

LA PROVA DEL DNA: ISTRUZIONI PER IL GIURISTA

di Andrea Piccinini e Giuseppe Gennari

- Introduzione
- 1 Il sopralluogo
 - Le regole tecniche
 - Le regole formali
 - Soggettività o oggettività delle operazioni di scelta delle tracce?
 - Altre problematiche tecnico-giuridiche nella fase di sopralluogo
- 2 Operazioni preliminari, individuazione e rimozione delle tracce
- 3 La determinazione della natura delle tracce
 - La diagnosi generica
 - La diagnosi di specie (umana o animale)
 - La diagnosi loco-regionale
- 4 L'analisi del DNA
 - Il DNA e la cellula
 - Il DNA ed i polimorfismi genetici
 - 4.1 L'estrazione e la purificazione del DNA
 - 4.2 La quantificazione del DNA
 - 4.3 La diagnosi individuale: l'analisi dei polimorfismi del DNA mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)
 - 4.3.1 L'analisi del sesso
 - 4.3.2 I polimorfismi del cromosoma Y
 - 4.3.3 I polimorfismi del DNA mitocondriale
 - 4.4 l'elettroforesi del DNA amplificato e l'acquisizione del risultato
 - 4.4.1 L'acquisizione o "lettura" del risultato
 - 4.4.2 DNA in scarsa quantità
 - 4.4.3 La scarsa qualità del DNA
 - 4.4.4 La ripetizione dell'analisi
 - 4.4.5 L'acquisizione del risultato: note conclusive
- 5 L'interpretazione del risultato ed il confronto con profilo/i genetico/i di soggetto/i di interesse
 - 5.1 Il risultato di incompatibilità genetica tra due profili
 - 5.2 Il risultato di compatibilità genetica tra due profili e l'approccio statistico
 - 5.2.1 Compatibilità indagato-traccia. Profili singoli
 - 5.2.2 Compatibilità indagato-traccia. Profili misti
 - 5.2.3 Compatibilità indagato-traccia. Profili complessi
 - 5.3 Il risultato non conclusivo
- 6 La ricostruzione del fatto
- 7 L'esposizione dei risultati in tribunale
 - 7.1 Selezione dell'esperto
 - 7.2 Linee guida
 - 7.3 Contraddittorio
- Considerazioni conclusive

Introduzione

Negli ultimi decenni si è assistito ad un notevole incremento nell'utilizzo di prove scientifiche sia nella fase delle indagini sia nel processo, cosa che ha inevitabilmente catturato l'attenzione dei media: rappresentazioni cinematografiche, serie televisive e online hanno contagiato la vita di tutti, giuristi inclusi, tanto che si è fatto ricorso al termine di “effetto CSI” per indicare, utilizzando l'acronimo di una trasmissione televisiva, l'enorme impatto di suggestione introdotto dalle prove scientifiche, DNA innanzitutto.

Accanto alla descrizione di questo mondo scintillante di alta tecnologia non sono mancate situazioni in cui la prova scientifica è stata oggetto di critiche e polemiche spesso con eccezionale eco mediatica a causa della incompleta possibilità di interpretazione di un risultato¹ o talora di risultati francamente controversi² a volte aspramente e giustamente contestati nelle aule dei tribunali non solo in Italia.

Altri casi di cronaca hanno raccontato di un uso per lo meno disinvolto delle informazioni disponibili presso siti web detentori di database genealogici - utilizzati da privati nelle indagini di ricerca delle proprie origini - per la cattura, con successo, di pericolosi criminali che prima dell'impiego di tale strumento erano latitanti³.

Non vanno però dimenticati i casi in cui lo strumento-DNA è risultato indispensabile nell'identificazione di cadaveri in caso di disastri di massa (terremoti, tsunami) o nell'identificazione di intere popolazioni come nei casi di genocidi dalla Bosnia, al Kosovo, alla Siria, o di soggetti scomparsi come in Argentina o Messico. O ancora nelle quotidiane azioni di valutazione di paternità controverse.

Insomma si tratta di analisi dalla doppia fisionomia, accomunate come sono dalla medesima base scientifica: le analisi del DNA, infatti, sia che si tratti di analisi di tipo criminalistico, sia che si tratti di analisi a fini identificativi (paternità, identificazione), si basano sui medesimi principi scientifici. È diverso solo il contesto di applicazione: molto complesso e variegato nelle analisi di tipo criminalistico, meno “delicato” quando si tratti di ricavare un profilo genetico da un vivente per un test di paternità o da un cadavere da identificare.

È assai probabile che gran parte del successo del cosiddetto “DNA fingerprinting” sia stato dovuto alla iniziale generale accettazione della metodica nelle corti anglosassoni, sulle ali del primo

¹ Solo per citare un caso noto ai più: la difficile interpretazione del risultato ottenuto sulla lama del coltello, indicato come arma del delitto nell'omicidio di Meredith Kercher o sul gancetto del reggiseno nello stesso caso.

² Altro caso controverso riguarda i risultati delle analisi del DNA mitocondriale in contrasto con i risultati delle analisi del DNA genomico nelle indagini e nel successivo processo per l'omicidio di Yara Gambirasio

³ È il caso del “Golden State killer”, alias Joseph James DeAngelo, un ex poliziotto accusato di una decina di omicidi, di una cinquantina di stupri ed oltre 100 rapine, catturato nel 2018 grazie ad un parziale “match” del suo DNA con quello di un suo familiare presente nel database genealogico.

episodio del suo utilizzo nel caso di stupro ed omicidio di due quindicenni in Inghilterra nel 1983 e nel 1986, quando grazie alla nuova tecnica il colpevole venne identificato e condannato all'ergastolo⁴.

A questa fase iniziale di incondizionata fiducia nel mezzo scientifico è seguito un periodo di cautela e di franco dibattito che ha coinvolto scienziati e giuristi su vari fronti; tale dibattito, tra l'altro, ha coinciso con l'introduzione della PCR⁵, la reazione di polimerizzazione a catena del DNA che ancora oggi è la tecnica utilizzata nei laboratori di tutto il mondo; la sua accettazione dal punto di vista dell'ammissibilità secondo le Daubert rules statunitensi non è più ora in discussione.

Ciò che è stato in discussione in tempi recenti è stata piuttosto una estremizzazione dell'uso della tecnica di PCR che, per fare un paragone motoristico, coincide con una elaborazione spinta di un motore, in grado di fornire una maggiore prestazione ma a scapito dell'affidabilità: per tali ragioni il risultato presenta maggiori difficoltà interpretative.

La maggiore sensibilità delle metodiche di rilevazione ha però consentito di superare anche questo problema, tanto che oggi è possibile ottenere gli stessi risultati conseguibili con il motore "truccato" anche con il motore in condizioni normali di funzionamento: la tecnologia ha infatti raggiunto livelli di sensibilità tali da consentire di rilevare DNA in quantità estremamente limitata, che solo con una "elaborazione" della metodica era prima possibile ottenere. Da qui il "nuovo" problema dell'interpretazione di risultati sempre più complessi, legati alla rilevazione di DNA di soggetti diversi, anche appartenenti a chi nulla ha a che fare con il fatto in esame⁶, cosa che ha portato a sviluppare nuovi e più sofisticati approcci analitico-interpretativi.

Tali nuovi approcci prevedono procedure di rigorosa verifica delle attività di laboratorio attraverso la certificazione e l'accreditamento dei laboratori così da minimizzare le variabili indotte da tecniche anche solo lievemente difformi da caso a caso, l'impiego di specifici software, particolari modalità di approccio statistico e l'adozione di linee-guida specifiche.

Come si vedrà si tratta di strumenti in grado di limitare ma non di eliminare completamente il problema dell'interpretazione del risultato: l'interpretazione del risultato, di qualsiasi risultato è, rimane e rimarrà prerogativa dell'operatore. Ciò che la tecnologia può essere in grado di minimizzare è il grado di ampiezza della finestra di soggettività dell'interpretazione dell'esperto. Soggettività interpretativa che rimane e rimarrà sempre: è infatti impossibile incasellare ogni singola situazione in griglie precostituite.

