi forensi e correntemente impiegato, per fini investigativi e probatori, in Europa (ad esempio in Belgio, Germania, Norvegia, Olanda, Spagna) e negli USA. Inoltre la Sezione di Biologia del RIS di Roma ha svolto una propria validazione interna, anche con il supporto diretto di personale dell'NFI, che ha dimostrato la piena affidabilità del software *LRmix* anche nei casi più complessi, caratterizzati da numerosi eventi stocastici.

Il calcolo del valore di LR relativo all'ipotesi di inclusione dei profili genetici dei soggetti di confronto, convenzionalmente indicati nel software come "suspect" (ma che, secondo una corretta accezione nel caso in specie, è da intendersi come "soggetto di interesse"), nei profili

genetici della traccia I è stato condotto ponendo in relazione le probabilità dell'evidenza (profili genetici traccia I), $\Pr(E|H_p)$ e $\Pr(E|H_d)$, sotto le due ipotesi alternative e mutualmente esclusive, cioè l'ipotesi di identificazione, H_p , e l'ipotesi di esclusione, H_d :

Le suddette ipotesi prevedevano:

- ✓ *Ipotesi di identificazione, H_p (Under H_p): un soggetto di interesse + 1 soggetto ignoto (suspect + 1 unknown(s));*
- ✓ *Ipotesi di esclusione, H_d (Under H_d): due soggetti ignoti (2 unknown(s)).*

I parametri generali impostati sul software *LRmix* per valutare quale delle due ipotesi mostrasse la maggiore verosimiglianza e con quale "intensità" sono stati i seguenti:

Parametri utilizzati per il calcolo:

- ✓ *Valore della probabilità di drop-out impostato (Drop-out value): 0.1 e/o 0.5*
- ✓ *Valore della probabilità di drop-in impostato (Drop-in value): 0.05*
- ✓ *Valore del coefficiente theta (Theta value): 0.01*
- ✓ *N° di contributori ignote nell'ipotesi H_p (Unknowns under H_p): 1*
- ✓ *N° di contributori ignote nell'ipotesi H_d (Unknowns under H_d): 2*
- ✓ *Database popolazionistico: caucasici e/o afro-americani*

Il valore di drop-out pari a 0.5, ovvero pari al 50% indica che, nei calcoli del valore di LR rispetto all'ipotesi di inclusione di un soggetto nella miscela genetica, viene ipotizzato che fino ad un massimo del 50% degli alleli di tale soggetto potrebbero non essere rilevati per perdita allelica (drop-out) piuttosto che perché effettivamente non presenti.

Tale valore è estremamente conservativo in quanto consente di non escludere alcun soggetto sulla base dell'assenza (ancorché rilevante) di propri alleli nella miscela genetica.

Nel caso del calcolo relativo al profilo genetico di Amanda Marie Knox (AMK) è stato impostato anche un valore di probabilità di drop-out pari a 0.1, che, sulla base dei segnali allelici osservati nel profilo genetico della traccia I e nel profilo genetico di confronto, risulta più realistico.

In tutti i casi è stato effettuato:

- un *test di sensibilità* che, mostrando come varia il valore di LR quando $0.01 \leq \text{Pr}(D) \leq 0.99$, consente di verificare il range di valori più probabili di $\text{Pr}(D)$ (dal 5° al 95° percentile) per l'analisi in esame mediante un metodo di simulazione Monte-Carlo (Gill et al., 2007) e, quindi il corrispondente range più probabile di valori di LR che, quindi, viene confrontato con l'LR inizialmente ottenuto (tali risultati vengono estesamente riportati allegati alla presente relazione peritale);
- un *test di robustezza* (o di *performance*) utilizzando i grafici di Tippet (Gill et al., 2008) che consiste nella valutazione del valore di LR quando il soggetto di interesse nel calcolo (quindi il soggetto di confronto) viene sostituito da N soggetti presi a caso ($N = n^\circ$ di iterazioni), il cui profilo genetico viene assemblato in maniera virtuale prendendo casualmente gli alleli presenti del database popolazionistico utilizzato; la distribuzione di LR per le N iterazioni viene riportata in un Tippet plot; se il modello di calcolo dell'LR ha funzionato in maniera efficiente e se H_p è vera allora l'LR del soggetto di interesse sarà $\gg 1$ e gli LR delle N iterazioni saranno $\ll 1$; se invece è vera H_d allora l'LR del soggetto di interesse e gli LR delle N iterazioni saranno entrambi $\ll 1$.

Onde fornire un riscontro dei risultati ottenuti con il metodo semi-continuo di LRmix e verificare l'eventuale concordanza dei risultati statistici, nei casi di inclusione sono stati ripetuti i calcoli anche con un metodo binario classico contenuto nel software *DNAVIEW™* v. 29.73, (Brenner, 2006; Brenner, 2011) applicato sia sul profilo genetico consenso che sul profilo genetico composito. Nei casi di drop-out il software attribuisce il valore di 1 (neutralità) all'LR di quello specifico locus ed il relativo LR cumulativo (denominato "LR residuale") viene calcolato di fatto escludendo i loci interessati dagli eventi di drop-out.

Per quanto riguarda i database popolazionistici di riferimento i calcoli sono stati effettuati utilizzando una popolazione caucasica di riferimento (Berti et al., 2011) e, nel caso di Rudy Hermann Guede, anche una popolazione afro-americana (Hill et al., 2013), in accordo a quanto descritto in letteratura relativamente alla scelta dei database popolazionistici per la stima delle frequenze alleliche (ad esempio: NRC-II, 1996; Budowle et al., 2000).

c. Comparazione con i profili genetici noti

Successivamente si è proceduto al confronto dei risultati genetici dalla traccia I con i profili genetici di confronto di Meredith Susanna Cara Kercher (MSCK) e di Rudy Hermann Guede (RHG) secondo il modello biologico e secondo il modello statistico. Su richiesta avanzata ai periti dal Presidente della Corte di Assise di Appello di Firenze, Dott. Alessandro Nencini (autorizzazione datata 25.10.2013, allegata agli atti della presente perizia), è stata inoltre effettuata una comparazione del profilo genetico della traccia I anche con i profili genetici di Raffaele Sollecito (RS) e di Amanda Marie Knox (AMK), richiesta questa inizialmente non inclusa nel quesito dell'incarico peritale.

Tutti i profili genetici di confronto sono stati desunti dagli atti disponibili ed, in particolare, dalla relazione tecnica prodotta dalla Direzione Centrale Anticrimine della PdS - Servizio di Polizia Scientifica – Divisione III – Sezione Indagini di Genetica Forense di Roma protocollata con nr. Prot. 225/9D-BI-2007-28669-01 (10747) datata 12.06.2008 in cui era stato utilizzato, come sistema di multiplex-PCR, l'AmpF Φ STR® Identifier™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sistema oggi superato, in termini di prestazioni analitiche, da kit di multiplex-PCR di ultima generazione (quale quello impiegato nella presente perizia). Avendo impiegato sistemi di multiplex-PCR differenti in tutti i casi i confronti sono stati ovviamente effettuati per i soli loci STRs condivisi dai due sistemi (complessivamente 11 loci: 10 loci STRs ed il locus Amelogenina): vWa, D16S539, D2S1338, Amelogenina, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D3S1358. Tale numero di loci STRs confrontabili è da ritenersi tuttavia sufficiente per l'esecuzione dei confronti richiesti.

Onde escludere potenziali, ancorché estremamente improbabili, eventi di contaminazione del materiale genetico presente nella traccia I con materiale biologico derivante dai periti, dai CCTTPP intervenuti alle operazioni tecnico-biologiche che hanno fornito il proprio consenso, o dal personale di laboratorio della Sezione di Biologia del RIS di Roma, i profili genetici ottenuti sono stati confrontati con i profili genetici di esclusione di tutti i suddetti soggetti (limitatamente al modello biologico).

- **Comparazione secondo il modello biologico.** Nel caso del modello biologico i profili genetici consenso e composito sono stati confrontati con i profili genetici dei soggetti di confronto onde verificare, rispettivamente, la eventuale corrispondenza tra il profilo genetico consenso ed i profili genetici di confronto oppure la eventuale presenza, nel profilo composito, di alleli riscontrabili nei profili genetici di confronto in maniera coerente ed omogenea.

- **Comparazione secondo il modello statistico.** Le repliche di tipizzazione della traccia I sono state inoltre analizzate, in accordo con il metodo statistico sopra descritto, con il software *LRmix* onde fornire una valutazione probabilistica in termini di “peso dell’evidenza” tramite il calcolo del valore di LR, alla eventuale inclusione o esclusione dei profili genetici dei soggetti di confronto. Nei casi di inclusione è stato anche utilizzato il software *DNAVIEW™* v. 29.73, (Brenner, 2006; Brenner, 2011) sul profilo genetico consenso e sul profilo genetico composito della traccia I.

3.4.3 Risultati delle analisi di tipizzazione genetica

Da entrambe le tipizzazioni genetiche della traccia I sono stati ottenuti altrettanti tracciati elettroforetici con caratteristiche qualitative e quantitative tipiche delle tracce in condizione di Low-Template DNA (così come atteso sulla base dei risultati di quantificazione) attribuibili a fenomeni stocastici ed in condizione di probabile miscela genetica: intensità media dei segnali espressa in RFU nei due tracciati intorno ai 270 RFU, sensibili sbilanciamenti intralocus, rumore di fondo rilevante soprattutto sul canale spettrale rosso, possibili bande stutter di intensità > 15%, presenza, per alcuni loci STRs, di più di due alleli, presenza di probabili fenomeni di drop-in e di drop-out, presenza infine di segnali *spike* (artefatti legati alla tecnologia di separazione tramite elettroforesi capillare e di rilevazione fluorescente degli ampliconi) (Figure 17 e 18).

Pur non potendo escludere probabili fenomeni di drop-in, la presenza, in più loci STRs, di un numero di alleli superiore a due ha suggerito una condizione di miscela genetica generata dal contributo di materiale biologico da verosimilmente due individui.

In nessuna delle due indipendenti procedure di tipizzazione della traccia I è emersa la presenza, nei tracciati elettroforetici, di alcun segnale allelico Y (maschio-specifico) apprezzabile in corrispondenza del locus Amelogenina, coerentemente con quanto già emerso in fase di quantificazione, suggerendo quindi che il contributo alla formazione della traccia I fosse derivante esclusivamente da uno o più soggetti femminili.

Nel complesso, i due tracciati elettroforetici indipendenti della traccia I sono stati comunque ritenuti utili per l’estrpolazione di profili genetici e, quindi, utilizzati per comparazione.

I profili genetici derivanti dalla interpretazione dei relativi elettroferogrammi della prima e della seconda analisi di tipizzazione vengono riportati nella seguente tabella riepilogativa (Tabella 4);

vengono inoltre riportati i risultati del modello biologico di interpretazione dei profili genetici ottenuti (profilo genetico consenso e profilo genetico composito).

I segnali allelici riportati (salvo diversamente indicato in tabella) rispettano i criteri di accettabilità precedentemente descritti relativamente alle analisi di profili LT DNA.

I profili genetici dei CCTPP intervenuti, ottenuti dai periti a partire da rispettivi campioni biologici salivari, non vengono riportati in tabella ma i relativi elettroferogrammi vengono allegati alla presente relazione peritale.

