

ORIGINALE

dott. NENCINI

OSSERVAZIONI IN AMBITO DI GENETICA FORENSE IN MERITO ALLA PERIZIA DISPOSTA DALLA CORTE DI ASSISE D'APPELLO DI FIRENZE NEL PROCEDIMENTO PENALE N. 11/13 RG ASSISE APPELLO NEI CONFRONTI DI AMANDA KNOX+1 E AFFIDATA IN DATA 4 OTTOBRE 2013 AL MAGG. ANDREA BERTI E AL CAP. FILIPPO BARNI IN SERVIZIO PRESSO IL REPARTO CARABINIERI INVESTIGAZIONI SCIENTIFICHE DI ROMA

- **Raccordo tra la perizia Vecchiotti-Conti** disposta dalla Corte di Assise d'Appello di Perugia e **la perizia Berti -Barni** disposta dalla Corte di Assise d'Appello di Firenze.

Nel corso dell'incarico affidato dalla Corte di Assise d'Appello di Perugia i periti, prof.ssa Carla Vecchiotti e dott. Stefano Conti, **effettuavano nove prelievi sul reperto 36** (coltello da cucina, repertato a casa di Raffaele Sollecito), **sette dei quali in corrispondenza delle aree già campionate** dalla Polizia Scientifica nel corso degli accertamenti tecnici svolti nel procedimento penale n. 9066/07 inerente l'omicidio di Meredith Susanna Cara Kercher e **due nel "punto di contatto tra la lama e l'impugnatura, sui versanti opposti del coltello, ed i prelievi effettuati sono stati indicati con le lettere H-I"** (dalla perizia Conti-Vecchiotti, pag. 6).

Su ogni singola area di interesse, prima del prelievo con tamponi sterili, **veniva effettuato test per la diagnosi generica di sangue** mediante "Combur Test® E" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germania) **con esito negativo per tutti i campioni**. È utile ricordare l'elevata sensibilità del test utilizzato (1:250.000).

L'isolamento del DNA inoltre era preceduto dal prelievo da ciascun tampone di una piccola porzione da sottoporre ad analisi citologiche al fine di definire l'origine delle tracce biologiche prelevate. All'esito di dette **indagini citologiche** nessuno dei campioni conteneva elementi cellulari; **in cinque campioni, tra cui i campioni I ed H, si osservava la presenza di granuli** con morfologia circolare/esagonale ed una struttura centrale a raggiera, che venivano classificati come granuli **di amido**.

Effettuata l'estrazione del DNA sulla parte restante dei tamponi utilizzati per il prelievo del materiale sul reperto in esame, era eseguita la quantificazione, che per il campione di interesse (prelievo "I") risultava essere pari a 0,005 ng/µl (valore medio calcolato sulle tre repliche effettuate) per il DNA genomico totale. I periti quindi *"Preso atto che nelle tamponature (A-B-C-D-E-F-G-H-I) effettuate sul Rep. 36 (coltello) e nelle tamponature (L-M) eseguite sul Rep. 165B (gancetti di reggiseno) non era presente DNA"*

utile per le ulteriori indagini di laboratorio (amplificazione, elettroforesi) ... comunicavano verbalmente, ai consulenti delle parti che avrebbero proceduto alla disamina della Consulenza Tecnica espletata dalla Polizia Scientifica” (dalla perizia Conti-Vecchiotti, pag. 30).

- Perizia disposta dalla Corte di Assise d’Appello di Firenze in data 4 ottobre 2013

La Corte formulava al Magg. Berti e al Cap. Barni del RIS di Roma il seguente quesito: *“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 all’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 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 ottobre 2013 la comparazione veniva estesa anche a Raffaele Sollecito e ad Amanda Knox.

Le operazioni peritali avevano inizio il giorno 10 ottobre 2013 alle ore 14 nei locali del RIS di Roma e proseguivano nella stessa giornata presso il Laboratorio di Genetica Forense della Sezione di Medicina Legale - Dipartimento di Scienze anatomiche, istologiche, medico-legali e dell’apparato locomotore - Università di Roma “Sapienza”, ove erano verificate le condizioni di conservazione dell’estratto di DNA relativo al prelievo “P”. Detto campione era conservato in un frigo-congelatore e la temperatura interna del cassetto misurata con sonda certificata risultava essere pari a - 20.2 °C. Come affermano i periti alla pag. 15 della relazione, detto *“valore risulta conforme alle più recenti prescrizioni indicate nelle linee guida internazionali in merito alla conservazione*

*dei reperti e campioni biologici*¹.