⁴ È il caso di Colin Pitchfork, il primo ad essere condannato nel 1988 grazie ai risultati delle analisi del DNA.

⁵ PCR è l'acronimo di Polymerase Chain Reaction, la reazione enzimatica che consente la "copiatura" di frammenti di DNA sparsi nel genoma rendendoli così "visibili" agli strumenti che ne fanno "lettura", la sensibilità dei quali è andata grandemente aumentando nell'ultimo decennio.

⁶ Fenomeno noto come "contaminazione", di cui si dirà oltre.

Va infatti ricordato che “la prova del DNA” in realtà ricomprende una serie discretamente numerosa di fasi successive, dalle fasi di sopralluogo, alla conservazione/trasferimento delle tracce, alla loro ispezione, analisi, estrazione del DNA, “lettura” e valutazione dell’interpretabilità del risultato e molto altro..

Questo richiamo alla complessità diacronica della indagine genetica è particolarmente utile per il giurista perché lo obbliga ad interrogarsi sull’attendibilità della prova attraverso un ragionamento articolato che non può più accontentarsi del solo risultato finale, di solito condensato nelle ultime tre righe dell’elaborato depositato dal consulente o perito.

Agli albori della prova genetica questo aspetto di complessità era in gran parte “dimenticato” in favore del fatidico “numerino finale” che esprimeva, probabilisticamente, il grado di compatibilità tra i profili genetici esaminati. Ciò accadeva un po’ per inconsapevolezza di tutto ciò che veniva prima di quel numerino e un po’ per relativa maggior semplicità delle procedure di repertazione/analisi, non così raffinate e potenti come oggi. Per contro, negli ultimi anni sia la Cassazione⁷ che la giurisprudenza di merito⁸ italiana hanno rivolto particolare attenzione alla fase di raccolta e di conservazione dei reperti, statuendo che il mancato rispetto delle linee guida accreditate a livello internazionale vanifica la prova raccolta, rendendola di fatto priva di valore.

Analoga crescente attenzione ha ricevuto la fase di interpretazione del risultato; fase nelle quale ci si avvale sempre più frequentemente dell’ausilio di saperi “accessori” come la bio-statistica o l’informatica. Mentre, sul fronte che potremmo definire “strumentale”, si è notevolmente incrementata la domanda di “qualità” dei laboratori e degli esperti coinvolti nel percorso giudiziario, imponendo requisiti di accreditamento e comunque chiedendo conto di procedure di validazione e verifica del percorso analitico.

Di tutto ciò e degli aspetti più propriamente tecnici si parlerà in dettaglio nelle pagine seguenti. Mentre già ora, con queste premesse, è necessario gettare le basi per un salto di qualità oggi davvero indispensabile e di cui deve essere protagonista il mondo del diritto: il passaggio dalla fase del fideismo a quella dell’uso critico della scienza e della genetica.

1. IL SOPRALLUOGO

Il sopralluogo giudiziario e le attività ad essa correlate, ai sensi degli artt. 348, 350, 352, 354, 357 c.p.p, rappresentano momento fondamentale nell’economia dell’intera indagine giudiziaria: in questa fase sono individuati e raccolti reperti, non solo di natura biologica, i quali, se gestiti in maniera non

⁷ Il riferimento è alla sentenza della Corte Suprema di Cassazione nel caso dell’omicidio Meredith Kercher.

⁸ In questo caso il rinvio è alla sentenza n. 1 del 2016 della Corte di Assise di Brindisi, che ha deciso un caso di omicidio dichiarando non utili i risultati ottenuti da campioni biologici repertati e conservati in modo non adeguato.

appropriata quanto a modalità di raccolta, confezionamento, trasferimento e conservazione possono costituire la premessa per il fallimento anche dell'indagine più accurata

Vige la regola in base alla quale se la traccia non è correttamente prelevata può essere in quantità insufficiente per l'analisi, se non è correttamente confezionata può subire contaminazione, se non è correttamente conservata il DNA in essa contenuto può deteriorarsi anche irrimediabilmente; e se la documentazione non è sufficiente, l'origine della traccia può essere contestata.

In questa delicata fase, pertanto, vi sono regole da rispettare che sono sia tecniche sia formali.

Come già detto sopra (ma vale la pena sottolinearlo ancora) questa fase è, oggi, anche particolarmente sensibile dal punto di vista giuridico. Più volte⁹ la cassazione ha ribadito che le operazioni in questione devono essere svolte nel rispetto “delle regole procedurali prescritte dai Protocolli scientifici internazionali in materia di repertazione e conservazione dei supporti da esaminare”. In difetto di ciò, i risultati scientifici ottenuti avranno valore di “mero dato processuale, privo di autonoma capacità dimostrativa e suscettibile di apprezzamento solo in chiave di eventuale conferma di altri elementi probatori”

Le **regole tecniche** di raccolta, confezionamento, conservazione e trasferimento prevedono procedure operative specifiche, dettaglio che esula dalla presente trattazione. Vanno tuttavia sottolineate alcune delle problematiche più comuni che spesso emergono anche nelle cronache giudiziarie e che si riflettono immancabilmente sugli aspetti giuridici della tematica di questo capitolo e, a cascata, sull'esito dell'indagine e su quello processuale.

Inadeguatezza degli strumenti di raccolta delle tracce biologiche. Uno strumento inadeguato per la raccolta della traccia non consente di ottenere quantità sufficienti di DNA, cosa che inevitabilmente si ripercuote sull'analisi con risultati meno chiari e, quindi, contestabili. Analogamente, un contenitore non adeguato può comportare la contaminazione delle tracce tra un reperto e l'altro o un'inadeguata conservazione: troppo spesso, ancora oggi, si assiste al confezionamento di indumenti bagnati (spesso di sangue) in sacchi di plastica all'interno dei quali la traccia biologica subisce deterioramenti talora irreversibili, o si verifica il trasferimento di una traccia da un indumento ad un altro o da una parte di un indumento ad un'altra con inevitabile strascico di contestazioni. Tutto ciò anche a causa della scarsa considerazione che viene attribuita a questa questione con conseguente scarsa disponibilità di attrezzature le quali, ove garantite, consentirebbero ben migliori risultati complessivi. Attrezzature rappresentate da semplici contenitori in plastica o cartone di dimensioni appropriate al reperto, buste, buste di sicurezza, ecc. che non prevedono chissà quale dispiego di risorse.

⁹ Da ultimo Cass. pen., n. 16810/2019.

La conservazione delle tracce. La conservazione del materiale biologico segue le medesime regole della conservazione degli alimenti: prevede lo stoccaggio alla minore temperatura possibile rispetto al tempo che si prevede prima della loro analisi, ossia permanenza a 4° C (la temperatura del normale frigorifero domestico) per un breve periodo di stoccaggio, a -20° / -40° C (la temperatura di congelatori domestici e industriali) per periodi di stoccaggio più prolungati, anche di anni. Va comunque detto che il congelamento rallenta, senza impedirlo, il deterioramento della traccia (e del DNA in essa contenuto) che sarà tanto più evidente quanto inferiore la quantità del materiale di partenza, a sua volta impossibile da stabilire a priori.

È tuttavia di fondamentale importanza almeno asciugare un reperto se umido o bagnato: l'essiccamento infatti, al pari del congelamento, non consente (e limita grandemente) la proliferazione batterica responsabile della degradazione di tutte le molecole biologiche, DNA compreso.

La conservazione inadeguata, determinando una degradazione del DNA che può anche essere massiccia, può portare a risultati di inferiore valenza probatoria e conseguenti questioni processuali. Non è infrequente uno stoccaggio inadeguato di reperti biologici all'interno di uffici (se non talvolta all'interno dello stesso fascicolo processuale) con inevitabili strascichi di contestazione.