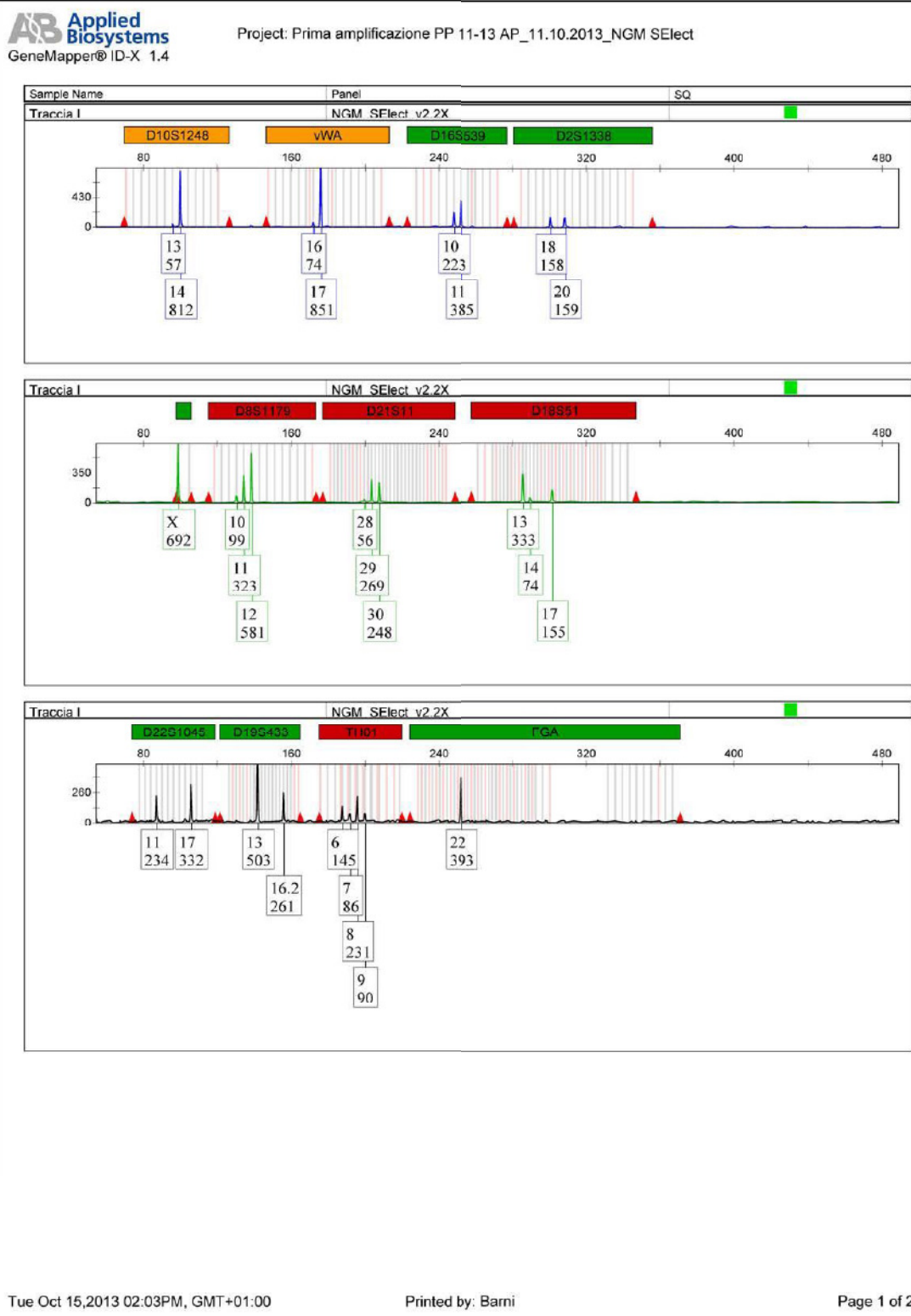


Figura 17. Tracciato elettroforetico della traccia I derivante dalla prima reazione di amplificazione per multiplex-PCR.

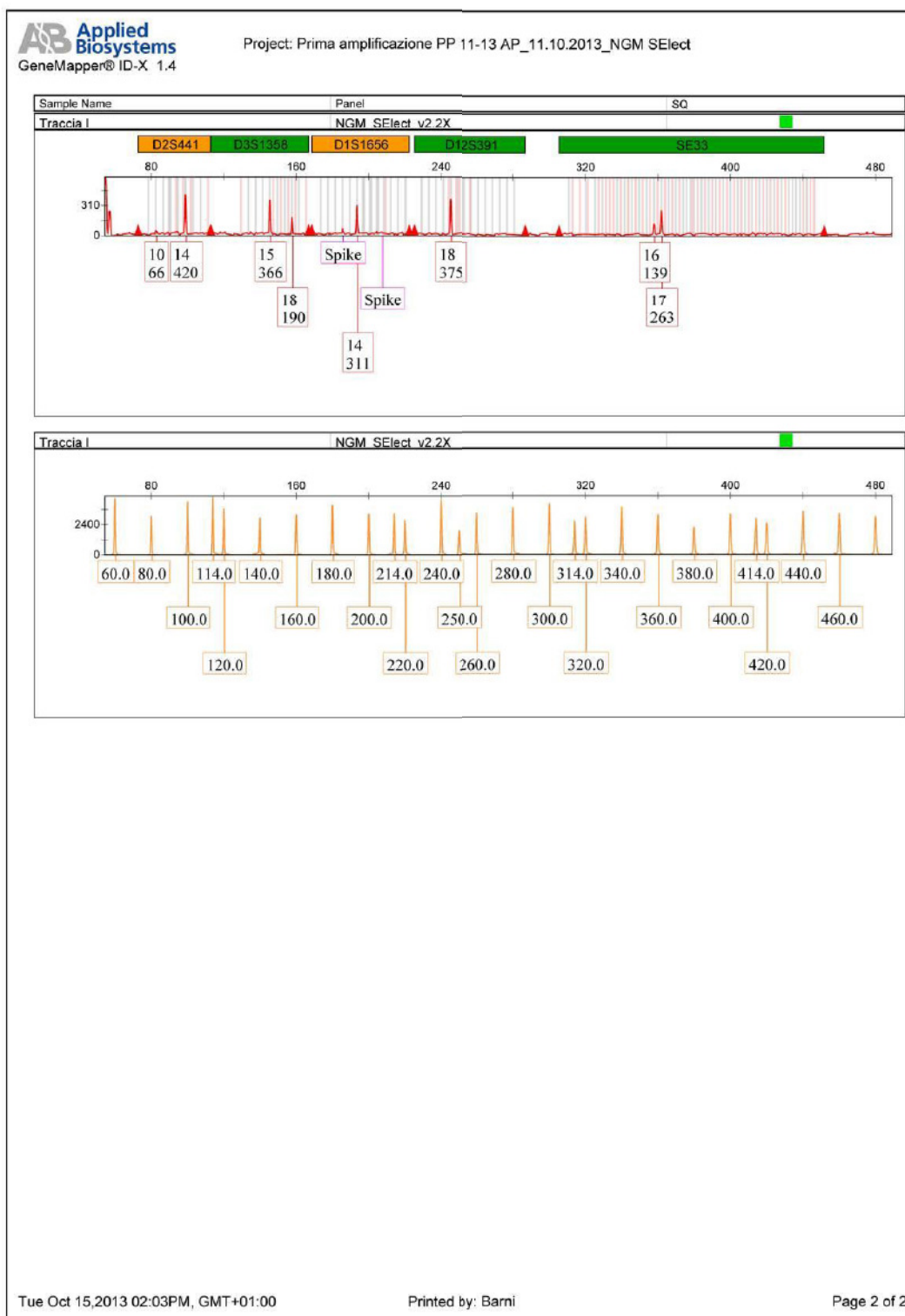


Figura 17. Tracciato elettroforetico della traccia I derivante dalla prima reazione di amplificazione per multiplex-PCR.

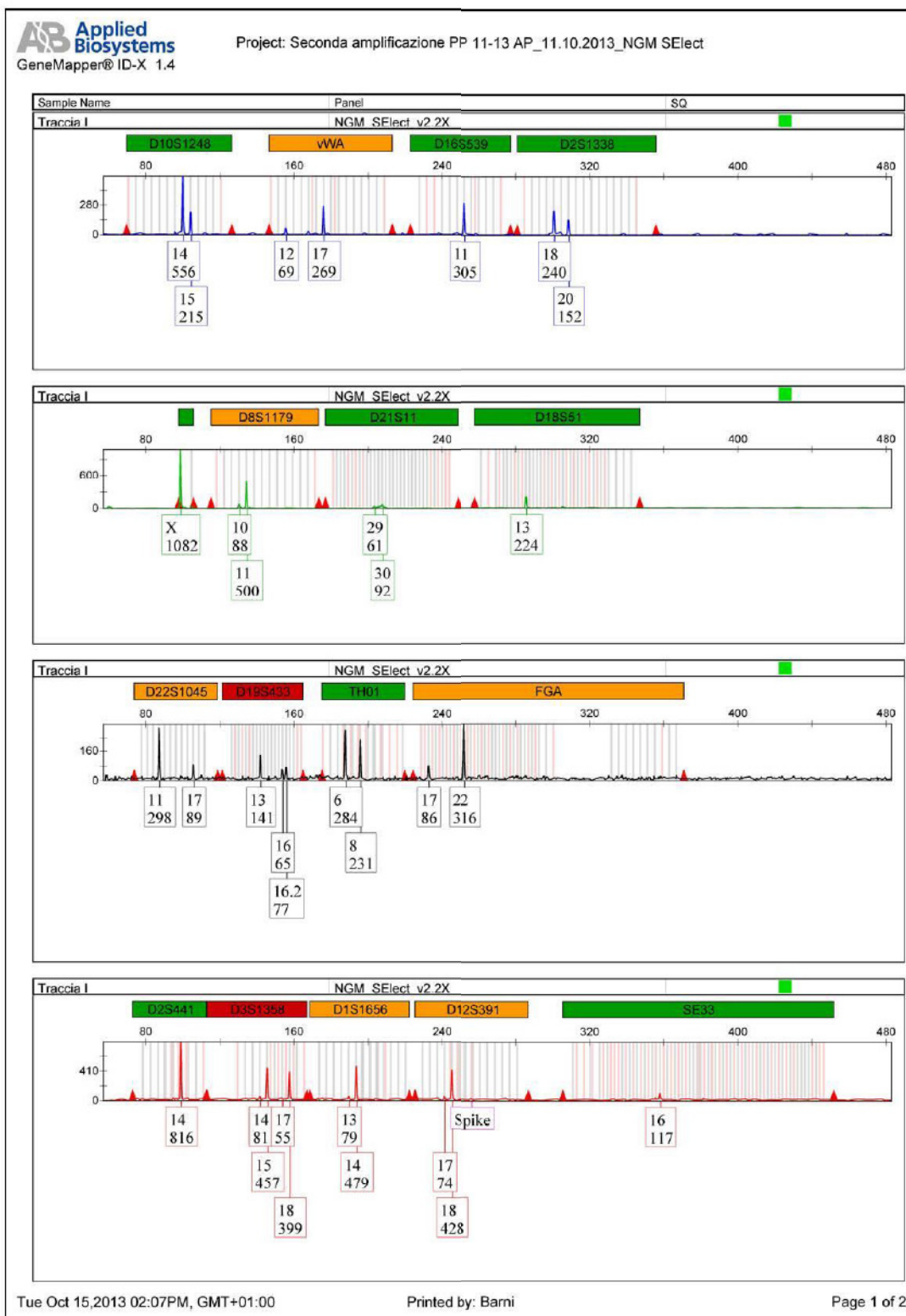


Figura 18. Tracciato elettroforetico della traccia I derivante dalla seconda reazione di amplificazione per multiplex-PCR.