Nell'elaborato finale dei periti **le linee guida sono costantemente citate** e ancora in udienza, il 6 novembre 2013, i periti hanno ribadito come sia **necessario seguire le linee guida dettate dalla comunità scientifica internazionale nello svolgimento di ciascuna attività di laboratorio**. Ed è proprio per questo loro convincimento, pienamente condiviso dai consulenti della difesa Knox, che **il piano di lavoro delle attività peritali è stato condotto in accordo con le linee-guida metodologico e valutative della Sezione di Biologia del RIS di Roma, che sono basate su validazioni interne di laboratorio e sui principali riferimenti bibliografici della Comunità Scientifica Forense nazionale e internazionale**.

Per questo motivo, di fronte al valore di 0,002 ng/μl ottenuto dalla quantificazione della traccia "T" effettuata presso i laboratori del RIS in data 10 ottobre 2013, i periti hanno innanzitutto ampiamente **illustrato le difficoltà che campioni così esigui possono presentare, in quanto** trattasi di una condizione di **Low-Template DNA**. In particolare hanno sottolineato la possibilità che si verifichino **fenomeni stocastici** durante la reazione di amplificazione e artefatti analitici durante la corsa elettroforetica. Viste le condizioni di LT DNA e considerato lo scarso volume di estratto di DNA a disposizione **suddividevano** il materiale in **due aliquote**, rispettivamente di 7 e 8 μl, che sottoponevano ad amplificazione con un medesimo kit (AmpFISTR® NGM Select™ PCR Amplification Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), **ottemperando così a quanto consigliato dalla letteratura pubblicata**^{2,3,4,5} **negli ultimi 10 anni** in merito ai profili genetici ottenuti da questo tipo di campioni, **per i quali è necessario eseguire in replicato l'amplificazione per poter essere considerati affidabili a fini giudiziari**. Ciò perché l'esigua quantità di materiale potrebbe dar luogo a fenomeni di sbilanciamento allelico, di mancata

¹ Technical Working Group on Biological Evidence Preservation, *The Biological Evidence Preservation Handbook: Best Practices for Evidence Handlers*, NISTIR 7928, aprile 2013, p. 19.

² GILL P., WHITAKER J., FLAXMAN C., BROWN N., BUCKLETON J., "An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA", *Forensic Science International*, 112:17-40, 2000.

³ BUDOWLE B., HOBSON D.L., SMERICK J.B., SMITH J.A.L., "Low copy number – consideration and caution", *Twelfth International Symposium on Human Identification*, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, 2001.

⁴ TAGLIABRACCI A., DOMENICI R., PASCALI V., PESARESI M., "Indagini di identificazione personale", *Linee guida metodologico-accertative criteriologico-valutative. Indagini genetico-forensi di paternità e identificazione personale*, Piccin Nuova Libreria, Padova, 2007, pp. 23-37.

⁵ GILL P., BUCKLETON J., "A universal strategy to interpret DNA profiles that does not require a definition of low-copy-number", *Forensic Science International: Genetics*, 4:221-227, 2010.

amplificazione di alleli o loci (drop-out allelico), oppure all'episodica comparsa di alleli spuri, ossia varianti non presenti nel genotipo del campione frutto dell'amplificazione di micro-quantità di DNA umano esogeno contaminante (drop-in allelico).

Dopo l'amplificazione i campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare e i tracciati elettroforetici **sono stati analizzati mediante** metodo di analisi standard per i controlli e la scala allelica, mentre un **metodo di analisi LCN** è stato impiegato per la traccia "T". Per quest'ultimo metodo si sottolinea come il valore soglia delle bande stutter sia stato definito dai periti pari al 15%, valore del tutto sovrapponibile a quello adottato per l'analisi di campioni standard. E' noto però dalla letteratura come nei campioni LT DNA l'altezza degli stutter possa raggiungere valori maggiori (anche sino al 40% del picco principale)^{6,7}.

I profili così ottenuti per la traccia "T" **sono stati interpretati** dai periti **seguendo sia il modello biologico che il modello statistico**. Nel primo caso i profili non sono stati valutati singolarmente ma in maniera integrata, ossia non si è considerato il singolo profilo ottenuto dalla singola replica, bensì si sono applicati il metodo del consenso (un allele viene considerato affidabile solo se si ripete almeno due volte nelle repliche) ed il metodo composito (il profilo è dato da tutti gli alleli presenti in ogni singola replica). A proposito della scelta di utilizzare entrambi i metodi per l'analisi integrata dei due profili ottenuti è utile sottolineare come uno degli autori citati dai periti, Benschop⁸, nel 2010 ha definito come **non raccomandato il metodo composito** in quanto si aumenta il rischio di avere drop-in e drop-out allelici per lo stesso locus. Il metodo composito rappresenterebbe secondo l'autore il metodo meno conservativo in quanto caratterizzato da un alto numero di loci considerati erroneamente eterozigoti o da profili definiti erroneamente come misti. Secondo Cowen⁹ **il modello del consenso, che prevede che siano tenuti in**

⁶ CARAGINE T., MIKULASOVICH R., TAMARIZ J., BAJDA E., SEBESTYEN J., BAUM H., PRINZ M., "Validation of testing and interpretation protocols for low template DNA samples using AmpFISTR Identifiler", *Croatian Medical Journal*, 50:250-267, 2009.