La catena di custodia. Con questa dizione ci si riferisce alla continuità dell'integrità del confezionamento, trasferimento e conservazione di un reperto, operazioni che devono essere verificabili in ogni momento con adeguata documentazione. Il caso giudiziario del giocatore di football americano OJ Simpson ne è stato uno tra i più noti esempi: difetti nella catena di custodia hanno infatti condotto nel processo penale alla sua assoluzione quale autore del duplice omicidio della ex moglie e di un di lei conoscente. L'origine di ogni campione non deve essere oggetto di contestazioni: non ha infatti alcun valore un reperto del quale non vi sia certezza assoluta della provenienza.

La contaminazione. Per contaminazione si intende la presenza di una traccia biologica (e quindi DNA) di un soggetto diverso da quello che dovrebbe essere in realtà presente in quella specifica traccia; tale fenomeno si verifica a causa di deposizione incongrua di DNA eterologo, successiva alla raccolta della traccia che lo contiene. Si parla di contaminazione da parte dell'operatore quando il DNA "contaminante" sia a questi ascrivibile e si depone sulla traccia nell'atto della sua manipolazione, ad es. parlando o tossendo. Tale contaminazione non è esclusa neppure durante le procedure di laboratorio. Si parla di contaminazione tra traccia e traccia quando i reperti non vengano trattati in modo appropriato con trasferimento incongruo da un reperto ad un altro. Nel caso giudiziario relativo all'omicidio della studentessa britannica Meredith Kercher, avvenuto a Perugia il 1 novembre 2007, con grande seguito mediatico nazionale ed internazionale, è stato contestato un grave episodio di possibile contaminazione poiché un reperto era stato spostato da una parte all'altra della scena del

crimine con conseguente possibilità che il DNA su di esso rinvenuto potesse esservi trovato non per sua reale, effettiva deposizione da porsi in relazione con l'omicidio ma, appunto, per contaminazione.

Altri autori ricomprendono nel termine "contaminazione" anche il DNA presente prima che la traccia venga deposta, come abitualmente accade pressoché su tutte le superfici di oggetti che possono essere a contatto con materiali biologici anche ben prima che una traccia biologica di interesse forense vi si depositi (si pensi, ad esempio, al coltello da cucina, utilizzato com'è per lo scopo per il quale nasce, maneggiato secondo il suo specifico uso): in tali casi il DNA "preesistente" contamina il profilo genetico del DNA di chi utilizzi successivamente il coltello a scopo criminale.

Le **regole formali** prevedono che ognuna delle fasi sopra descritte venga accuratamente descritta e riportata nei verbali di repertazione, sequestro, custodia, trasferimento, consegna, ecc, gli unici che nel processo consentono la valutazione dell'efficacia delle procedure seguite e della loro sistematicità. Troppo spesso, ancora oggi, tali indispensabili carteggi appaiono francamente inadeguati, imprecisi, lacunosi, tanto da gettare ombre anche su indagini svolte tecnicamente in modo assai accurato.

Di fondamentale importanza sono la documentazione fotografica e/o videofotografica dei reperti, delle tracce eventualmente su di essi presenti e della loro raccolta, che spesso nelle verbalizzazioni sono solo sommariamente riportate quanto a descrizione della localizzazione, delle dimensioni, del colore, ecc. Ciò a garanzia sia dell'adeguato inquadramento del reperto in esame, sia della documentazione del corretto svolgimento delle operazioni d'esame stesse, in vista del loro utilizzo nella fase processuale.

Soggettività o oggettività delle operazioni di scelta delle tracce?

Un argomento non valutato a sufficienza è rappresentato dalla difficoltà nella selezione delle tracce da repertare prima che da esaminare. Oggi, assai più che in passato, tracce di particolare utilità investigativo-probatoria possono non essere direttamente visibili neppure all'occhio esperto o allo strumento più sofisticato di evidenziazione (ad es. luci a varia lunghezza d'onda).

Qual è il criterio in base al quale selezionare una traccia o un gruppo di tracce? Perché una sì l'altra no? Qual è il limite nel numero di tracce da esaminare?

Una risposta potrebbe essere quella del contraddittorio tra le parti, ciascuna con i propri consulenti, che però esige lo spiegamento di specifiche forme procedurali quali la nomina del consulente tecnico per accertamenti irripetibili o del perito; impossibile nelle indagini ad iniziativa della Polizia Giudiziaria o nelle fasi del sopralluogo.

Anche le pur recenti raccomandazioni proposte dal gruppo Genetisti Forensi Italiani (GeFI)¹⁰ neppure contemplano questo pur fondamentale momento, prodromico com'è alla fase vera e propria di analisi di laboratorio.

Altre problematiche tecnico-giuridiche nella fase di sopralluogo

In corso di sopralluogo vengono spesso eseguite operazioni che possono essere oggetto di contestazione durante il processo. Oltre alle problematiche sopra citate spesso vengono condotti accertamenti che, successivamente, potranno non essere più ripetibili, con contestazione di violazione del contraddittorio.

Solo per fare un esempio, l'uso del test del Luminol per l'evidenziazione di tracce ematiche non visibili rappresenta un'attività di estrema importanza fin dai primi momenti della fase investigativa, consentendo di verificare direttamente in loco la possibile presenza di sangue distinguendolo da altre sostanze (chimicamente) somiglianti: il test del Luminol è infatti estremamente sensibile potendo rilevare minutissime quantità di sangue talora anche assai diluito con l'emissione di luminescenza in caso di esito positivo, luminescenza tanto più intensa quanto maggiore il contenuto di emoglobina (quindi di sangue) nel materiale testato.

Del Luminol è meno nota – ma per questo non meno importante – la caratteristica di essere una reazione chimica che quindi prevede l'utilizzo di un substrato (l'emoglobina del sangue, necessaria per la reazione) che però, una volta utilizzata, può non essere più disponibile per una seconda reazione.

Pertanto la ripetibilità di un accertamento o, meglio, la sua mancata ripetibilità, in caso di substrato (sangue) particolarmente scarso, può costituire motivo di contestazione.

2 OPERAZIONI PRELIMINARI, INDIVIDUAZIONE E RIMOZIONE DELLE TRACCE

Il presente capitolo si riferisce alle attività, svolte in laboratorio, di ispezione e rimozione da un reperto delle tracce biologiche, nell'ambito della consulenza tecnica, della perizia o delle attività di indagine di Polizia giudiziaria.

Le operazioni preliminari prevedono un'attenta analisi dell'adeguatezza e completezza degli atti condotti nella fase di sopralluogo e della documentazione relativa, così come riportato nel precedente paragrafo, con verifica della **continuità della catena di custodia** sia sul piano tecnico, sia su quello formale-documentale.

Spesso le tracce si presentano allo stato latente, ossia non visibili direttamente; nel laboratorio medico-legale (ma anche in sede di sopralluogo) sono quindi di normale impiego **strumenti per l'osservazione** sia in luce diretta o con l'impiego di luci con lunghezze d'onda definite e specifiche

¹⁰ Raccomandazioni GeFI nelle indagini di identificazione personale 2018. <http://www.gefi-isfg.org/temp/20112018100445.pdf>

per l'evidenziazione di vari materiali, con le quali è possibile identificare tracce biologiche, fibre (artificiali o pilifere), impronte digitali o di altri materiali, con o senza l'ausilio di lenti di ingrandimento.

Tali strumentazioni – soprattutto per quanto riguarda le luci a lunghezza d'onda specifica – hanno il vantaggio dell'estrema sensibilità, dell'immediatezza, dell'utilizzabilità anche in sede di sopralluogo e della ripetibilità, non essendovi alcun danneggiamento della traccia biologica in esame.

Si tratta comunque di accertamenti preliminari, aventi lo scopo di esaltare la eventuale presenza delle tracce: gli strumenti descritti, infatti, non consentono alcuna definizione della natura di una traccia, cosa che richiede procedure specifiche (diagnosi generica), che possono essere realizzate solo in laboratorio.