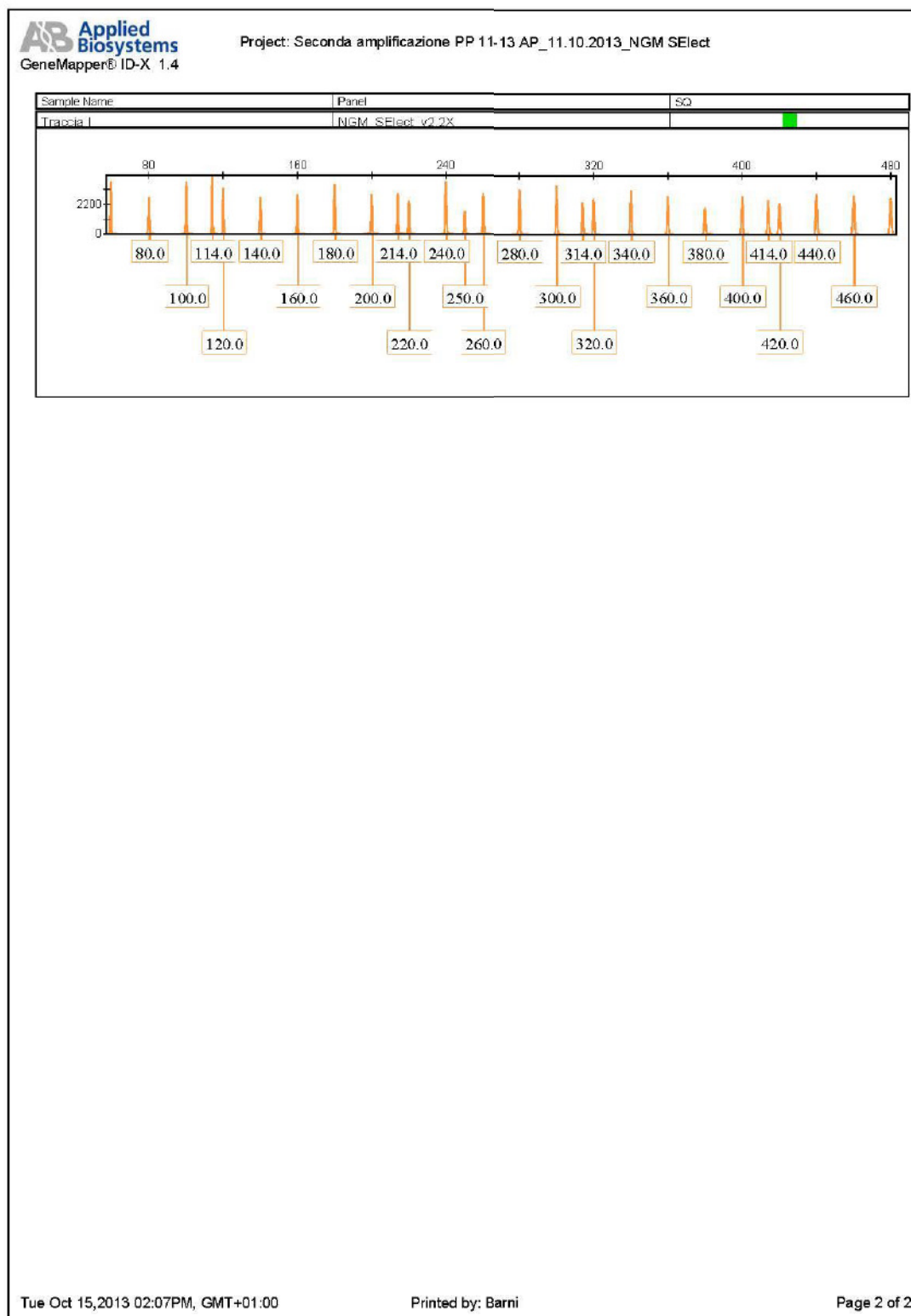


Figura 18. Tracciato elettroforetico della traccia I derivante dalla seconda reazione di amplificazione per multiplex-PCR.

Tabella 4. Risultati di tipizzazione della traccia I.

TIPIZZAZIONE DEI POLIMORFISMI STRs AUTOSOMICI DEL DNA NUCLEARE "Traccia I"				
PROFILI GENETICI	<i>Profilo genetico dalla tipizzazione del DNA dalla prima amplificazione</i>	<i>Profilo genetico dalla tipizzazione del DNA dalla seconda amplificazione</i>	<i>Interpretazione secondo il modello biologico (classico)</i>	
			<i>Profilo genetico consenso</i>	<i>Profilo genetico composito</i>
Loci STRs				
D10S1248	13-14	14-15	14	13-14-15
vWa	16-17	12-17	17	12-16-17
D16S539	10-11	11	11	10-11
D2S1338	18-20	18-20	18-20	18-20
SESSO (Amelogenina)	X	X	X	X
D8S1179	10-11-12	10-11	10-11	10-11-12
D21S11	28-29-30	29-30	29-30	28-29-30
D18S51	13-14-17	13	13	13-14-17
D22S1045	11-17	11-17	11-17	11-17
D19S433	13-16.2	13-16-16.2	13-16.2	13-16-16.2
TH01	6-7-8-9	6-8	6-8	6-7-8-9
FGA	22	17-22	22	17-22
D2S441	10-14	14	14	10-14
D3S1358	15-18	14-15-17-18	15-18	14-15-17-18
D1S1656	12 (Spike)-14	13-14	14	12-13-14
D12S391	18	17-18	18	17-18
SE33	16-17	16	16	16-17
D13S317	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
TPOX	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
D7S820	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
D5S818	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
CSF1PO	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

Note

- N.E.: l'analisi sul locus in esame non è stata effettuata in quanto tale locus non è presente nel sistema di multiplex-PCR impiegato dai periti (AmpFℓSTR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit).

3.4.4 Confrontazioni con i profili genetici di confronto e valutazioni biostatistiche

Sono state effettuate quindi le comparazioni tra i profili genetici della traccia I ed i profili genetici dei soggetti di confronto in accordo a quanto previsto nel modello biologico e nel modello statistico di interpretazione dei risultati. I soggetti confrontati sono stati:

- **Meredith Susanna Cara Kercher (MSCK)**, come disposto nell'incarico peritale del 04.10.2013;
- **Rudy Hermann Guede (RHG)**, come disposto nell'incarico peritale del 04.10.2013;
- **Raffaele Sollecito (RS)**, come da richiesta e relativa autorizzazione del Presidente della Corte di Assise di Appello di Firenze, Dott. Alessandro Nencini, datata 25.10.2013 (allegata agli atti della presente perizia);
- **Amanda Marie Knox (AMK)**, come da richiesta e relativa autorizzazione del Presidente della Corte di Assise di Appello di Firenze, Dott. Alessandro Nencini, datata 25.10.2013 (allegata agli atti della presente perizia).

a. Risultati in base al modello biologico

I risultati vengono riportati nella Tabella 5, relativamente a Meredith Susanna Cara Kercher, nella Tabella 6, relativamente a Rudy Hermann Guede, nella Tabella 7, relativamente a Raffaele Sollecito, e nella Tabella 8, relativamente ad Amanda Marie Knox.

Nelle succitate tabelle sono stati evidenziati in **giallo** gli alleli, ad ogni locus, del profilo genetico del soggetto di confronto che vengono riscontrati nel profilo genetico consenso o composito della traccia I.

Onde fornire una informazione quantitativa circa il grado di concordanza o di discordanza tra ciascun profilo genetico di confronto ed i profili genetici consenso e composito della traccia I, per ogni confronto sono stati calcolati:

- il rapporto tra il numero di alleli (escluso il locus Amelogenina) del profilo genetico di ciascun soggetto di confronto riscontrati nel profilo genetico consenso o composito della traccia I (denominato “n° di concordanze” o “n° di alleli concordanti”) ed il numero totale di alleli facenti parte del profilo genetico di confronto⁴;

⁴ Nel calcolo i loci omozigoti dei profili genetici di confronto sono stati computati una sola volta anziché due per rendere omogeneo il confronto fra i risultati.

- il rapporto tra il numero di alleli (escluso il locus Amelogenina) del profilo genetico di ciascun soggetto di confronto non riscontrati nei profili genetici della traccia I (denominato “n° di discordanze” o “n° di alleli discordanti”) ed il numero totale di alleli facenti parte del profilo genetico di confronto⁴.

I risultati ottenuti in termini di % di concordanze sono stati quindi riportati in un istogramma a barre per consentire una visualizzazione grafica più intuitiva (Figura 19).

- **Meredith Susanna Cara Kercher (MSCK)**

Nel caso del confronto con il profilo genetico di Meredith Susanna Cara Kercher (Tabella 5):

- il numero di alleli concordanti (escluso il locus Amelogenina) rispetto al totale degli alleli presenti nel profilo genetico di confronto è pari a:
 - 5/20 (25%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico consenso della traccia I;
 - 10/20 (50%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico composito della traccia I;
- di conseguenza, il numero di alleli discordanti (escluso il locus Amelogenina) rispetto al totale degli alleli presenti nel profilo genetico di confronto è pari a:
 - 15/20 (75%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico consenso della traccia I;
 - 10/20 (circa 50%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico composito della traccia I.

Tabella 5. Risultati di comparazione tra il profilo consenso e composito della traccia I e Meredith Susanna Cara Kercher.

TIPIZZAZIONE DEI POLIMORFISMI STRs AUTOSOMICI DEL DNA NUCLEARE <i>Soggetto di confronto: Meredith Susanna Cara Kercher</i>			
PROFILI GENETICI	<i>Meredith Susanna Cara Kercher (ex Tabella 21 relazione SPS pag. 50 ID 621_47077)</i>	<i>Profilo genetico consenso "Traccia I"</i>	<i>Profilo genetico composito "Traccia I"</i>
Loci STRs			
D10S1248	N.E.	14	13-14-15
vWa	14-16	17	12-16-17
D16S539	10-14	11	10-11
D2S1338	20-23	18-20	18-20
SESSO (Amelogenina)	X-X	X	X
D8S1179	13-16	10-11	10-11-12
D21S11	30-33.2	29-30	28-29-30
D18S51	14-15	13	13-14-17
D22S1045	N.E.	11-17	11-17
D19S433	12-16	13-16.2	13-16-16.2
TH01	6-8	6-8	6-7-8-9
FGA	20-21	22	17-22
D2S441	N.E.	14	10-14
D3S1358	14-18	15-18	14-15-17-18
D1S1656	N.E.	14	12-13-14
D12S391	N.E.	18	17-18
SE33	N.E.	16	16-17
D13S317	8-13	N.E.	N.E.
TPOX	8-11	N.E.	N.E.
D7S820	8-11	N.E.	N.E.
D5S818	11-12	N.E.	N.E.
CSF1PO	12-12	N.E.	N.E.

Note

- N.E.: l'analisi sul locus in esame non è stata effettuata in quanto tale locus non è presente nel sistema di multiplex-PCR impiegato dai periti (AmpFℓSTR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit) oppure nel sistema di multiplex-PCR AmpFℓSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit con cui sono stati analizzati i soggetti di confronto dal SPS.

o Rudy Hermann Guede (RHG)

Nel caso del confronto con il profilo genetico di Rudy Hermann Guede (Tabella 6):

- il numero di alleli concordanti (escluso il locus Amelogenina) rispetto al totale degli alleli presenti nel profilo genetico di confronto è pari a:
 - 4/18 (circa 22%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico consenso della traccia I;
 - 7/18 (circa 39%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico composito della traccia I;
- di conseguenza, il numero di alleli discordanti (escluso il locus Amelogenina) rispetto al totale degli alleli presenti nel profilo genetico di confronto è pari a:
 - 14/18 (circa 78%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico consenso della traccia I;
 - 11/18 (circa 61%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico composito della traccia I.

Tabella 6. Risultati di comparazione tra il profilo consenso e composito della traccia I e Rudy Hermann Guede.

TIPIZZAZIONE DEI POLIMORFISMI STRs AUTOSOMICI DEL DNA NUCLEARE <i>Soggetto di confronto: Rudy Hermann Guede</i>			
PROFILI GENETICI	<i>Rudy Hermann Guede (ex Tabella 58-I relazione SPS pag. 98 ID 563_49037)</i>	<i>Profilo genetico consenso "Traccia I"</i>	<i>Profilo genetico composito "Traccia I"</i>
Loci STRs			
D10S1248	N.E.	14	13-14-15
vWa	18-20	17	12-16-17
D16S539	9-11	11	10-11
D2S1338	16-23	18-20	18-20
SESSO (Amelogenina)	X-Y	X	X
D8S1179	14-14	10-11	10-11-12
D21S11	29-29	29-30	28-29-30
D18S51	14-15	13	13-14-17
D22S1045	N.E.	11-17	11-17
D19S433	13-14.2	13-16.2	13-16-16.2
TH01	7-9	6-8	6-7-8-9
FGA	19-23	22	17-22
D2S441	N.E.	14	10-14
D3S1358	15-16	15-18	14-15-17-18
D1S1656	N.E.	14	12-13-14
D12S391	N.E.	18	17-18
SE33	N.E.	16	16-17
D13S317	11-12	N.E.	N.E.
TPOX	8-9	N.E.	N.E.
D7S820	11-12	N.E.	N.E.
D5S818	12-13	N.E.	N.E.
CSF1PO	7-8	N.E.	N.E.

