

CONSIDERAZIONI TECNICHE
SULLA PERIZIA RELATIVA AL
PP 11/13
CORTE DI ASSISE DI FIRENZE

Dr.ssa FRANCESCA TORRICELLI

Direttore SOD Diagnostica Genetica

Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi – Firenze

mail: torricellif@aou-careggi.toscana.it

tel. 055.7949678

In riferimento alla perizia depositata presso la Corte di Appello di Firenze inerente il procedimento penale n. 11/13 della Corte di Assise di Firenze, riferisco sugli accertamenti tecnico-biologici di laboratorio svolti dal Magg. CC inv. Sc. Dott. Andrea Berti e dal Cap. CC inv.sc. dott. Filippo Barni.

La perizia era volta all'extrapolazione degli eventuali profili genetici contenuti nella TRACCIA I repertata dalla Prof.ssa Vecchiotti e Prof. Conti "nel punto di contatto tra la lama e l'impugnatura sui versanti opposti del coltello".

- Nella perizia dei Prof. Vecchiotti e Conti si dedicava ampio spazio alla catena di custodia di un reperto forense e relativa gestione. Appare ovvio che, nonostante l'ampia disamina, i suddetti protocolli non siano stati messi in atto per la conservazione del reperto I, trovandosi questo in un congelatore, del quale nulla si è potuto accertare circa lo stato di funzionamento dal momento in cui il suddetto campione vi sia stato deposto e la data del 10 ottobre 2013, giorno in cui questo è stato acquisito dai periti del RIS. L'accesso al congelatore e relativo cassetto, in cui il campione era contenuto, non era sottoposto ad alcun controllo o accesso controllato atto a garantire una corretta catena di custodia. La provetta inoltre era contrassegnata dalla sola lettera I, senza alcuna altra indicazione riguardo al caso o al procedimento penale.
- Nonostante tanta imperizia, lo stato di conservazione della Traccia I al momento della sua acquisizione da parte dei periti - effettuata presso il laboratorio di Genetica Forense dell'Università "la Sapienza" in Roma - appariva idoneo alla preservazione del DNA. La prolissa disquisizione dei Prof. Vecchiotti e Conti appare quindi, alla luce dei fatti, superflua e ancor più screditante l'operato della dott.ssa Stefanoni.
- Si prendeva atto dell'incongruenza tra il volume di DNA atteso nella provetta -24 µl- e l'effettivo volume riscontrato dai periti, pari a $16,33 \pm 0,58$ µl. Tale incongruenza, molto significativa in quanto mancava circa 1/3 del campione, non ha permesso di effettuare una terza replica dell'estratto, che avrebbe consentito l'extrapolazione di un più affidabile profilo consenso, come suggerito da Carragine et al. (2009).

- Il protocollo analitico proposto e applicato dai periti per l'analisi della traccia I utilizza le più moderne e accurate tecnologie applicabili in ambito forense e segue criteri metodologico-valutativi condivisi nella comunità scientifica. In particolare:
- La quantificazione del DNA presente nell'estratto I è stata effettuata mediante Real Time PCR con PCR Investigator Quantiplex HYres Kit su Rotor-Gene Q 5plex, che a oggi risulta essere il metodo più sensibile per la rilevazione del DNA, con un limite di *detection* fino a 1 pg/μl. La quantificazione del DNA relativo alla traccia I è risultato essere 2,14 pg/μl. La curva standard generata dallo strumento per questa reazione è risultata perfettamente in linea con l'atteso, confermando l'attendibilità del dato ottenuto. Si concorda con i periti laddove è stato deciso di effettuare una sola reazione di quantificazione in quanto, data l'esiguità del volume del campione, si sarebbe ulteriormente ridotta la quantità di DNA da destinare alla successiva amplificazione del DNA. In casi in cui la quantità di DNA atteso dalla traccia è estremamente esiguo, deve essere quindi tenuto presente il fine ultimo dell'accertamento che è quello della definizione del profilo genetico del donatore/i della traccia. Tale approccio conservativo è stato applicato anche dalla Dott.ssa Stefanoni nell'analisi della traccia B sulla lama del coltello. Le linee guida Metodologiche-Accertative-Criteriologiche-Valutative della Società Italiana Medici Legali e delle Assicurazioni e Genetisti Forensi (di cui la Prof.ssa Carla Vecchiotti è revisore) indicano che il DNA deve essere quantificato "*...se il materiale è sufficiente e non pregiudica le ulteriori analisi.....*". La quantificazione può rappresentare quindi uno step analitico utile, ma non imprescindibile all'ottenimento di un profilo genetico attendibile. Del resto, il sistema di amplificazione utilizzato a tale scopo è specie-specifico, per cui il risultato positivo si ottiene solo in presenza di DNA umano.
- Il kit utilizzato per l'amplificazione della traccia I, AmpFLSTR® NGM Select™ PCR Amplification Kit, è uno dei sistemi più sensibili a oggi disponibili per la rilevazione di profili allelici umani, soprattutto in condizioni di LT-DNA (low-template DNA), quali si è evinto trovarsi. Le componenti del kit sono state infatti recentemente rielaborate e migliorate dalla casa produttrice rispetto ad AmpFLSTR® Identifier™ PCR Amplification Kit, utilizzato nelle precedenti analisi effettuate dalla Dott.ssa Stefanoni. C'è da sottolineare che all'epoca delle analisi del Servizio di Polizia Scientifica di Stato, Identifier rappresentava il *gold standard* per analisi in ambito forense e NGM Amplification kit non era ancora presente in commercio. I periti hanno quindi avuto a disposizione per le analisi, grazie

all'epoca in cui essi si trovano a effettuare gli accertamenti, kit di ultima generazione decisamente più sensibili rispetto a quelli in commercio nel 2008.