Le tracce, a seconda della loro natura (che è sempre da verificare successivamente), saranno poi rimosse con procedure che sostanzialmente possono essere ricondotte al semplice, ancorché professionale, “lavaggio” mediante tamponi, strumenti che oggi posseggono caratteristiche sempre più sofisticate quanto alla loro composizione, oppure ritagliando il frammento di interesse. In entrambi i casi, come ovvio, la ripetibilità dell'accertamento è, nella stragrande maggioranza dei casi, inevitabilmente preclusa.

3 LA DETERMINAZIONE DELLA NATURA DELLE TRACCE

Determinare la natura di una traccia significa dare risposta alla domanda: è sangue? È saliva? Sono cellule cutanee? È muco nasale, ecc.?

L'analisi delle tracce prevede infatti, secondo la classica impostazione medico-legale, passaggi successivi in sequenza che consistono nell'identificazione della natura della traccia, nella verifica della sua natura umana o animale, la regione anatomica di provenienza, l'origine da soggetto maschile o femminile e, solo da ultimo, l'identificazione specifica del soggetto d'origine (analisi del DNA vera e propria).

Si tratta delle procedure definite rispettivamente di diagnosi generica, di specie, loco-regionale, di sesso ed individuale, di cui le prime tre possono essere considerate preliminari all'indagine genetica essendo la diagnosi di sesso e la diagnosi individuale le uniche che prevedono l'analisi sulla molecola del DNA (si veda il prossimo capitolo).

La diagnosi generica consente di stabilire se una macchia sia costituita da materiale biologico oppure no e, soprattutto, quale.

Essa può essere di tipo orientativo o di certezza. Nel primo caso si tratta di eseguire accertamenti preliminari – spesso assai sensibili tanto da consentirne la ripetibilità ed un utilizzo veramente minimo della traccia, elemento di grande utilità in vista sia della ripetizione dell'accertamento sia di un buon successo dell'analisi del DNA – che hanno però lo svantaggio di non fornire elementi di certezza in merito alla natura del materiale in esame che dovrà quindi essere confermata con procedure di certezza, a loro volta però gravate dallo svantaggio di richiedere (relativamente) abbondanti quantità di materiale biologico, cosa che può comportare il fallimento delle successive indagini identificative con il DNA.

So di chi è ma non so che cos'è. Si assiste quindi spesso, nella pratica di laboratorio, ad analisi genetiche su materiali biologici dei quali si ignora completamente la natura non avendo potuto, per scarsità del materiale in esame, procedere con tutta la sequenza delle operazioni sopra descritte, arrivando all'apparente paradosso scientifico di identificare con certezza il soggetto che ha lasciato la traccia senza conoscerne l'esatta natura.

Ciò è dovuto alla scarsa sensibilità delle metodiche di certezza rispetto a quelle di analisi del DNA, assai più sensibili. Di qui la facile confutabilità delle metodiche orientative. In generale, se non si è in grado di definire la natura del materiale biologico di partenza, qualsiasi indagine rischia di essere sminuita nella sua valenza sino alla sua totale inutilità probatoria: basti pensare alla differenza esistente tra un DNA lasciato da goccioline di saliva piuttosto che da liquido seminale: stesso DNA ma liquidi biologici - quindi modalità di deposizione - completamente diversi.

In linea generale la diagnosi generica si basa sul rilievo di costituenti specifici del materiale biologico in esame: per il sangue l'emoglobina, per la saliva l'amilasi, per il liquido seminale varie proteine, per l'urina e le feci alcuni loro costituenti, tra l'altro non completamente specifici; tali accertamenti sono tra loro successivi e non simultanei nel senso che una macchia deve essere testata di volta in volta con reagenti specifici per questo o quel materiale biologico e non per tutti (o per i più comuni) contemporaneamente, e ciò certo costituisce un altro rilevante limite. In altre parole, il più delle volte, le tecniche oggi disponibili prevedono analisi specifiche per la natura ematica che dovranno essere seguite, su un altro, diverso frammento di traccia, da quelle per la natura spermatica a sua volta seguite, per la natura salivare, dallo specifico test su un'altra porzione della medesima traccia, con conseguente grave deterioramento della stessa qualora sia di piccole o piccolissime dimensioni. Non è infatti ancora disponibile una metodica validata che consenta, su un piccolo frammento, di determinarne contemporaneamente la natura per i più comuni materiali biologici.

La ricerca si sta quindi orientando su metodiche che portino a superare tali importanti limiti consentendo il simultaneo accertamento della presenza di marcatori specifici di saliva, sangue, liquido seminale, fluido vaginale, cellule cutanee, ecc, consentendo così, anche in tracce a componente mista,

di determinarne la natura. Tali accertamenti – oggi non ancora completamente validati all’uso routinario – impiegano l’esame del RNA specifico per ciascun materiale biologico, essendo il RNA messaggero (mRNA) il precursore dei fattori proteici esaminati con le indagini attuali^{11,12,13}.

La natura ancora sperimentale di tali accertamenti, quando siano impiegati come mezzo di prova nel processo, non può che prestare il fianco a contestazioni.

In molti contesti le tracce non sono in alcun modo identificabili visivamente ma vengono ugualmente campionate sulla base delle modalità di utilizzo di un oggetto: si pensi a tutte le tracce cosiddette “da contatto”, ossia dovute alla deposizione di (scarso) materiale biologico che è pressoché impossibile identificare essendo il risultato della semplice manipolazione o il contatto con un oggetto. Si tratta di situazioni estremamente frequenti, oggi possibili nell’accertamento grazie alla enorme sensibilità delle tecniche di rilevazione del DNA che però, come detto, hanno lo svantaggio di non consentire di definire l’origine di un materiale biologico.

È evidente quanta sia la differenza nel rilievo su di una superficie di una traccia di liquido seminale rispetto ad una da semplice “contatto” con deposizione di cellule di sfaldamento cutanee in caso di presunta violenza sessuale.

La diagnosi di specie (umana o animale)

Si tratta di accertamenti non frequenti. Spesso gli unici casi in cui sia necessario procedere con la verifica della natura umana di una traccia riguardano il rinvenimento di resti ossei per i quali vi possa essere il dubbio se umani o animali, o di parti anatomiche, o di sangue, ad esempio in cassonetti dell’immondizia. In tali casi la determinazione della natura umana o animale del materiale, essendo realizzabile mediante analisi di DNA specifico (umano o animale), spesso non comporta questioni di particolare rilievo.

La diagnosi loco-regionale

Per diagnosi loco-regionale si intende la definizione della sede anatomica di provenienza di un certo materiale biologico. Non è infrequente la necessità di dirimere la questione circa l’origine di una traccia se da sangue venoso periferico, da epistassi o da sangue mestruale. La tecnologia oggi disponibile, a parte quella non ancora completamente validata e citata a proposito dell’uso del RNA,

¹¹Juusola J. and Ballantyne J. (2005) Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci Int.* 152:1–12.

¹²Vennemann M, Koppelkamm A. (2010) mRNA profiling in forensic genetics I: possibilities and limitations. *Forensic Sci Int* 203:71–75.

¹³Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, et al. (2011) DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci Int Genet.* 5:517–524

consente di ricavare informazioni sufficientemente affidabili solo in un limitato se non limitatissimo numero di casi; di qui le inevitabili contestazioni.

4. L'ANALISI DEL DNA

Una trattazione dettagliata delle procedure tecniche dell'analisi genetico-identificativa esula dagli scopi di questo testo. Tuttavia, alcune informazioni di base sono necessarie a comprendere i fondamenti della disciplina ed i relativi problemi tecnico-giuridici.

Le analisi genetiche prevedono che il DNA venga estratto dalla traccia (estrazione e purificazione del DNA), quantificato (in che quantità si trova? Scarsa, sufficiente o abbondante?) ed analizzato con marcatori specifici, attualmente i cd. "microsatelliti", corte porzioni di DNA presenti in tutti i cromosomi, nel nucleo cellulare. In specifiche circostanze può essere necessaria l'analisi del DNA mitocondriale, presente nel citoplasma cellulare extranucleare.