Note

- N.E.: l'analisi sul locus in esame non è stata effettuata in quanto tale locus non è presente nel sistema di multiplex-PCR impiegato dai periti (AmpFℓSTR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit) oppure nel sistema di multiplex-PCR AmpFℓSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit con cui sono stati analizzati i soggetti di confronto dal SPS.

o **Raffaele Sollecito (RS)**

Nel caso del confronto con il profilo genetico di Raffaele Sollecito (Tabella 7):

- il numero di alleli concordanti (escluso il locus Amelogenina) rispetto al totale degli alleli presenti nel profilo genetico di confronto è pari a:
 - 2/20 (10%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico consenso della traccia I;
 - 6/20 (30%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico composito della traccia I;
- di conseguenza, il numero di alleli discordanti (escluso il locus Amelogenina) rispetto al totale degli alleli presenti nel profilo genetico di confronto è pari a:
 - 18/20 (90%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico consenso della traccia I;
 - 14/20 (70%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico composito della traccia I.

Tabella 7. Risultati di comparazione tra il profilo consenso e composito della traccia I e Raffaele Sollecito.

TIPIZZAZIONE DEI POLIMORFISMI STRs AUTOSOMICI DEL DNA NUCLEARE <i>Soggetto di confronto: Raffaele Sollecito</i>			
PROFILI GENETICI	<i>Raffaele Sollecito (ex Tabella 30-I relazione SPS pag. 63 ID 691_47233)</i>	<i>Profilo genetico consenso "Traccia I"</i>	<i>Profilo genetico composito "Traccia I"</i>
Loci STRs			
D10S1248	N.E.	14	13-14-15
vWa	12-15	17	12-16-17
D16S539	11-14	11	10-11
D2S1338	16-24	18-20	18-20
SESSO (Amelogenina)	X-Y	X	X
D8S1179	13-15	10-11	10-11-12
D21S11	32.2-33.2	29-30	28-29-30
D18S51	16-17	13	13-14-17
D22S1045	N.E.	11-17	11-17
D19S433	13-15.2	13-16.2	13-16-16.2
TH01	9-9.3	6-8	6-7-8-9
FGA	20-21	22	17-22
D2S441	N.E.	14	10-14
D3S1358	16-17	15-18	14-15-17-18
D1S1656	N.E.	14	12-13-14
D12S391	N.E.	18	17-18
SE33	N.E.	16	16-17
D13S317	8-12	N.E.	N.E.
TPOX	8-9	N.E.	N.E.
D7S820	8-11	N.E.	N.E.
D5S818	12-12	N.E.	N.E.
CSF1PO	10-12	N.E.	N.E.

Note

- N.E.: l'analisi sul locus in esame non è stata effettuata in quanto tale locus non è presente nel sistema di multiplex-PCR impiegato dai periti (AmpFℓSTR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit) oppure nel sistema di multiplex-PCR AmpFℓSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit con cui sono stati analizzati i soggetti di confronto dal SPS.

o Amanda Marie Knox (AMK)

Nel caso del confronto con il profilo genetico di Amanda Marie Knox (Tabella 8):

- il numero di alleli concordanti rispetto al totale degli alleli presenti nel profilo genetico di confronto è pari a:
 - 15/18 (circa 83%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico consenso della traccia I;
 - 18/18 (100%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico composito della traccia I;
- di conseguenza, il numero di alleli discordanti (escluso il locus Amelogenina) rispetto al totale degli alleli presenti nel profilo genetico di confronto è pari a:
 - 3/18 (circa 17%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico consenso della traccia I;
 - 0/18 (0%) se il confronto viene effettuato con il profilo genetico composito della traccia I.

Le tre discordanze osservate della traccia I rispetto al profilo genetico di confronto di AMK sono relative all'assenza, nel profilo genetico consenso (ma non nel profilo genetico composito), dell'allele 10 sul locus D16S539, dell'allele 12 sul locus D8S1179 e dell'allele 17 sul locus D18S51; tali alleli non sono stati infatti osservati nella seconda analisi di tipizzazione genetica ma solo nella prima (Figura 20).

Tabella 8. Risultati di comparazione tra il profilo consenso e composito della traccia I e Amanda Marie Knox.

TIPIZZAZIONE DEI POLIMORFISMI STRs AUTOSOMICI DEL DNA NUCLEARE <i>Soggetto di confronto: Amanda Marie Knox</i>			
PROFILI GENETICI	<i>Amanda Marie Knox (ex Tabella 31 relazione SPS pag. 65 ID 692_47234)</i>	<i>Profilo genetico consenso "Traccia I"</i>	<i>Profilo genetico composito "Traccia I"</i>
Loci STRs			
D10S1248	N.E.	14	13-14-15
vWa	17-17	17	12-16-17
D16S539	10-11	11	10-11
D2S1338	18-20	18-20	18-20
SESSO (Amelogenina)	X-X	X	X
D8S1179	11-12	10-11	10-11-12
D21S11	29-30	29-30	28-29-30
D18S51	13-17	13	13-14-17
D22S1045	N.E.	11-17	11-17
D19S433	13-16.2	13-16.2	13-16-16.2
TH01	6-8	6-8	6-7-8-9
FGA	22-22	22	17-22
D2S441	N.E.	14	10-14
D3S1358	15-18	15-18	14-15-17-18
D1S1656	N.E.	14	12-13-14
D12S391	N.E.	18	17-18
SE33	N.E.	16	16-17
D13S317	11-13	N.E.	N.E.
TPOX	8-8	N.E.	N.E.
D7S820	9-9	N.E.	N.E.
D5S818	13-13	N.E.	N.E.
CSF1PO	11-12	N.E.	N.E.

Note

- N.E.: l'analisi sul locus in esame non è stata effettuata in quanto tale locus non è presente nel sistema di multiplex-PCR impiegato dai periti (AmpFℓSTR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit) oppure nel sistema di multiplex-PCR AmpFℓSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit con cui sono stati analizzati i soggetti di confronto dal SPS.

Infine viene riportato, di seguito, un grafico riepilogativo (Figura 19) relativo alle concordanze alleliche osservate per ogni individuo oggetto di comparazione rispetto ai profili genetici della traccia I.

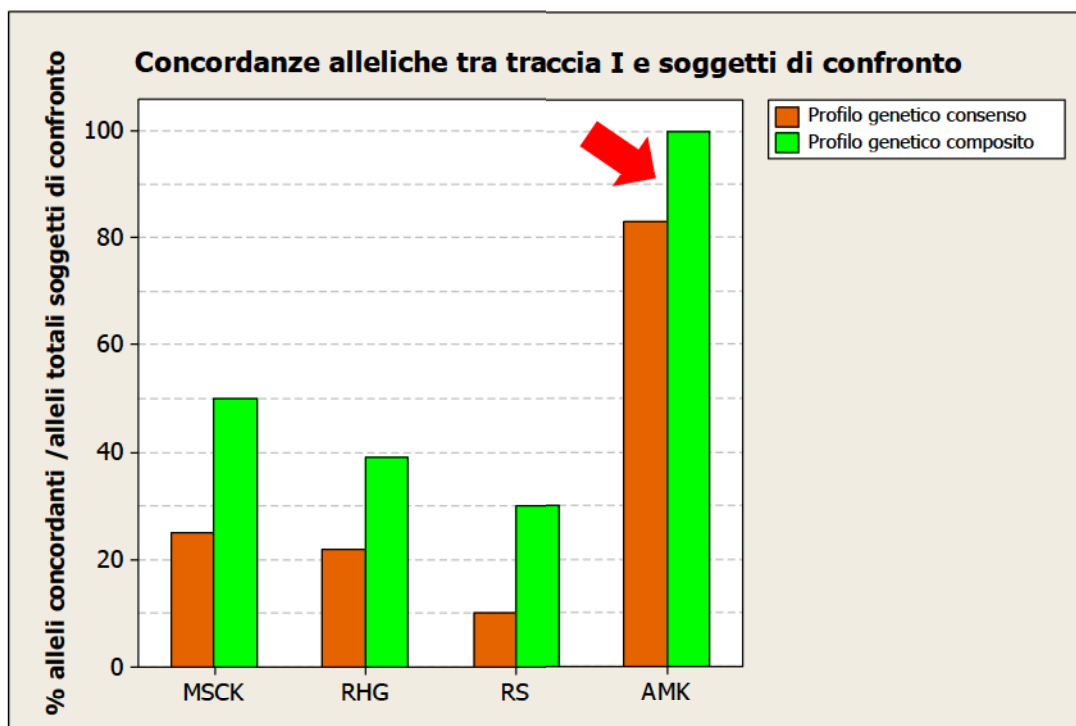
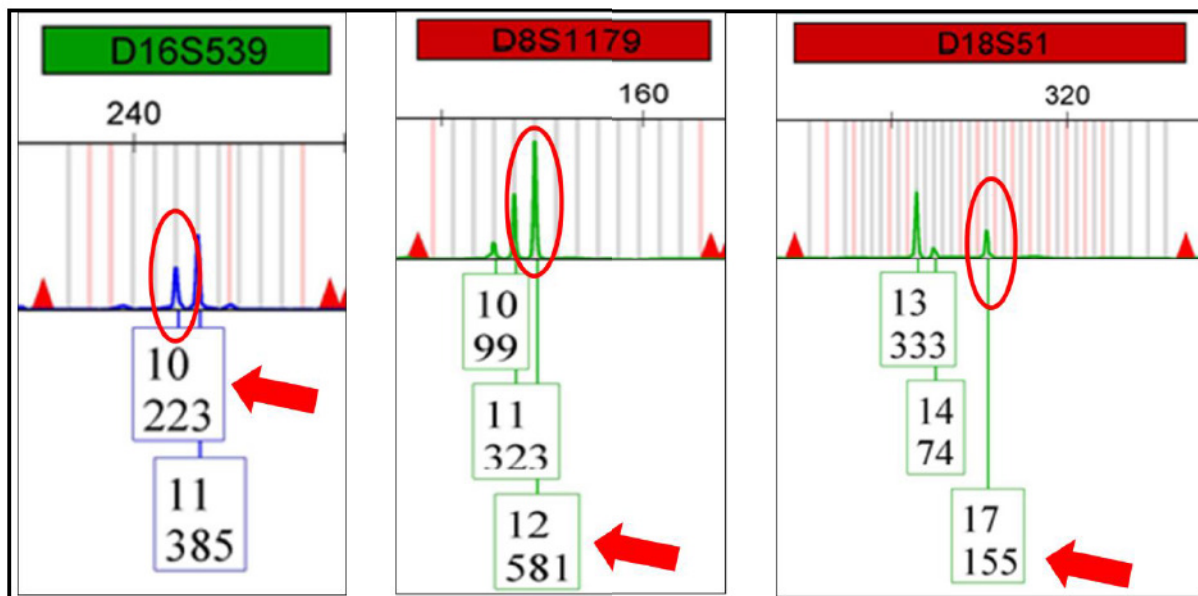
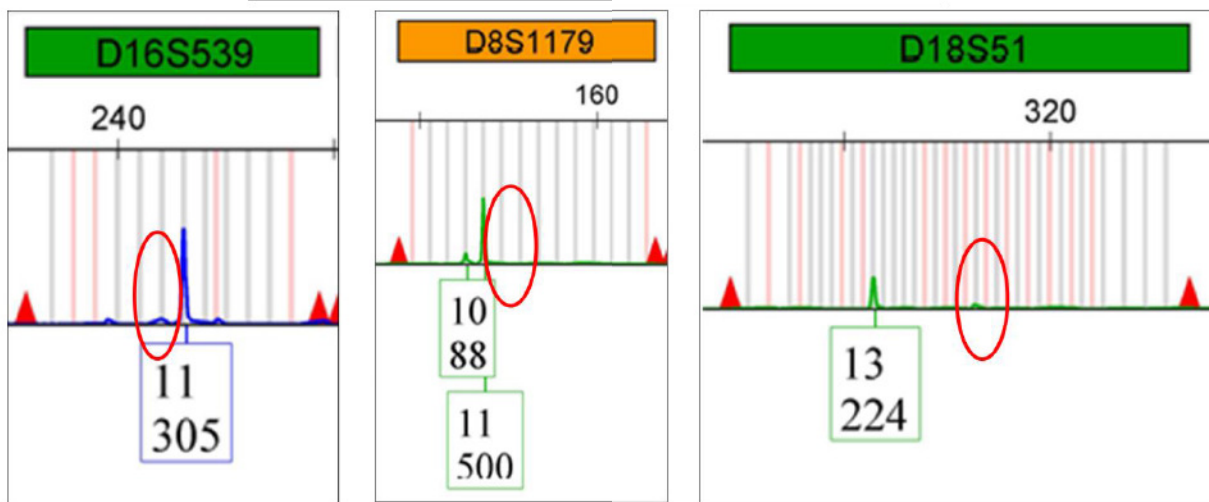


Figura 19. Grafico che riepiloga il numero di concordanze alleliche tra profili genetici consenso e composito della traccia I e profili genetici di confronto (numero di alleli concordanti osservati secondo il modello biologico rispetto al totale degli alleli dei profili genetici dei soggetti di confronto); la freccia rossa evidenzia l'elevatissimo numero di concordanze riscontrate tra profilo genetico di Amanda Marie Knox (AMK) e profili genetici della traccia I.