- La scelta del protocollo analitico, per quanto condivisibile, non ha consentito ai periti di effettuare valutazioni sulla totalità del profilo ottenuto, giacchè i due kit presentano solamente 10 su 16 loci in comune. Si perde pertanto l'informatività per ben 6 loci, che avrebbero potuto fornire ulteriori evidenze scientifiche, senza dubbio importanti per la risposta al quesito proposto dalla Corte di Assise.
- L'amplificazione in duplicato ha permesso di valutare la concordanza del dato analitico prodotto, consentendo di limitare quei fenomeni artefattuali ampiamente noti quando ci si trova a lavorare in condizioni di LT, quali il presente caso; tale approccio risulta quindi corretto e anzi auspicabile in analisi di questo tipo. Sebbene l'input di DNA utilizzato per la reazione di PCR sia stato inferiore ai 500 pg suggeriti dal manuale del kit, è stato comunque utilizzato il massimo quantitativo a disposizione per produrre due replicati della stessa traccia.
- Il sequenziatore 3500 Genetic Analyzer e software a esso correlati rappresentano a oggi il miglior prodotto disponibile per l'elettroforesi capillare, consentendo un'alta affidabilità e basso rumore di fondo rispetto a sequenziatori prodotti in precedenza dallo stesso fornitore. Il protocollo applicato dai periti per l'attribuzione allelica risulta conforme all'analisi LT-DNA, in quanto particolari accorgimenti devono necessariamente essere messi in atto per rilevare alleli scarsamente rappresentati. In particolare l'impostazione della soglia RFU a 50 appare ragionevole se supportata da opportune validazioni interne al laboratorio. Tali requisiti rientrano nelle validazioni richieste dalla norma ISO/IEC 17025, per la quale il laboratorio di Biologia del RIS di Roma è accreditato.
- I modelli statistici proposti dai periti collimano con la più recente letteratura scientifica e sono supportati dall'utilizzo di software altamente performanti.

TUTTO CIO' PREMESSO, si rappresenta che:

- I dati di laboratorio hanno quindi confermato sulla traccia I la presenza di materiale biologico riconducibile ad Amanda Knox, con un valore di $LR = 3.2 \times 10^8$, valore tale da

poter considerare la medesima quale donatrice di quella traccia, al di là di ogni ragionevole dubbio. Sono altresì presenti ulteriori alleli che, a causa dell'estrema esiguità del DNA presente, non sono in grado di delineare il profilo genetico dell'ulteriore contributore o contributori.

- L'esame condotto dalla Dott.ssa Stefanoni aveva messo in evidenza sulla traccia B del reperto 36 (lama del coltello), la presenza di un profilo riconducibile alla vittima Meredith Kercher, per quanto tale profilo risultava in condizioni di LT-DNA, quindi estremamente esiguo, ovvero della stessa tipologia del campione quivi esaminato.
- Le disponibilità tecnologiche dell'anno 2008 risultano infatti oggi superate e sostituite da strumenti e kit più evoluti e sensibili. La traccia I analizzata adesso dai periti del RIS di Roma rappresenta un campione certamente esiguo e più datato rispetto alla traccia B del reperto 36 (lama del coltello) analizzata dalla dott.ssa Stefanoni (si ricorda che la traccia I è stata estratta 2 anni e mezzo fa!). Ciò nonostante è stato possibile attribuire la traccia ad Amanda Knox. Se la traccia B sulla lama potesse anch'essa essere rianalizzata oggi, il profilo elettroforetico supererebbe certamente la soglia di 50 RFU, posta come limite soglia per l'attribuzione allelica dai consulenti di parte. **Si ricorda d'altra parte che non esistono linee guida universali che impongano il limite di 50 RFU per l'assegnazione dell'allele.** Tali tracce devono quindi necessariamente essere considerate alla luce dei 5 anni di distanza che le separano analiticamente, anni in cui la tecnologia si è evoluta ed ha permesso oggi l'attribuzione della traccia I all'imputata. Entrambe le tracce rientrano infatti nel campo delle LT-DNA, in cui *"il materiale genetico in queste condizioni quantitativamente e qualitativamente sub-ottimali, determina situazioni analitiche assai complesse, sia in termini di procedure di laboratorio che in termini di corretto approccio interpretativo"* come correttamente riportato dai periti Dott. Berti e Barni; esse devono quindi essere valutate con il medesimo approccio, tenendo conto che la traccia B è stata generata con tecnologie 5 anni antecedenti rispetto alle attuali a disposizione del RIS. Di conseguenza, se oggi viene uniformemente accettata l'attribuzione della traccia I ad Amanda Knox, parallelamente deve essere accettata anche l'attribuzione della traccia B (non più disponibile) sulla lama del coltello a Meredith Kercher. Trattasi infatti di due campioni analoghi dal punto di vista quantitativo e qualitativo.