Prima, una breve premessa ad inquadrare le questioni biologiche fondamentali relative al DNA ed ai polimorfismi genetici.

Il DNA e la cellula

Ciascuna cellula nucleata del nostro organismo contiene, "impacchettato" nei 46 cromosomi presenti nel nucleo, l'intero corredo genetico, ossia il DNA che è quindi il maggiore componente dei cromosomi e che perciò è detto "**DNA nucleare**". I cromosomi sono in numero di 22 coppie di autosomi ed una coppia di cromosomi sessuali, XX per la femmina, XY per il maschio.

Al di fuori del nucleo il citoplasma di ciascuna cellula contiene, oltre agli organelli necessari alla vita cellulare, alcune centinaia di strutture indispensabili per il mantenimento dei processi energetici della cellula stessa, dette mitocondri; ciascuno di essi contiene alcune unità di un proprio, specifico DNA, detto appunto "**DNA mitocondriale**" (mtDNA).

DNA nucleare (nei cromosomi) e DNA mitocondriale (nel citoplasma), dunque, sono le due sorgenti di informazioni nelle analisi genetico-forensi.

Il DNA ed i polimorfismi genetici

DNA nucleare e mtDNA hanno in comune la struttura tipica della molecola del DNA, composta com'è dai 4 nucleotidi adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). Essi sono organizzati in una struttura tridimensionale nota come "doppia elica", costituita da due catene con i nucleotidi variamente alternati appaiati tra loro. Queste 4 molecole sono le stesse che compongono il DNA di tutti gli esseri viventi, animali e vegetali; ciò che differenzia gli uni dagli altri è la successione di tali molecole.

Nell'uomo l'organizzazione della molecola del DNA prevede una successione dei 4 nucleotidi per il 99,9% identica tra individuo ed individuo. Ciò significa che le differenze tra gli individui sono limitate ad una porzione di DNA pari allo 0,1%. All'interno di questo 0,1% sono quindi presenti ed analizzabili le differenze tra i vari soggetti, differenze che sono dovute ad una diversa disposizione dei nucleotidi: quando, in un certo punto del genoma (detto *locus*), vi siano differenze anche di un solo nucleotide (ad esempio una Timina al posto di una Citosina), si parla di polimorfismi di sequenza o SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms - figura 1). Quando invece ad un certo *locus* vi sia una differenza nella successione di gruppi di nucleotidi si parla di polimorfismi di lunghezza (figure 1-3)¹⁴.

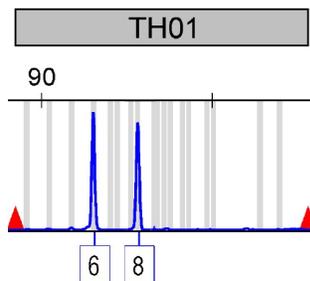
POSIZIONE	16270	16280	16290
traccia	CCTCACCCAT	TAGGATATCA	ACAAACCTAC
indagato	CCTCACCCCA	TAGGATACCA	ACAAACCTAC

Figura n. 1. Esempio di polimorfismo di sequenza del DNA mitocondriale. Differente sequenza tra traccia ed indagato in due posizioni.

A

Traccia con genotipo 6,8

..... CCT AATG [AATG] [AATG] [AATG] [AATG] [AATG] [TCA] **6 unità ripetute**
 CCT AATG [AATG] [AATG] [AATG] [AATG] [AATG] [AATG] [AATG] [TCA] **8 unità ripetute**



B

Indagato con genotipo: 5,7

.....CCT AATG [AATG] [AATG] [AATG] [AATG] [TCA] **5 unità ripetute**
CCT AATG [AATG] [AATG] [AATG] [AATG] [AATG] [AATG] [TCA] **7 unità ripetute**

¹⁴ Butler JM, Coble MD and Vallone PM. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. Forensic Sci Med Pathol 2007; 3: 200–205.

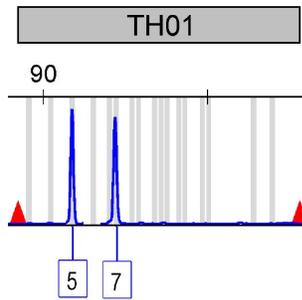


Figura n. 2. Esempi di polimorfismi di lunghezza del DNA nucleare. Differente lunghezza dell'unità ripetuta al *locus* TH01 tra traccia (porzione A della figura) ed indagato (porzione B) rappresentata in forma grafica (parte superiore di ciascuna porzione) ed in forma di elettroferogramma, generato dal sistema di rilevazione (parte inferiore). Si ottiene un profilo rispettivamente con *alleli* 6 e 8 (*genotipo* 6,8, composto da *allele* 6 e da *allele* 8) per la traccia ed un profilo con *alleli* 5 e 7 (*genotipo* 5,7, composto da *allele* 5 e da *allele* 7) per l'indagato.

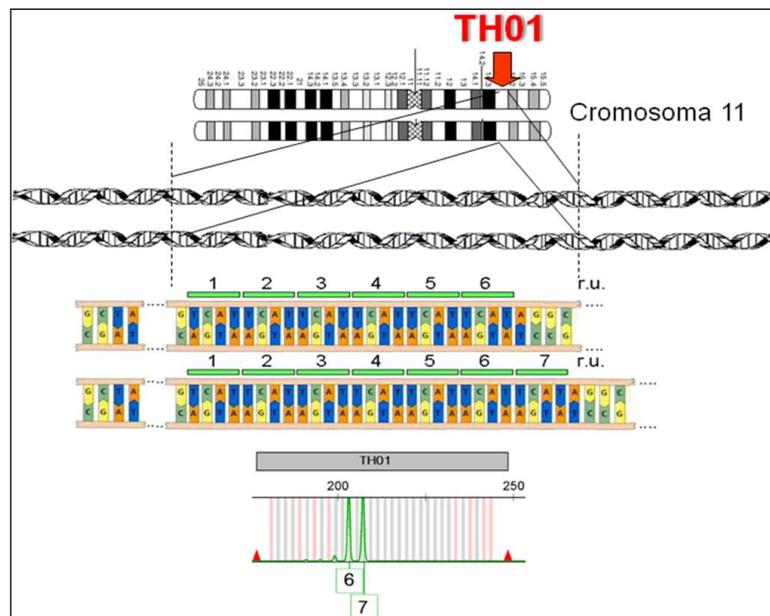


Fig. n. 3. Locus TH01: dal cromosoma al DNA, al profilo genetico

Nel DNA mitocondriale sono presenti pressoché solo polimorfismi di sequenza, mentre nel DNA nucleare sono presenti sia polimorfismi di sequenza, sia di lunghezza; questi ultimi sono quelli oggi utilizzati nella stragrande maggioranza delle indagini criminalistiche e nei test di paternità: i “microsatelliti”.

Ciascun cromosoma contiene infatti centinaia di *loci* in cui vi sono differenze di lunghezza tra gli individui. Si tratta per l'appunto dei microsatelliti o STR (Short Tandem Repeats), presenti a migliaia nel genoma, così definiti perché sono tratti di DNA corti (short – da 3 a 6 paia di basi), ripetuti uno dietro l'altro (tandem repeats). Di queste migliaia solo alcune decine sono utilizzabili a fini

identificativi forensi, identificati con sigle alfanumeriche che ne indicano la posizione sui vari cromosomi (si veda tabella n.1)¹⁵.