Prima analisi di tipizzazione



Seconda analisi di tipizzazione



Loci STRs	Profilo genetico di AMK	Profilo genetico consenso "Traccia I"	Profilo genetico composito "Traccia I"
D16S539	10-11	11	10-11
D8S1179	11-12	10-11	10-11-12
D18S51	13-17	13	13-14-17

Figura 20. Assenza, nel profilo genetico consenso (ma non nel profilo genetico composito), dell'allele 10 sul locus D16S539, dell'allele 12 sul locus D8S1179 e dell'allele 17 sul locus D18S51 a causa della mancata conferma dei suddetti alleli nella seconda reazione di tipizzazione genetica.

b. Risultati in base al modello statistico

Data la natura di Low-Template DNA della traccia I ed in aderenza alle raccomandazioni presenti in letteratura scientifica internazionale, anche della ISFG (ad esempio: Gill et al. 2012; Taylor et al., 2013) è stata effettuata, a supporto delle valutazioni espresse mediante il modello biologico di interpretazione, una valutazione probabilistica della possibile inclusione o esclusione dei soggetti di confronto.

L'analisi biostatistica è stata effettuata, come descritto nel paragrafo 3.4.2 punto b., mediante software *LRmix* per il calcolo del valore di LR (rapporto di verosimiglianza) che valuta, in termini quantitativi, la verosimiglianza dell'ipotesi di inclusione, H_p (o di identificazione) rispetto all'ipotesi di esclusione, H_d (o di non identificazione).

Si ricordano i parametri impostati, salvo diversamente indicato, per ciascun soggetto di confronto:

- ✓ Valore della probabilità di drop-out impostato (*Drop-out value*): 0.1 e/o 0.5
- ✓ Valore della probabilità di drop-in impostato (*Drop-in value*): 0.05
- ✓ Valore del coefficiente theta (*Theta value*): 0.01
- ✓ N° di contributori ignote nell'ipotesi H_p (*Unknowns under H_p*): 1
- ✓ N° di contributori ignote nell'ipotesi H_d (*Unknowns under H_d*): 2
- ✓ Ipotesi di identificazione, H_p (*Under H_p*): un soggetto di interesse + 1 soggetto ignoto (*suspect + 1 unknown(s)*);
- ✓ Ipotesi di esclusione, H_d (*Under H_d*): due soggetti ignoti (*2 unknown(s)*).
- ✓ Database popolazionistico: caucasici o afroamericani

I risultati dei valori di LR relativi a ciascun soggetto ed alla traccia I vengono riportati nelle seguenti tabelle (Tabelle 9-14) sia per singolo locus STRs, che per l'intero profilo genetico.

Nel solo caso del confronto con il profilo genetico di AMK si è anche proceduto al calcolo statistico del valore di LR mediante software *DNAVIEW™* v. 29.73 (Brenner, 2011; Brenner, 2006) applicato sia sul profilo genetico consenso (Tabella 15) che sul profilo composito (Tabella 16), onde valutare la concordanza sostanziale dei risultati in termini di supporto all'ipotesi di inclusione o di esclusione. Nei casi di drop-out il software ha attribuito il valore di 1 (neutralità) all'LR di quello specifico locus ed il relativo LR cumulativo (denominato "LR

residuale”) è stato calcolato di fatto escludendo i loci interessati dagli eventi di drop-out. Tale calcolo effettuato secondo un metodo statistico binario estremamente consolidato ha consentito di fornire un ulteriore supporto ai risultati ottenuti con il metodo statistico semi-continuo (*LRmix*).

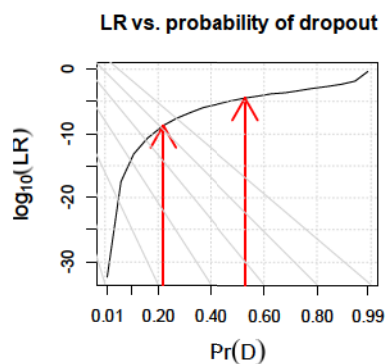
○ MEREDITH SUSANNA CARA KERCHER (MSCK)

LR calcolato con $\Pr(D) = 0.5$, $\Pr(C) = 0.05$

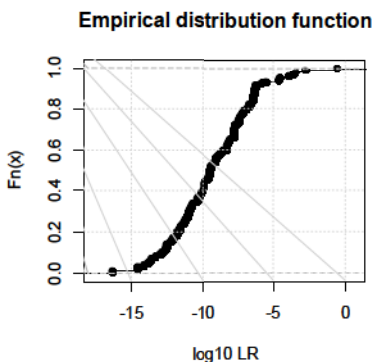
Tabella 9. Valori di LR per singolo locus e per intero profilo genetico della traccia I.

Calcolo LR mediante software LRmix Soggetto: MSCK				
Locus	$\Pr(E H_p)$	$\Pr(E H_d)$	LR	$\log(LR)$
D3S1358	0.0004424	8.438E-05	5.244	0.7196
D19S433	2.851E-05	3.792E-05	0.7519	-0.1239
D2S1338	0.00128	0.001529	0.8375	-0.07702
D16S539	0.004688	0.003726	1.258	0.0998
D18S51	0.0001044	0.0003613	0.2889	-0.5393
TH01	0.0003162	9.875E-05	3.202	0.5055
vWA	4.291E-06	2.546E-05	0.1686	-0.7732
D21S11	0.000239	0.001773	0.1348	-0.8704
D8S1179	1.554E-07	5.443E-05	0.002855	-2.544
FGA	5.415E-06	7.249E-05	0.0747	-1.127
product	2.157E-42	1.158E-37	1.863E-05	-4.73

Sensibilità dell'LR alla probabilità di drop-out, $\Pr(D)$



Test di performance dell'analisi dell'LR



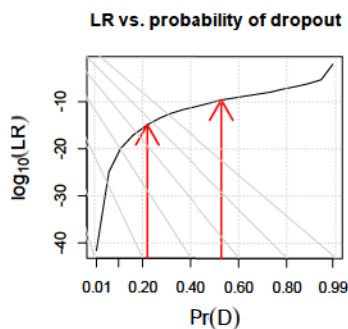
o RUDY HERMANN GUEDE (RHG)

a. LR calcolato con $\Pr(D) = 0.5$, $\Pr(C) = 0.05$, popolazione caucasica

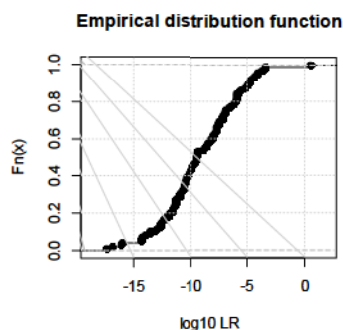
Tabella 10. Valori di LR per singolo locus e per intero profilo genetico della traccia I.

Calcolo LR mediante software LRMix Soggetto: RHG				
Locus	$\Pr(E H_p)$	$\Pr(E H_d)$	LR	$\log(LR)$
D3S1358	2.429E-06	7.46E-05	0.03256	-1.487
D19S433	5.964E-06	3.304E-05	0.1805	-0.7435
D2S1338	7.266E-05	0.001381	0.05261	-1.279
D16S539	0.001601	0.003409	0.4697	-0.3282
D18S51	0.0001044	0.0003613	0.2889	-0.5393
TH01	0.0001932	9.596E-05	2.014	0.304
vWA	1.105E-07	2.449E-05	0.004511	-2.346
D21S11	0.002617	0.001901	1.377	0.1388
D8S1179	1.554E-07	5.443E-05	0.002855	-2.544
FGA	5.415E-06	7.249E-05	0.0747	-1.127
product	8.267E-48	7.387E-38	1.119E-10	-9.951

Sensibilità dell'LR alla probabilità di drop-out, $\Pr(D)$



Test di performance dell'analisi dell'LR

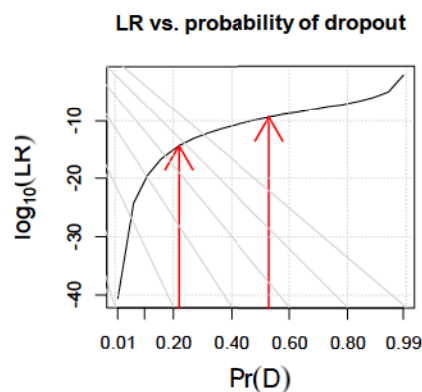


b. LR calcolato con $\Pr(D) = 0.5$, $\Pr(C) = 0.05$, popolazione afro-americana

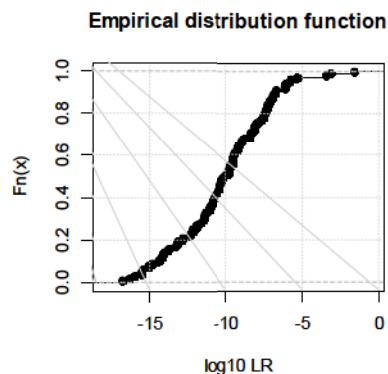
Tabella 11. Valori di LR per singolo locus e per intero profilo genetico della traccia I.

Calcolo LR mediante software LRmix				
Soggetto: RHG				
Locus	$\Pr(E H_p)$	$\Pr(E H_d)$	LR	$\log(LR)$
D3S1358	8.43E-07	3.23E-05	0.02612	-1.583
D19S433	9.05E-07	4.84E-06	0.187	-0.7281
D2S1338	2.95E-05	0.000423	0.06987	-1.156
D16S539	0.003081	0.006889	0.4472	-0.3495
D18S51	4.44E-05	5.34E-05	0.8329	-0.07939
TH01	0.000173	0.000164	1.057	0.02427
vWA	6.38E-08	1.41E-05	0.004537	-2.343
D21S11	0.002836	0.001902	1.491	0.1736
D8S1179	7.46E-08	2.36E-05	0.003156	-2.501
FGA	3.50E-07	5.47E-06	0.06389	-1.195
product	2.52E-51	1.37E-41	1.84E-10	-9.736

Sensibilità dell'LR alla probabilità di drop-out, $\Pr(D)$



Test di performance dell'analisi dell'LR



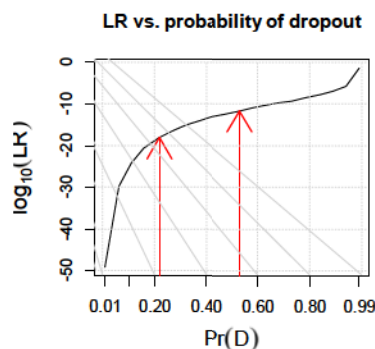
○ RAFFAELE SOLLECITO (RS)

LR calcolato con $\Pr(D) = 0.5$, $\Pr(C) = 0.05$, popolazione afro-americana

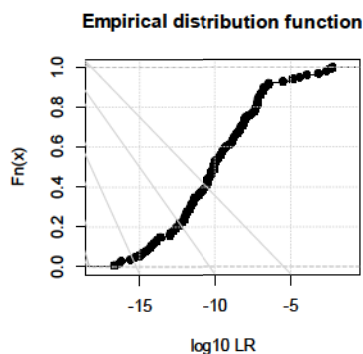
Tabella 12. Valori di LR per singolo locus e per intero profilo genetico della traccia I.