- E' importante sottolineare il fatto che dall'analisi dell'elettroferogramma della campionatura B (pag.68 e seg. della relazione della Dott.ssa Stefanoni), nonostante il valore di RFU fosse effettivamente molto basso, si individuano dei picchi allelici che spiccano nettamente sull'omogeneità del rumore di fondo dello strumento e che tali picchi possono essere riconducibili al profilo genetico della vittima. Nella tabella seguente sono messi a confronto il profilo genetico di Meredith Kercher e il profilo che si estrapola dall'elettroferogramma della traccia B (ID771_200047330):

Tabella interpretazione profilo genetico traccia B:

LOCI	KERCHER MEREDITH	Traccia B sulla lama del coltello
D8S1179	13, 16	13, 16
D21S11	30, 33.2	30
D7S820	8, 11	8, 11
CSF1P0	12, 12	12
D3S1358	14, 18	14, 18
TH01	6, 8	6, 8
D13S317	8, 13	8, 13
D16S539	10, 14	10, 14
D2S1338	20, 23	20, 23
D19S433	12, 16	12, 16
VWA	14, 16	14, 16
TPOX	8, 11	8, 11
D18S51	14, 15	14, 15
D5S818	11, 12	11, 12
FGA	20, 21	20, 21

Amel	X	X
------	---	---

- Si può notare la concordanza dei due profili riportati in tabella, in cui risulta mancante solo un allele al locus D21S11; tale evento è verosimilmente dovuto a un fenomeno noto come *drop-out*, frequente in campioni con scarsa quantità di DNA e dettagliatamente descritto anche dai periti Dott. Berti e Barni nella perizia a pag. 20.
- Il profilo oggi ottenuto e riconducibile ad Amanda Knox è stato ottenuto da una zona del coltello diversa rispetto all'area in cui la Dott.ssa Stefanoni aveva repertato la traccia B, traccia quest'ultima riconducibile a Meredith Kercher. Quest'ultima infatti era stata rilevata sulla lama del coltello e non "nel punto di contatto tra la lama e l'impugnatura", dove oggi si conferma la presenza di materiale biologico di Amanda Knox. La traccia I non può e non deve quindi essere considerata rappresentativa dell'eventuale materiale biologico presente sulla lama del coltello.
- La traccia I presente nel punto di contatto tra lama e manico del coltello, oggi attribuibile ad Amanda Knox, non era stata analizzata dalla Prof.ssa Vecchiotti e dal Prof. Conti in quanto i periti dichiaravano che "**non ha evidenziato presenza di DNA**" come riportato nella perizia Vecchiotti-Conti a pagina 143. L'esame Real-Time aveva invece evidenziato la presenza di 0.120 ng (0,005 ng/ul x 24 = 0,120 ng) sull'estratto I come riportato a pagina 21. Da quel medesimo campione i periti del RIS di Roma hanno ottenuto oggi un profilo praticamente completo riconducibile ad Amanda Knox. Gli odierni esami confutano quindi le conclusioni alle quali erano giunti i Prof. Vecchiotti/Conti a pagina 143 della loro perizia.

DI CONSEGUENZA:

- La traccia I non può e non deve quindi essere considerata rappresentativa dell'eventuale materiale biologico presente sulla lama del coltello, in quanto repertata in una specifica sede diversa dalla sede in cui era stata repertata la traccia B, nella quale la dott.ssa Stefanoni aveva rilevato il profilo di Meredith Kercher.
- Data l'inattendibilità degli esami effettuati dai Prof. Vecchiotti e Conti, confutati oggi dalla perizia depositata dai Dott. Berti e Barni del RIS di ROMA, si ritiene che l'intera perizia

contenga erronei criteri analitico-valutativi messi in atto dai Prof. Vecchiotti e Conti tali da inficiare l'oggettiva valutazione degli elementi a disposizione e come già riportato nelle mie precedenti valutazioni del 29 luglio 2011 .

- Nello specifico, l'esame condotto dalla Dott.ssa Stefanoni aveva messo in evidenza sulla traccia B del reperto 36 (lama del coltello), la presenza di un profilo riconducibile alla vittima Meredith Kercher, per quanto tale profilo risultasse in condizioni di LT-DNA, condizione questa analoga alla traccia I analizzata oggi dai periti del RIS. Se quindi oggi si conviene uniformemente per l'attribuzione della traccia presente nel punto di contatto tra la lama e l'impugnatura del coltello ad Amanda Knox, allora analogamente si deve considerare Meredith Kercher la donatrice della traccia B presente sulla lama del coltello, trattandosi di due campioni di DNA analoghi dal punto di vista qualitativo e quantitativo.

Firenze 12-11-2013

Francesco Tonucci