MARCATORE (locus)	Localizzazione cromosomica	Unità ripetuta	Alleli principali
D8S1179	8q	TCTA/TCTG	8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19
D21S11	21q11.2-q21	TCTA/TCTG	24,24.2,25,26,27,28,28.2,29,29.2,30, 30.2,31,31.2,32,32.2,33,33.2,34,34.2,35, 35.2,36,37,38
D7S820	7q	GATA	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
CSF1PO	5q33.3-34	TAGA	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
D3S1358	3p	TCTG/TCTA	12,13,14,15,16,17,18,19
TH01	11p15.5	TCAT	4,5,6,7, 8,9,9.3,10,11,13.3
D13S317	13q22-31	TATC	8,9,10,11,12,13,14,15
D16S539	16q24-qter	GATA	5,8,9,10,11,12,13,14,15
D2S1338	2q35-37.1	TGCC/TTCC	15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28
D19S433	19q12-13.1	AAGG/AAAG/TAGG	9,10,11,12,12.2,13,13.2,14,14.2,15,15.2,16, 16.2, 17,17.2
VWA	12p12-pter	TCTG/TCTA	11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24
TPOX	2p23-2per	AATG	6,7,8,9,10,11,12,13
D18S51	18q21.3	AGAA	7,9,10,10.2,11,12,13,13.2,14,14.2,15, 16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27
D5S818	5q21-31	AGAT	7,8,9,10,11,12,13,14,15,16
FGA	4q28	CTTT	17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,26.2, 27,28,29,30,30.2,31.2,32.2,33.2,42.2,43.2, 44.2,45.2,46.2,47.2,48.2, 50.2,51.2

Tabella n. 1. Alcuni marcatori di comune uso forense con indicazione delle principali caratteristiche.

Fatte le necessarie premesse, relative alle basi biologiche delle analisi genetico-forensi, si prosegue nella descrizione delle operazioni di laboratorio che porteranno alla generazione del profilo genetico dei campioni in esame.

4.1 L'estrazione e la purificazione del DNA

Una volta effettuate le analisi preliminari di diagnosi generica, di specie, ecc, le analisi del laboratorio genetico-forense prevedono l'estrazione e la purificazione del DNA per la sua analisi.

¹⁵ Edwards A, Civitello A, Hammond HA, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am J Hum Genet 1991; 49: 746-756.

L'estrazione e purificazione del DNA consentono di rimuovere tutti i materiali inorganici (polvere, agenti chimici contaminanti presenti nel substrato) ed organici (residui cellulari, proteine, ecc.) che ostacolano le successive fasi di quantificazione ed analisi. Tale procedura, quindi, consente di portare alla luce il DNA effettivamente presente nella traccia: con ciò si vuole intendere che se le procedure di rimozione e raccolta della traccia non sono state sufficientemente accurate, non esisterà alcun metodo di estrazione al mondo in grado di compensare una reperazione scadente, non capace di assicurare una quantità di DNA sufficiente. Il fattore limitante e critico, quindi, non è l'estrazione del DNA, ma piuttosto la raccolta della traccia in cui il DNA è contenuto o, comunque, la quantità di partenza di esso.

La procedura di estrazione difficilmente presenta motivi di particolare delicatezza, a condizione che vengano impiegate metodiche sufficientemente standardizzate, oggi assai numerose e disponibili commercialmente.

4.2 La quantificazione del DNA

I kit per le analisi identificative attraverso la tipizzazione dei microsatelliti oggi in commercio hanno un regime di "tolleranza" che consente di utilizzare quantità di DNA comprese tra un minimo ed un massimo. Di qui la necessità di determinare con precisione la quantità del DNA presente in una traccia attraverso procedure specifiche che consentono di ottenere una certa uniformità nella successiva fase di analisi.

Le tecniche di comune impiego hanno il vantaggio di quantificare unicamente il DNA umano estratto e non il DNA batterico, fungino, vegetale, ecc. che viene normalmente co-estratto insieme con il DNA umano. Esistono anche procedure che consentono di quantificare anche il solo DNA maschile presente nella traccia, in rapporto alla quantità totale. Una volta conosciuta la concentrazione di DNA presente nella traccia sarà possibile adeguarne la quantità nelle successive fasi analitiche, così da mantenersi all'interno del *range* "prescritto" dalle case produttrici i kit identificativi. Accanto alla rilevazione della quantità di DNA sono inoltre disponibili sistemi di rilevazione anche della qualità del DNA, così da consentire migliori scelte nella fase successiva, di amplificazione (PCR), propria della diagnosi individuale.

È evidente che, in caso di scarsa o scarsissima quantità di DNA non sarà possibile l'"adeguamento" alla prescrizione del kit, con evidenti ripercussioni sulle possibilità di chiara ed inequivoca interpretazione del risultato.

Il caso opposto, con eccessiva quantità di DNA, non comporterà alcuna difficoltà potendosi diluire il campione, così riducendone la quantità.

4.3 La diagnosi individuale: l'analisi dei polimorfismi del DNA mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)

La diagnosi individuale rappresenta lo step conclusivo dello studio di un campione; essa è condotta simultaneamente alla diagnosi di sesso, maschile o femminile.

La diagnosi individuale viene condotta impiegando la tecnica della Polymerase Chain Reaction (PCR) che consente di rendere “visibili” i marcatori microsatelliti oppure gli SNPs.

Non sono da anni più in uso i metodi che prevedevano l'impiego dei gruppi sanguigni AB0, Rh, ecc., fonte spesso di gravi errori.

La reazione a catena della PCR venne proposta nel 1983 da Kary Mullis e rappresentò una vera e propria rivoluzione nel campo della biologia molecolare, inclusa l'analisi forense del DNA.

Per questa scoperta l'ideatore venne insignito del premio Nobel nel 1993.

La metodica prevede la moltiplicazione – con fasi successive a catena, per l'appunto – di frammenti di DNA di interesse, frammenti che, nel caso dell'analisi forense, contengono i citati polimorfismi di sequenza o di lunghezza: questa moltiplicazione fa sì che tali frammenti – altrimenti non rilevabili perché in quantità troppo esigua – si rendano visibili con appositi strumenti. E tale processo è particolarmente apprezzabile in ambito forense dove le tracce sono spesso di dimensioni minime ed il DNA, quindi, in quantità particolarmente ridotta.

Senza entrare in speciali dettagli, la reazione di amplificazione prevede tre fasi a tre diverse temperature che si ripetono a catena 28-30 volte.

Ad ogni ciclo il frammento di interesse viene copiato, quindi raddoppiato.

Questa reazione viene condotta in un apposito strumento (*thermal cycler*) in grado di variare automaticamente i cicli di temperatura, mentre i componenti della reazione, insieme con il DNA di partenza, sono aggiunti una sola volta all'inizio del processo.

Tali componenti sono dati in forma di kit commerciali preparati su larga scala, estremamente affidabili quanto al loro contenuto, a tutto vantaggio dell'affidabilità e della riproducibilità del metodo ovunque nel mondo.

L'amplificazione simultanea, effettuata a più *loci* contemporaneamente, produrrà frammenti di DNA amplificato che saranno di lunghezza diversa da *locus* a *locus* e da individuo ad individuo, generando così profili genetici unici¹⁶.

Attualmente, con strumenti tarati e controllati, e con i kit commerciali disponibili, questa fase non rappresenta particolari profili di criticità: ciò che può essere francamente critico sono la quantità – spesso assai scarsa, al limite di sensibilità delle metodiche – e la qualità del DNA di partenza, talvolta in condizioni anche di elevata degradazione (si veda paragrafo 4.4.3).

Il prodotto dell'amplificazione viene poi visualizzato mediante apposite apparecchiature (sequenziatori automatici) che hanno lo scopo di separare i frammenti amplificati in base alla loro lunghezza, generando profili genetici (elettroferogrammi) visibili sullo schermo di un computer collegato allo strumento, con i caratteristici picchi ormai a tutti noti (figura 4).



Figura 4. Esempio di elettroferogramma relativo ad un profilo genetico a 15 loci + Amelogenina XY (marcatore per il sesso, ultimo in basso a sinistra).

Per ciascun locus i profili sono detti omozigoti (un solo allele, ossia un solo picco nell'elettroferogramma) o eterozigoti (due alleli, ossia due picchi nell'elettroferogramma), v. fig. 5.