Calcolo LR mediante software LRmix Soggetto: RS				
Locus	$\Pr(E H_p)$	$\Pr(E H_d)$	LR	$\log(LR)$
D3S1358	1.188E-06	7.416E-05	0.01602	-1.795
D19S433	5.964E-06	3.304E-05	0.1805	-0.7435
D2S1338	7.266E-05	0.001381	0.05261	-1.279
D16S539	0.001601	0.003409	0.4697	-0.3282
D18S51	0.0001818	0.0003755	0.4842	-0.3149
TH01	1.832E-06	9.129E-05	0.02007	-1.697
vWA	0.0004548	0.0001233	3.689	0.5669
D21S11	2.778E-06	0.001684	0.001649	-2.783
D8S1179	1.554E-07	5.443E-05	0.002855	-2.544
FGA	5.415E-06	7.249E-05	0.0747	-1.127
product	2.919E-49	3.239E-37	9.011E-13	-12.05

Sensibilità dell'LR alla probabilità di drop-out, $\Pr(D)$



Test di performance dell'analisi dell'LR



o AMANDA MARIE KNOX (AMK)

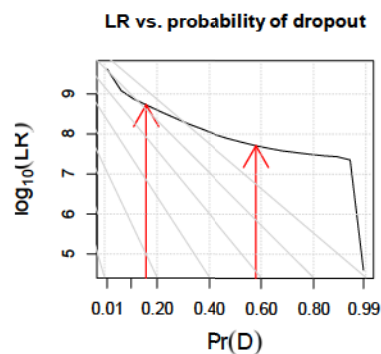
Calcoli effettuati con software LRmix

a. LR calcolato con $\Pr(D) = 0.1$, $\Pr(C) = 0.05$, popolazione caucasica

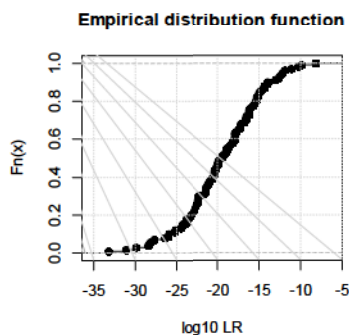
Tabella 13. Valori di LR per singolo locus e per intero profilo genetico della traccia I.

Calcolo LR mediante software LRmix				
Locus	$\Pr(E H_p)$	$\Pr(E H_d)$	LR	$\log(LR)$
D3S1358	0.0002793	0.0001137	2.457	0.3904
D19S433	0.001822	7.537E-05	24.18	1.383
D2S1338	0.04779	0.002445	19.54	1.291
D16S539	0.00866	0.0008117	10.67	1.028
D18S51	0.000443	4.705E-05	9.415	0.9738
TH01	0.0004743	0.0001398	3.393	0.5306
vWA	1.144E-05	4.065E-06	2.815	0.4496
D21S11	0.01021	0.003224	3.168	0.5008
D8S1179	0.001234	7.423E-05	16.62	1.221
FGA	0.0001441	1.019E-05	14.14	1.15
product	9.192E-31	1.109E-39	8.291E+8	8.919

Sensibilità dell'LR alla probabilità di drop-out, $\Pr(D)$



Test di performance dell'analisi dell'LR

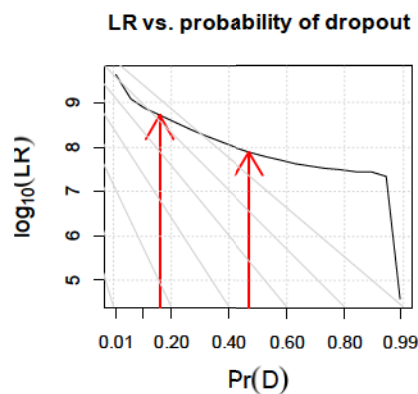


b. LR calcolato con $\Pr(D) = 0.5$, $\Pr(C) = 0.05$, popolazione caucasica

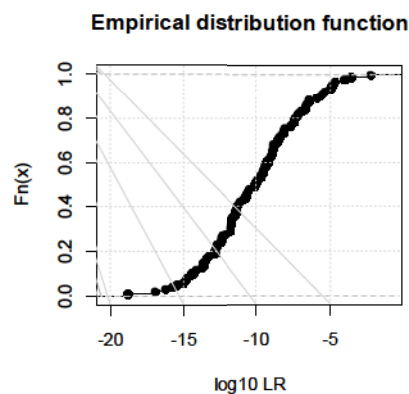
Tabella 14. Valori di LR per singolo locus e per intero profilo genetico della traccia I.

Calcolo LR mediante software LRmix				
Locus	$\Pr(E H_p)$	$\Pr(E H_d)$	LR	$\log(LR)$
D3S1358	0.0001826	7.921E-05	2.305	0.3626
D19S433	0.001102	5.389E-05	20.44	1.311
D2S1338	0.02609	0.001801	14.49	1.161
D16S539	0.03559	0.003964	8.979	0.9532
D18S51	0.003175	0.0004112	7.722	0.8877
TH01	0.0003162	9.875E-05	3.202	0.5055
vWA	4.662E-05	2.757E-05	1.691	0.2282
D21S11	0.005345	0.001886	2.834	0.4524
D8S1179	0.001153	7.399E-05	15.59	1.193
FGA	0.0005492	8.867E-05	6.194	0.792
product	2.96E-29	4.22E-37	7.013E+7	7.846

Sensibilità dell'LR alla probabilità di drop-out, $\Pr(D)$



Test di performance dell'analisi dell'LR



Calcoli effettuati con software DNAVIEW™ v. 29.73

Tabella 15. Valori di LR per singolo locus e cumulativo per intero profilo genetico consenso della traccia I.

MIXTURE ANALYSIS for scenario: 2013-11_AMK_PROFILO CONSENSO TRACCIA I

Matching LR summary for case 2013-11_AMK_PROFILO CONSENSO TRACCIA I

VWA	LR = 17.6	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D16S539	LR = 0	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D2S1338	LR = 24.9	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D8S1179	LR = 0	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D21S11	LR = 5.34	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D18S51	LR = 0	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D19S433	LR = 53	(Cauc; 1, 2 unknowns)
TH01	LR = 9.61	(Cauc; 1, 2 unknowns)
FGA	LR = 40.3	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D3S1358	LR = 6.71	(Cauc; 1, 2 unknowns)

Cumulative LR = 0 (Residual LR = 3.22e8)

Tabella 16. Valori di LR per singolo locus e cumulativo per intero profilo genetico composito della traccia I.

MIXTURE ANALYSIS for scenario: 2013-11_AMK_PROFILO COMPOSITO TRACCIA I

Matching LR summary for 2013-11_AMK_PROFILO COMPOSITO TRACCIA I

VWA	LR = 1.35	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D16S539	LR = 13.6	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D2S1338	LR = 24.9	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D8S1179	LR = 5.69	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D21S11	LR = 2.74	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D18S51	LR = 8.95	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D19S433	LR = 31.7	(Cauc; 1, 2 unknowns)
TH01	LR = 2.83	(Cauc; 1, 2 unknowns)
FGA	LR = 18.7	(Cauc; 1, 2 unknowns)
D3S1358	LR = 1.96	(Cauc; 1, 2 unknowns)

Cumulative LR = 2.11e8

3.5 SINTESI DEI RISULTATI DELLE ANALISI DI QUANTIFICAZIONE E TIPIZZAZIONE DEI POLIMORFISMI STRs DEL DNA NUCLEARE

- a. La procedura di quantificazione tramite real-time PCR del DNA genomico totale contenuto nella traccia I ha consentito di accertare una quantità di DNA genomico umano totale pari a 2.14 pg/μl e, praticamente, una quantità di DNA maschile nulla (<0.1 pg/μl) indicando la presenza di scarsissime quantità di DNA genomico rilevabile, molto probabilmente derivante da uno o più soggetti femminili, e suggerendo una condizione di Low-Template DNA (cioè di materiale genetico al limite delle attuali potenzialità analitiche).
- b. La procedura di tipizzazione genetica dei polimorfismi STRs del DNA condotta in duplicato sulla traccia I ha consentito di ottenere altrettanti profili genetici, in condizioni di LT-DNA (probabili fenomeni stocastici) e di miscela genetica (presenza, in diversi loci STRs, di più di due alleli), e tuttavia in gran parte sovrapponibili tra loro.
- Tali profili genetici sono stati sottoposti ad una valutazione interpretativa ed alla successiva comparazione con i profili genetici dei soggetti di confronto:
- mediante il classico modello biologico (metodo del profilo consenso e metodo del profilo composito sui due profili genetici della traccia I)
 - mediante il modello statistico (valutazione probabilistica del contenuto informativo dei profili genetici della traccia I in relazione all'ipotesi di inclusione o di esclusione di ciascun soggetto di confronto),
risultando, nel complesso, utili per confronti.
- c. La comparazione tra i profili genetici della traccia I ed i profili genetici dei soggetti di confronto e la successiva analisi biostatistica hanno consentito di riscontrare:
- un elevato grado di compatibilità, statisticamente supportato, tra il profilo genetico di Amanda Marie Knox ed i profili genetici della traccia I;
 - un elevato grado di incompatibilità, statisticamente supportato, tra i profili genetici dei restanti soggetti (Meredith Susanna Cara Kercher, Rudy Hermann Guede, Raffaele Sollecito) ed i profili genetici della traccia I.

Le componenti alleliche non attribuibili né ad AMK, né, in maniera omogenea e coerente, a nessuno degli altri soggetti di confronto, appaiono comunque scarsamente rilevanti (in termini qualitativi e quantitativi), ai fini dell'identificazione personale di eventuali ulteriori soggetti.

4. CONSIDERAZIONI E DISCUSSIONI SUGLI ESITI DELLE ATTIVITÀ PERITALI

4.1 STATO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE (TRACCIA) I

Le operazioni peritali poste in essere presso i Laboratori della Prof.ssa Vecchiotti hanno permesso di raccogliere elementi utili circa lo stato di conservazione del campione I, consistente in un volume di estratto di DNA di circa 16-17 µl derivante dalla traccia I.

Al momento delle operazioni peritali, il campione (traccia) I risultava essere conservato in un frigorifero presente, a vista, all'interno del Laboratorio di Genetica Forense che appariva in buone condizioni generali d'uso. Veniva accertata l'assenza, nel frigo-congelatore, di un sistema di registrazione dinamico delle temperature, che, se presente, avrebbe consentito di avere a disposizione dati relativi al corretto mantenimento della temperatura nel tempo. Ciononostante è stato comunque verificato, con idoneo termometro certificato, che la temperatura di conservazione dell'estratto della traccia I risultava, al momento della verifica dei periti, conforme alle prescrizioni raccomandate dalle linee-guida internazionali per questa tipologia di campioni biologici.

Si ritiene, pertanto, che le condizioni di conservazione dell'estratto della traccia I, nonostante non si abbia diretta evidenza di quanto sia avvenuto nel periodo antecedente alle operazioni peritali, siano da considerare ragionevolmente idonee ed adeguate a questa tipologia di campioni biologici.

4.2 ANALISI DI TIPIZZAZIONE GENETICA DELLA TRACCIA I

4.2.1 Discussioni sugli esiti analitici

La quantificazione del DNA genomico totale e maschile amplificabile ha mostrato quantità estremamente esigue di materiale genetico derivante dal contributo di uno o più soggetti femminili che, nel confermare i dati già rilevati dai periti della CAA di Perugia, Proff. Vecchiotti e Conti, hanno portato a ritenere il campione in analisi in condizioni analitiche complesse (Low-Template DNA o Low Copy Number).

La procedura di tipizzazione genetica dei polimorfismi STRs del DNA condotta in duplicato sulla traccia I ha consentito di ottenere altrettanti profili genetici, in condizioni di LT DNA (probabili fenomeni stocastici) e di miscela genetica (presenza, in diversi loci STRs, di più di due alleli), in gran parte sovrapponibili tra loro e, nel complesso, idonei per confronti.