⁷ WHITAKER J.P., COTTON E.A., GILL P., "A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPFISTR SGM Plus multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis", *Forensic Science International*, 123:215-23, 2001.

⁸ BENSCHOP C.C.G., VAN DER BEEK C.P., MEILAND C.M., VAN GORP A.G.M., WESTEN A.A., SIJEN T., "Low template STR typing: Effect of replicate number and consensus method on genotyping reliability and DNA database search results", *Forensic Science International: Genetics*, 5:316-328, 2011.

⁹ COWEN S., DEBENHAM P., DIXON A., KUTRANOV S., THOMSON J., WAY K., "An investigation of the robustness of the consensus method interpreting low-template DNA profiles", *Forensic Science International: Genetics*, 5: 207-217, 2011.

considerazione solo gli alleli che si osservano in almeno due repliche utilizzando per l'amplificazione il medesimo kit, rappresenta un metodo conservativo ed è da considerare un "gold standard".

La comparazione con il metodo biologico e successivamente con l'analisi biostatistica dei profili genetici ottenuti per la traccia "I" ed i profili genetici dei soggetti di confronto, ha portato i periti ad affermare che Amanda Marie Knox ha contribuito con il proprio materiale biologico alla traccia "I". Inoltre i periti sono giunti alla conclusione che in suddetta traccia non è presente materiale biologico di Meredith Susanna Cara Kercher, Raffaele Sollecito e Rudi Herman Guede. Tale conclusione è condivisa pienamente dai consulenti della difesa Knox. Solo si osserva, a proposito del termine "fluidi biologici" riportato a pagina 82 della relazione, come a tale termine sia preferibile, laddove non si conosce la natura della traccia (nel caso in esame è stato unicamente escluso che si trattasse di sangue e di materiale cellulare nel corso della perizia affidata ai periti della "Sapienza" di Roma), il termine "**materiale biologico**" impiegato nelle pagine successive e nelle conclusioni. Per fluidi biologici, infatti, generalmente i genetisti forensi intendono sangue, sperma, saliva, fluidi vaginali, urina e sudore¹⁰, che sicuramente non rappresentano tutto il materiale biologico che ciascuno di noi può donare.

In ultimo ancora un'osservazione circa l'aver allegato i profili genetici dei consulenti di parte, seppur in forma anonima, alla relazione. Il consenso che ciascuno dei consulenti ha fornito ai periti relativamente al prelievo di materiale biologico era relativo alle sole finalità di esclusione della potenziale contaminazione delle aree adibite al processamento di tracce biologiche per fini identificativo-forensi. Nella dichiarazione di consenso informato era riportato a piè di pagina come nota 1: "*Il campione biologico raccolto verrà distrutto immediatamente dopo la conclusione delle analisi genetiche mentre il profilo genetico estrapolato verrà conservato nel database di esclusione per 90 giorni e successivamente eliminato a meno che non venga riscontrata una contaminazione dei reperti, delle tracce biologiche e/o delle aree di lavoro dei Laboratori della Sezione di Biologia del Reparto in epigrafe. In tal caso il profilo verrà conservato fino ad un massimo di 12 mesi dall'ultimo episodio di contaminazione riscontrato*". Inoltre al punto

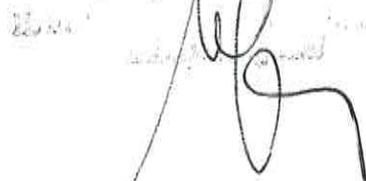
¹⁰ VIRKLER K., LEDNEV I.K., "Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at crime scene", *Forensic Science International*, 188:1-17, 2009.

tre della dichiarazione veniva riportato: *"dichiaro il mio esplicito consenso... 3. alla conservazione di quest'ultimo (profilo genetico, ndr) in uno specifico database il cui uso e la cui tutela saranno conformi alla vigente legge sulla privacy"*. Nessun consenso veniva richiesto per la comunicazione o diffusione dello stesso. Allegare il profilo alla relazione significa non rispettare quanto riportato nella dichiarazione firmata: in questo modo, infatti, il profilo non è solo più conservato nella banca dati di cui al punto 3, per cui la distruzione prevista entro 12 mesi dall'ultima contaminazione non sarà sufficiente per la tutela della privacy.

dott.ssa Sarah GENO¹¹


Torino, 12 novembre 2013

DEPOSITATO IN CANCELLERIA dell'avn. T. Duca
Firenze, 14/11/13


15/11/13

¹¹ Anche a nome del prof. Carlo Torre e del dott. Walter Patumi.