¹⁶ Butler JM. Advanced topics in forensic DNA typing: methodology. Cambridge, MA: Academic Press, 2012, pp.1-680.

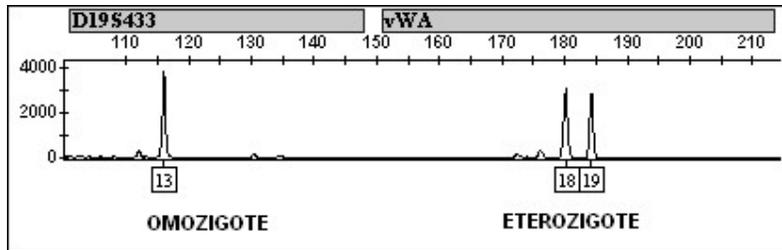


Figura n. 5. Profili omozigote (un solo allele) ed eterozigote (due alleli).

4.3.1 L'analisi del sesso

La diagnosi di sesso generalmente si basa sul rilievo del gene dell'amelogenina, presente sia sul cromosoma Y (caratteristico del fenotipo maschile), sia sul cromosoma X. Il corredo genetico per i cromosomi sessuali infatti nel maschio è XY, nella femmina XX.

Il rilievo di due picchi deporrà per un campione maschile (o anche maschile, potendo essere una commistione di DNA maschile e femminile), mentre il rilievo di un solo picco deporrà per un campione esclusivamente di sesso genetico femminile, essendo la lunghezza dei frammenti sul cromosoma X leggermente diversa da quella sul cromosoma Y. Due diverse lunghezze, due picchi (fig. n. 6).

Il sesso genetico di un campione si ottiene ogniqualvolta se ne determini il profilo. Ciò significa che l'analisi del DNA di un campione fornisce contemporaneamente il profilo genetico del campione ed il sesso del medesimo poiché tutti i kit commerciali per utilizzati a fini identificativi consentono la rilevazione del gene dell'Amelogenina¹⁷.

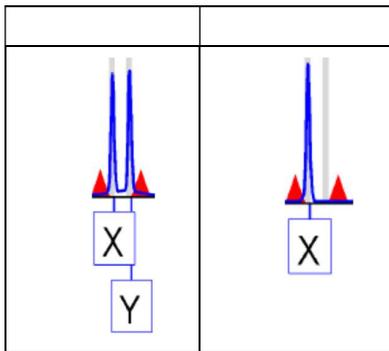


Figura n. 6. Gene dell'Amelogenina e diagnosi di sesso. A: sesso genetico maschile (XY). B: sesso genetico femminile (XX)

Tuttavia, in una traccia composta da più materiali biologici (ad es. sangue e saliva), è impossibile stabilire quale dei due materiali biologici sia quello di sesso maschile e quale quello di sesso femminile.

¹⁷ Butler JM and Hill CR. Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis. Forensic Sci Rev 2012; 24: 15-26.

Allo stato attuale la possibilità di definire il sesso genetico di una traccia rappresenta l'unica informazione circa le caratteristiche fisiche di un individuo, non essendo l'analisi del DNA forense di tipo "tradizionale" in grado di fornire alcun elemento in tal senso. Accanto alle modalità di analisi del DNA "tradizionali" sono già da tempo disponibili strumenti di analisi del DNA in grado di fornire informazioni circa il colore degli occhi, dei capelli, della cute¹⁸ e dell'origine geografica¹⁹.

4.3.2 I polimorfismi del cromosoma Y

Il cromosoma Y è l'unico cromosoma presente solamente nei soggetti di sesso maschile. Ciò rende i polimorfismi contenuti in questo cromosoma particolarmente utili nella pratica forense, essendo il 95% dei reati commesso da soggetti di sesso maschile.

I polimorfismi del cromosoma Y hanno caratteristiche assai simili a quelli presenti sui cromosomi autosomici (i cromosomi non sessuali rimanenti), con l'importante differenza legata al fatto che tale cromosoma si trasmette inalterato di padre in figlio maschio. Per tale motivo soggetti diversi, discendenti da un medesimo progenitore maschio, condivideranno lo stesso gruppo di marcatori (aplotipo); questo fa sì che i marcatori del cromosoma Y non consentano l'identificazione vera e propria, certa, di un soggetto, essendo l'aplotipo Y condiviso, in una stessa famiglia, da più soggetti (padre, figli, fratelli, cugini, ecc.)²⁰.

Tuttavia, l'utilità di tali marcatori è considerevole in particolari situazioni, spesso assai frequenti nella pratica forense. Si pensi ai delitti di violenza sessuale nei quali le tracce biologiche, relative ad un avvenuto contatto aggressore-vittima, possono anche essere molto scarse. Spesso infatti si verifica la presenza di abbondante quantità di DNA relativo alla vittima (soggetto femminile) e di scarsissima quantità di DNA dell'aggressore (soggetto maschile). In tali casi l'analisi dei marcatori autosomici – quelli "individualizzanti" – sconta il rilevante limite di non consentire l'evidenziazione del DNA in quantità inferiore, dell'aggressore, "coperto" com'è dal DNA in quantità superiore, della vittima: una delle (peggiori) caratteristiche della PCR, in una miscela di DNA, è infatti quella di non essere in grado di amplificare, e quindi rendere visibile, il componente in quantità minore se non in percentuali

¹⁸ Kayser M (2015) Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Sci Int Genet.* 18:33-48

¹⁹ Pereira V, Mogensen HS, Børsting C, et al. (2017) Evaluation of the precision ID ancestry panel for crime case work: a SNP typing assay developed for typing of 165 ancestral informative markers. *Forensic Sci Int Genet.* 28:138–145

²⁰ de Knijff P, Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, Honda K, Jobling M, Krawczak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Pandya A, Parson W, Penacino G, Perez Lezaun A, Piccinini A, Prinz M, Roewer L et al (1997) Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int J Leg Med* 110:134–149

superiori al 5-10%. Pertanto, se in una traccia di DNA misto femminile-maschile la quota maschile è inferiore al 5-10%, essa non risulta evidenziabile.

I polimorfismi del cromosoma Y, invece, proprio perché relativi ad un DNA unicamente maschile, vengono captati molto facilmente, come una “calamita molecolare”, anche in presenza di abbondanti quantità di DNA femminile (figura n. 7).

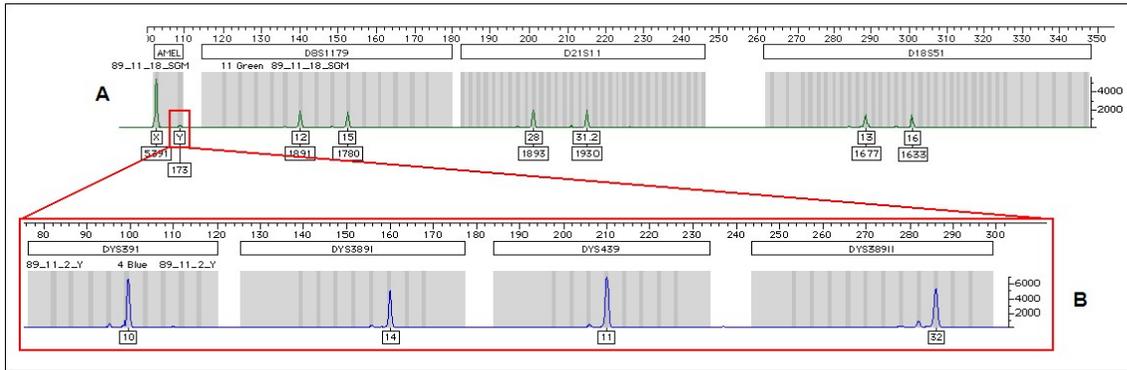


Figura n. 7. Tipizzazione con marcatori autosomici su materiale prelevato da tampone vaginale (è riferita violenza sessuale senza eiaculazione), con evidenza di profilo pressoché unicamente femminile con una piccolissima frazione di DNA maschile al locus Amelogenina (pannello A); nessun segno di DNA eterologo rispetto alla vittima agli altri loci del pannello A. La tipizzazione con marcatori del cromosoma Y (pannello B) consente di evidenziare un aplotipo Y completo.