4.2.2 Discussioni sugli esiti delle comparazioni con i soggetti di confronto

Per ogni soggetto la comparazione con gli esiti ottenuti dalla traccia I è stata effettuata applicando il modello biologico ed il modello statistico di interpretazione, precedentemente descritti.

a. Meredith Susanna Cara Kercher (MSCK)

○ Interpretazione dei risultati sulla base del modello biologico classico

L'analisi comparativa tra gli alleli riscontrati nel profilo genetico di confronto di MSCK ed i profili genetici della traccia I ha permesso di evidenziare numerosissime discordanze, sia nel profilo consenso che in quello composito, e l'assenza, sulla quasi totalità dei loci STRs del profilo genetico della traccia I, di un assetto genotipico coerente con gli alleli del profilo genetico di MSCK. Tali evidenze forniscono un rilevante supporto all'ipotesi di esclusione di Meredith Susanna Cara Kercher come contributore della traccia I.

○ Interpretazione dei risultati sulla base del modello statistico

Tale modello, applicato mediante software di calcolo *LRmix*, impostando un valore della probabilità di drop-out, $Pr(D)$, pari a 0.5, ha consentito di fornire un peso quantitativo all'ipotesi che il profilo genetico di MSCK potesse essere riscontrato nei profili genetici della traccia I.

L'analisi statistica condotta sugli alleli riscontrati nel profilo genetico di confronto di MSCK e sui profili genetici della traccia I ha permesso di ottenere un valore di LR calcolato pari a circa 1.8×10^{-5} . Tale valore, unitamente ai risultati ottenuti dai test di sensibilità (LR vs $Pr(D)$) e di robustezza, porta ad escludere, con un supporto probabilistico estremamente

forte, che Meredith Susanna Cara Kercher possa aver contribuito, con proprio materiale biologico, alla traccia I, confermando in tal modo la valutazione espressa applicando il modello biologico.

○ **Esito conclusivo**

La valutazione complessiva delle risultanze interpretative poste in essere consente di escludere l'ipotesi che materiale genetico di Meredith Susanna Cara Kercher sia presente nella traccia I e che, quindi, Meredith Susanna Cara Kercher possa aver contribuito, con proprio materiale biologico, alla traccia I.

b. Rudy Hermann Guede (RHG)

○ **Interpretazione dei risultati sulla base del modello biologico classico**

L'analisi comparativa tra gli alleli riscontrati nel profilo genetico di confronto di RHG ed i profili genetici della traccia I ha permesso di evidenziare numerosissime discordanze, sia nel profilo consenso che in quello composito, e l'assenza, sulla quasi totalità dei loci STRs del profilo genetico della traccia I, di un assetto genotipico coerente con gli alleli del profilo genetico di RHG. Tali evidenze forniscono un rilevante supporto all'ipotesi di esclusione di Rudy Hermann Guede come contributore della traccia I.

○ **Interpretazione dei risultati sulla base del modello statistico**

Tale modello, applicato mediante software di calcolo *LRmix*, impostando una valore della probabilità di drop-out, $Pr(D)$, pari a 0.5, ha consentito di fornire un peso quantitativo all'ipotesi che il profilo genetico di RHG potesse essere riscontrato nei profili genetici della traccia I.

L'analisi statistica condotta sugli alleli riscontrati nel profilo genetico di confronto di RHG e sui profili genetici della traccia I ha permesso di ottenere valori di LR calcolati pari a circa 1.1×10^{-10} (con database popolazionistico caucasico) e 1.8×10^{-10} (con database

popolazionistico afro-americano). Tali valori, unitamente ai risultati ottenuti dai rispettivi test di sensibilità (LR vs Pr(D)) e di robustezza, portano ad escludere, con un supporto probabilistico estremamente forte, che Rudy Hermann Guede possa aver contribuito, con proprio materiale biologico, alla traccia I, confermando in tal modo la valutazione espressa applicando il modello biologico.

○ **Esito conclusivo**

La valutazione complessiva delle risultanze interpretative poste in essere consente di escludere l'ipotesi che materiale genetico di Rudy Hermann Guede sia presente nella traccia I e che, quindi, Rudy Hermann Guede possa aver contribuito, con proprio materiale biologico, alla traccia I.

c. Raffaele Sollecito (RS)

○ **Interpretazione dei risultati sulla base del modello biologico classico**

L'analisi comparativa tra gli alleli riscontrati nel profilo genetico di confronto di RS ed i profili genetici della traccia I ha permesso di evidenziare numerosissime discordanze, sia nel profilo consenso che in quello composito, e l'assenza, sulla quasi totalità dei loci STRs del profilo genetico della traccia I, di un assetto genotipico coerente con gli alleli del profilo genetico di RS. Tali evidenze forniscono un rilevante supporto all'ipotesi di esclusione di Raffaele Sollecito come contributore della traccia I.

○ **Interpretazione dei risultati sulla base del modello statistico**

Tale modello, applicato mediante software di calcolo *LRmix*, impostando una valore della probabilità di drop-out, Pr(D), pari a 0.5, ha consentito di fornire un peso quantitativo all'ipotesi che il profilo genetico di RS potesse essere riscontrato nei profili genetici della traccia I.

L'analisi statistica condotta sugli alleli riscontrati nel profilo genetico di confronto di RS e sui profili genetici della traccia I ha permesso di ottenere un valore di LR calcolato pari a circa 9×10^{-13} . Tale valore, unitamente ai risultati ottenuti dai test di sensibilità (LR vs Pr(D)) e di robustezza, porta ad escludere, con un supporto probabilistico estremamente forte, che Raffaele Sollecito possa aver contribuito, con proprio materiale biologico, alla traccia I, confermando in tal modo la valutazione espressa applicando il modello biologico.

○ **Esito conclusivo**

La valutazione complessiva delle risultanze interpretative poste in essere consente di escludere l'ipotesi che materiale genetico di Raffaele Sollecito sia presente nella traccia I e che, quindi, Raffaele Sollecito possa aver contribuito, con proprio materiale biologico, alla traccia I.

d. Amanda Marie Knox (AMK)

○ **Interpretazione dei risultati sulla base del modello biologico classico**

L'analisi comparativa tra gli alleli riscontrati nel profilo genetico di confronto di AMK ed i profili genetici della traccia I ha permesso di evidenziare numerose concordanze. Infatti, con l'eccezione di tre soli alleli (allele 10 sul locus D16S539, allele 12 sul locus D8S1179 ed allele 17 sul locus D18S51) di AMK non osservati in una delle due repliche di tipizzazione della traccia I si riscontra una piena concordanza tra gli alleli del profilo genetico di AMK e gli alleli del profilo genetico consenso e composito della traccia I.

Premesso che:

- la traccia I appare in condizioni di LT DNA e, quindi, interessata da probabili fenomeni stocastici (principalmente fenomeni di drop-in e di drop-out) e, pertanto da valutare con estrema cautela, in accordo con le linee-guida internazionali (Gill et al. 2006);

- la Raccomandazione 9 delle linee-guida ISFG sull'interpretazione delle miscele genetiche (Gill et al. 2006) suggerisce che nei casi di tracce LT DNA gli eventi di drop-out e di drop-in dovrebbero essere sempre tenuti in considerazione e valutati (*"In relation to low copy number [omissis]. In addition allelic drop-out and allelic drop-in (contamination) should be taken into consideration of any assessment"*);
- le tre discordanze riscontrate (tre alleli non riscontrati in maniera riproducibile nei profili genetici della traccia I) sui loci D16S539, D8S1179, D18S51 (Figura 20) che emergono applicando il metodo consenso possono essere ragionevolmente dovute ad altrettanti eventi di drop-out allelico su una delle due reazioni di amplificazione;
- le discordanze riscontrate sui loci D16S539, D8S1179, D18S51, da ritenersi verosimilmente eventi di perdita allelica (drop-out), sono state comunque sottoposte a valutazione biostatistica con il metodo probabilistico di interpretazione già descritto (paragrafo 3.4.2 punto b.), in accordo alle più recenti linee-guida ISFG (Gill et al. 2012), ed i cui risultati vengono discussi nel paragrafo successivo;
- il metodo composito comunque fornisce riscontro della presenza dei tre suddetti alleli (allele 10 sul locus D16S539, allele 12 sul locus D8S1179 ed allele 17 sul locus D18S51);

tali evidenze indicano, con ragionevole certezza, che il profilo genetico di Amanda Marie Knox risulti presente, in maniera consolidata, nella traccia I e che, quindi, Amanda Marie Knox abbia contribuito, con propri fluidi biologici, alla traccia I.

Le restanti componenti alleliche presenti in più loci STRs, non attribuibili ad AMK, tali da suggerire una condizione di miscela genetica, potrebbero essersi originate da un limitato contributo di un secondo soggetto e/o da fenomeni di drop-in. Tali segnali allelici risultano, nel complesso, qualitativamente e quantitativamente inadeguati all'identificazione personale di un ulteriore individuo e comunque non trovano omogenea corrispondenza con nessuno dei profili genetici degli altri soggetti di confronto (MSCK, RHG, RS).

○ Interpretazione dei risultati sulla base del modello statistico

Tale modello, applicato mediante software di calcolo *LRmix*, impostando due differenti valori della probabilità di drop-out, $Pr(D)$, pari a 0.1 ed a 0.5 ha consentito di fornire un

peso quantitativo all'ipotesi che il profilo genetico di AMK potesse essere riscontrato nei profili genetici della traccia I.

L'analisi statistica condotta sugli alleli osservati nel profilo genetico di confronto di AMK e sui profili genetici della traccia I ha permesso di ottenere valori di LR calcolati pari a circa 8.3×10^8 (con $\text{Pr}(D) = 0.1$) e 7×10^7 (con $\text{Pr}(D) = 0.5$). Tali valori, unitamente ai risultati ottenuti dai rispettivi test di sensibilità (LR vs $\text{Pr}(D)$) e di robustezza, portano ad concludere, con un supporto probabilistico estremamente forte, che Amanda Marie Knox abbia contribuito, con proprio materiale biologico, alla traccia I, confermando in tal modo la valutazione espressa applicando il modello biologico.

Analoghi risultati sono stati ottenuti con il software *DNAVIEW™* v. 29.73, basato su un metodo statistico binario, applicato sia sul profilo consenso che sul profilo composito. Quando il confronto è stato effettuato tra AMK ed il profilo consenso della traccia I il valore di LR è stato pari a circa 3.2×10^8 (LR residuale, attribuendo il valore di 1 ai loci interassati da eventi di drop-out, D16S539, D8S1179, D18S51); quando invece il confronto è stato effettuato tra AMK ed il profilo composito della traccia I il valore di LR è stato pari a circa 2×10^8 . Tali valori di LR ottenuti con metodo binario forniscono un supporto estremamente forte all'ipotesi che Amanda Marie Knox abbia contribuito, con proprio materiale biologico, alla traccia I, confermando in tal modo la valutazione espressa applicando il modello biologico.

L'inclusione di Amanda Marie Knox nei profili genetici della traccia I è pertanto supportata, in maniera estremamente significativa, da entrambi i metodi statistici.

○ **Esito conclusivo**

La valutazione complessiva delle risultanze interpretative poste in essere consente di supportare in maniera estremamente significativa l'ipotesi che materiale genetico di Amanda Marie Knox sia presente nella traccia I e che, quindi, Amanda Marie Knox abbia contribuito, con proprio materiale biologico, alla traccia I.

5. RISPOSTA AL QUESITO POSTO DALL'ILL.MO PRESIDENTE DELLA CORTE DI ASSISE DI APPELLO DI FIRENZE

Alla luce delle analisi condotte e delle valutazioni estesamente espresse nella presente relazione è possibile rispondere ai quesiti posti ai periti nel modo seguente:

- 1. Il campione I derivante dalla traccia I prelevata sul Rep. 36 (coltello) dai periti della Corte di Assise di Appello di Perugia, Proff. Carla Vecchiotti e Stefano Conti, è stato rinvenuto all'interno di un frigo-congelatore presente nel Laboratorio di Genetica Forense del Dipartimento di Medicina Legale e delle Assicurazioni dell'Università di Roma La Sapienza.*
- 2. Le condizioni accertate di conservazione del campione I, nonostante non si abbia diretta evidenza di quanto sia avvenuto nel periodo antecedente alle operazioni peritali, sono da considerarsi conformi a quanto previsto per questa tipologia di campioni biologici (estratti di DNA).*
- 3. Le analisi genetiche condotte sul campione I hanno dimostrato la presenza di una quantità estremamente esigua di materiale genetico derivante dal contributo di uno o più soggetti femminili che ha portato a ritenere il campione in analisi in condizioni analitiche complesse (Low-Template DNA o Low Copy Number).*
- 4. La procedura di tipizzazione genetica condotta in duplicato sul campione I ha consentito di ottenere altrettanti profili genetici, in condizioni di LT DNA (probabili fenomeni stocastici) e di miscela genetica (presenza, in diversi loci STRs, di più di due alleli), in gran parte sovrapponibili tra loro e, nel complesso, idonei per confronti.*
- 5. Per ogni soggetto indicato nell'incarico peritale è stata effettuata la comparazione con gli esiti ottenuti dal campione I applicando il modello biologico ed il modello statistico di interpretazione, in accordo a quanto previsto dai protocolli interpretativi più rigorosi ed aggiornati tratti dalla letteratura scientifica internazionale.*
- 6. L'esito di tale comparazione ha permesso di escludere l'ipotesi che materiale genetico di Meredith Susanna Cara Kercher, Rudy Hermann Guede e Raffaele Sollecito sia presente*

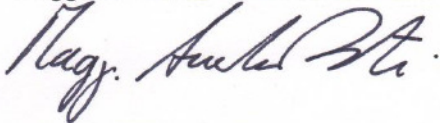
nella traccia I e che, quindi, tali soggetti possano aver contribuito, con proprio materiale biologico, alla traccia I.

7. *Altresì la valutazione complessiva delle risultanze interpretative poste in essere consente di supportare in maniera estremamente significativa l'ipotesi che materiale genetico di Amanda Marie Knox sia presente nella traccia I, e che, quindi, Amanda Marie Knox abbia contribuito, con proprio materiale biologico, alla traccia I.*

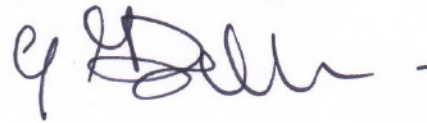
Roma, li 31.10.2013

I periti

Magg. CC inv. sc. Dott. Andrea Berti



Cap. CC inv. sc. Dott. Filippo Barni



6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- A new methodological framework to interpret complex DNA profiles using likelihood ratios. Gill P, Haned H. *Forensic Sci Int Genet.* 2013 Feb;7(2):251-63.
- A new methodological framework to interpret complex DNA profiles using likelihood ratios. Gill P, Haned H. *Forensic Sci Int Genet.* 2013 Feb;7(2):251-63.
- A universal strategy to interpret DNA profiles that does not require a definition of low-copy-number. Gill P, Buckleton J. *Forensic Sci Int Genet.* 2010 Jul;4(4):221-7.
- Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. 1st edition Butler J.M. (2011) ©elsevier Academic Press, London, UK.
- Allele frequencies of the new European Standard Set (ESS) loci in the Italian population. Berti A, Brisighelli F, Bosetti A, Pilli e, Trapani C, Tullio V, Franchi C, Lago G, Capelli C. *Forensic Sci Int Genet.* 2011 Nov;5(5):548-9.
- AmpF Φ STR® NGM Select™ PCR Amplification Kit User Guide Rev. E 03/2012. Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.
- An investigation of the robustness of the consensus method of interpreting low-template DNA profiles. Cowen S, Debenham P, Dixon A, Kutranov S, Thomson J, Way K. *Forensic Sci Int Genet.* 2011 Nov;5(5):400-6.
- Analysis of complex DNA mixtures using the Forensim package. H Haned, P Gill. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 2011 Dec;3(1):e79–e80.
- Applied Biosystems 3500/3500xl Genetic Analyzer User Guide Rev. C 06/2010. Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.
- Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler User Guide Rev. E 06/2010. Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.
- Assessment of mock cases involving complex low template DNA mixtures: A descriptive study. Benschop CC, Haned H, de Blaeij TJ, Meulenbroek AJ, Sijen T. *Forensic Sci Int Genet.* 2012 Dec;6(6):697-707.
- Comparison of different interpretation strategies for low template DNA mixtures. Pfeifer CM, Klein-Unseld R, Klintschar M, Wiegand P. *Forensic Sci Int Genet.* 2012 Dec;6(6):716-22.
- Composite profiles in DNA analysis. Bright JA, Gill P, Buckleton J. *Forensic Sci Int Genet.* 2012 May;6(3):317-21.
- Consensus and pool profiles to assist in the analysis and interpretation of complex low template DNA mixtures. Benschop C, Haned H, Sijen T. *Int J Legal Med.* 2013 Jan;127(1):11-23.
- Developmental validation of the AmpF Φ STR® NGM Select™ PCR Amplification Kit: A next-generation STR multiplex with the SE33 locus. Green RL, Lagacé RE, Oldroyd NJ, Hennessy LK, Mulero JJ. *Forensic Sci Int Genet.* 2013 Jan;7(1):41-51.

- DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Schneider PM, Weir BS. *Forensic Sci Int.* 2006 Jul 13;160(2-3):90-101.
- DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. Gill P, Gusmão L, Haned H, Mayr WR, Morling N, Parson W, Prieto L, Prinz M, Schneider H, Schneider PM, Weir BS. *Forensic Sci Int Genet.* 2012 Dec;6(6):679-88.
- DNA reviews: low level DNA profiling. Graham EA. *Forensic Sci Med Pathol.* 2008;4(2):129-31.
- DNAVIEW™ 29.73 DNA Identification Analysis Programs User's Manual, 2011. Brenner CH.
- DNAVIEW™ 29.73 DNA Identification Analysis Programs, 2011. Brenner CH.
- European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers. Welch LA, Gill P, Phillips C, Ansell R, Morling N, Parson W, Palo JU, Bastisch I. *Forensic Sci Int Genet.* 2012 Dec;6(6):819-26.
- Exploratory data analysis for the interpretation of low template DNA mixtures. Haned H, Slooten K, Gill P. *Forensic Sci Int Genet.* 2012 Dec;6(6):762-74.
- Federal Bureau of Investigations, USA. (2010). SWGDAM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories. <http://www.fbi.gov/about-us/lab/codis/swgdam-interpretation-guidelines>.
- Forensic DNA Evidence Interpretation. Buckleton JS, Triggs CM, Walsh SJ. (2005). CRC Press. Boca Ranton, FL, USA.
- Forensic Genetics: Mathematics. Encyclopedia of Life Sciences. Brenner CH. 2006. John Wiley & Sons, Ltd.
- Forensim: an open-source initiative for the evaluation of statistical methods in forensic genetics. Haned H. *Forensic Sci Int Genet.* 2011 Aug;5(4):265-8.
- Fundamentals of Forensic DNA Typing. 1st edition. Butler J.M. (2010) ©elsevier Academic Press, London, UK.
- GeneMapper® ID-X Software Version 1.4 User Bulletin Rev. B 12/2012. Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.
- Interpretation guidelines for multilocus STR forensic profiles from low template DNA samples. Budimlija ZM, Caragine TA. *Methods Mol Biol.* 2012;830:199-211.
- Interpretation of complex DNA profiles using empirical models and a method to measure their robustness. Gill P, Curran J, Neumann C, Kirkham A, Clayton T, Whitaker J, Lambert J. *Forensic Sci Int Genet.* 2008 Mar;2(2):91-103.
- Interpretation of DNA mixtures--european consensus on principles. Morling N, Bastisch I, Gill P, Schneider PM. *Forensic Sci Int Genet.* 2007 Dec;1(3-4):291-2.
- Interpretation of repeat measurement DNA evidence allowing for multiple contributors and population substructure. Curran JM, Gill P, Bill MR. *Forensic Sci Int.* 2005 Feb 10;148(1):47-53.

- Investigator® Quantiplex Kit: For reliable quantification of human DNA in forensic samples. Di Pasquale F, Cornelius S, König M, Scherer M, Schmid C, Dienemann C, Bochmann L, Prochnow A, Schnibbe T, Engel H. Forensic Science International Genetics Supplement Series. 2011; 3(1):e413-e414.
- Investigator Quantiplex HYres Kit Validation Report 11/2012. Qiagen, Hilden, Germany.
- Investigator® Quantiplex HYres Handbook. 08/2012. Qiagen, Hilden, Germany.
- Linee guida metodologico-accertative criteriologico-valutative. Indagini generico-forensi di paternità e identificazione personale. Tagliabracci A, Domenici R, Pascali V, 2007. Piccin-Nuova Libreria.
- LoComaTionN: a software tool for the analysis of low copy number DNA profiles. Gill P, Kirkham A, Curran J. Forensic Sci Int. 2007 Mar 2;166(2-3):128-38.
- Low template STR typing: effect of replicate number and consensus method on genotyping reliability and DNA database search results. Benschop CC, van der Beek CP, Meiland HC, van Gorp AG, Westen AA, Sijen T. Forensic Sci Int Genet. 2011 Aug;5(4):316-28.
- Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework. Budowle B, Onorato AJ, Callaghan TF, Della Manna A, Gross AM, Guerrieri RA, Luttman JC, McClure DL. J Forensic Sci. 2009 Jul;54(4):810-21.
- National Research Council (NRC-II). The evaluation of Forensic DNA evidence. 1996. National Academy Press, Washington, DC, USA,
- NGM Select™ vs PowerPlex® ESI 17: Results with challenging DNA samples. Andrade L, et al. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2011;3(1):e123-e124.
- NGM-SElect: An improvement to NGM kit in determining genetic profiles of low level DNA samples. Lopes V, et al. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2011;3(1):e121-e122.
- Qiagen's Investigator™ Quantiplex Kit as a Predictor of STR Amplification Success from Low-Yield DNA Samples. Thomas JT, Berlin RM, Barker JM, Dawson Cruz T. J Forensic Sci. 2013 Sep;58(5):1306-9.
- Recent advances in the application of CE to forensic sciences, an update over years 2009-2011. Pascali JP, Bortolotti F, Tagliaro F. electrophoresis. 2012 Jan;33(1):117-26
- Review of low template DNA typing. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2009; 2(1):549-550.
- Rotor-Gene® Q User Manual. 11/2012. Qiagen, Hilden, Germany.
- Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase, Butler JM. National Institute of Standards and Technology, USA <http://www.cstl.nist.gov/strbase/>
- Source Attribution of a Forensic DNA Profile. Budowle B, Chakraborty R, Carmody G, Monson KL. Forensic Science Communications. 2000;2(3). <http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2000/source.htm>.
- Standards for the formulation of evaluative forensic science expert opinion. Association of Forensic Science Providers. Sci Justice. 2009 Sep;49(3):161-4.
- Statistics and the Evaluation of Evidence for Forensic Scientists. Aitken CGG, Taroni F. 2004. John Wiley & Sons, Ltd. Hoboken, NJ, USA.

- The Biological evidence Preservation Handbook: Best Practices for evidence Handlers. 04/2013. National Institute of Standards and Technology and the National Institute of Justice. Washington, DC, USA.
- The interpretation of DNA evidence. Gill P, Guinness J, Iveson S. 2012. Forensic Science Regulator - Home Office - London, UK.
- The interpretation of single source and mixed DNA profiles. Taylor D, Bright JA, Buckleton J. Forensic Sci Int Genet. 2013 Sep;7(5):516-28.
- Validation of AmpF/STR NGM Select™ PCR amplification kit on forensic samples. A. Barbaro, P. Cormaci, A. Agostino. Forensic Science International: Genetics Supplement Series;2011 3 (1): e67-e68.
- Validation of testing and interpretation protocols for low template DNA samples using AmpFISTR Identifiler. Caragine T, Mikulasovich R, Tamariz J, Bajda e, Sebestyen J, Baum H, Prinz M. Croat Med J. 2009 Jun;50(3):250-67.
- Validation of the NGM Select™ kit. C. Gehrig, S. Vuichard, A. Teyssier, V. Castella. Forensic Science International: Genetics Supplement Series;2011 3 (1): e453-e454.
- Validation issues around DNA typing of low level DNA. Buckleton J. Forensic Sci Int Genet. 2009 Sep;3(4):255-60.
- Validity of low copy number typing and applications to forensic science. Budowle B, Eisenberg AJ, van Daal A. Croat Med J. 2009 Jun;50(3):207-17.