I polimorfismi del cromosoma Y, dunque, trovano uno dei loro migliori impieghi nei casi di violenza sessuale quando non sia avvenuta eiaculazione, o comunque in tutti quei casi in cui il rapporto DNA femminile-DNA maschile sia assai sfavorevole al secondo.

Quando vi sia corrispondenza tra due aplotipi Y (ad es. traccia-indagato) bisogna – analogamente a quanto avviene per i marcatori autosomici – domandarsi quanti altri soggetti condividono il medesimo aplotipo. La significatività della corrispondenza deve necessariamente tenere conto della minore informatività che i marcatori del cromosoma Y possiedono rispetto ai marcatori autosomici, non essendo specifici del singolo individuo – come i marcatori autosomici – ma della sua “linea familiare”, di diretta discendenza maschile. Come detto, ciò comporta che soggetti discendenti da un medesimo progenitore maschile, anche lontani nelle generazioni, posseggano lo stesso aplotipo Y. Un po’ come avviene per i cognomi: è possibile che due soggetti condividano lo stesso cognome (o lo stesso aplotipo Y) anche senza conoscersi l’un l’altro, dato l’allargarsi nel corso delle generazioni dell’albero familiare.

È per questo motivo che, nell’accertamento genetico comparativo, la condivisione di due profili Y consente unicamente di fornire elementi circa la possibile comune origine di una traccia da un possibile indagato/imputato ma non l’identificazione in senso proprio del soggetto.

Viceversa l'incompatibilità di due profili Y consente di affermare in via di certezza la non comune origine di due campioni²¹.

4.3.3 I polimorfismi del DNA mitocondriale

Come detto i mitocondri sono organelli presenti nel citoplasma cellulare deputati alla fornitura alla cellula dell'energia necessaria.

Ciascun mitocondrio contiene diverse unità di mtDNA che pertanto è presente in diverse migliaia di copie per ogni cellula a fronte di un'unica copia del DNA nucleare.

Ciò costituisce uno dei principali vantaggi dell'analisi con mtDNA: quando il DNA nucleare si rilevi essere in quantità troppo scarsa, essendo la traccia biologica rappresentata da pochissime cellule, ecco che l'analisi del mtDNA, su migliaia di copie, può fornire utili risultati a fini identificativi.

Un esempio di utilizzo dell'analisi mtDNA sono i tessuti ossei, soprattutto se di vecchia o antica data, poveri come sono di DNA nucleare, o il fusto del capello che, diversamente dal bulbo, contiene scarsissime quantità di DNA nucleare.

Va tuttavia sottolineato che le analisi del mtDNA non costituiscono una regola ma piuttosto un'eccezione: esse infatti sono assai laboriose, costose e forniscono risultati di minore capacità identificativa rispetto ai polimorfismi del DNA nucleare. La caratteristica del mtDNA è infatti quella di essere ereditato unicamente per via materna. È infatti solo la madre a trasferire il mtDNA a tutti i propri figli, maschi e femmine, ma solo queste ultime a loro volta lo trasmetteranno alla progenie; per tale motivo non è possibile, mediante l'analisi mtDNA, l'identificazione certa di un soggetto. Esattamente come per le analisi del cromosoma Y.

Uno dei principali problemi nell'analisi del mtDNA è quello della rilevante possibilità di contaminazione del campione da analizzare con campioni freschi di riferimento, o con campioni provenienti da tracce contenenti DNA in buona quantità o qualità. Pertanto, al fine di ridurre quanto più possibile tale problema, è necessario utilizzare spazi e strumenti dedicati e procedure di decontaminazione particolarmente vigorose.

Un altro problema delle analisi delle regioni mitocondriali risiede nella metodica stessa di analisi, il sequenziamento, ossia la "lettura" della successione delle basi una dopo l'altra, procedura differente dalla "lettura" di lunghezze diverse di frammenti come riportato per il DNA autosomico^{22,23}.

²¹ Roewer L (2009) Y chromosome STR typing in crime casework. *Forensic Sci Med Pathol* 5:77–84

²² Bandelt HJ, Kloss-Brandstatter A, Richards MB, et al. (2014) The case for the continuing use of the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) and the standardization of notation in human mitochondrial DNA studies. *J Hum Genet* 59:66–77.

²³ Butler JM. *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Cambridge, MA: Academic Press, 2012.

Per l'interpretazione dei risultati dell'analisi mtDNA esistono specifiche raccomandazioni, necessarie anche a promuovere grande prudenza, data la difficoltà di una materia che non ha ancora raggiunto il livello di affidabilità delle analisi con marcatori autosomici²⁴.

Ci si soffermerà ora sull'interpretazione dei risultati, ottenuti con le descritte modalità.

4.4 L'elettroforesi del DNA amplificato e l'acquisizione del risultato

4.4.1 L'acquisizione o “lettura” del risultato. Lo strumento deputato alla “lettura” del risultato ottenuto con la PCR restituisce un profilo genetico che deve essere valutato quanto a²⁵:

- completezza: un profilo è completo se tutti i loci hanno dato risultato; parziale se alcuni – non tutti – hanno dato risultato. Questa seconda eventualità si presenta in caso di scarsa quantità o qualità del DNA presente (si veda oltre – DNA in scarsa quantità).

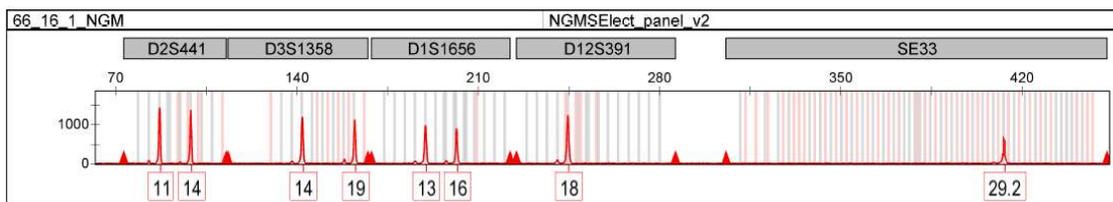


Figura n. 8. Profilo completo (alleli presenti in tutti i 5 loci)

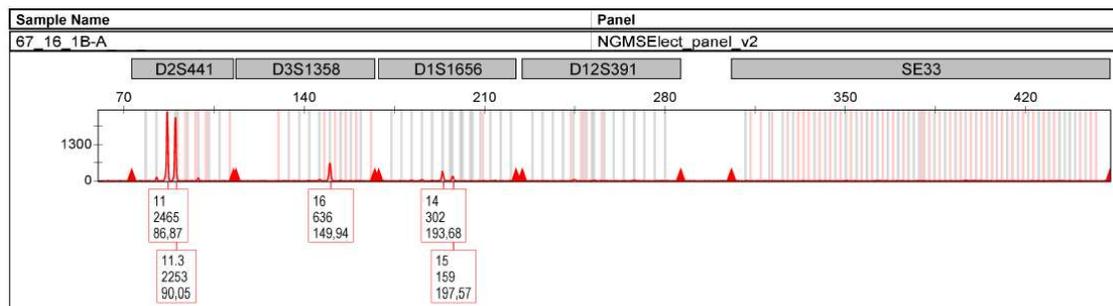


Figura n. 9. Profilo parziale (alleli assenti ai loci D12S391 e SE33)

- numero di picchi per locus: al più due picchi per locus riflettono la presenza di un solo soggetto quale contributore del profilo: in tali casi il profilo è definito come “**profilo singolo**”. 3 o 4 picchi riflettono la presenza di almeno due soggetti quali contributori del profilo: in tali casi il profilo è definito come “**profilo misto**”. I profili misti possono talora essere “deconvoluti”, ossia risolti nelle loro componenti

²⁴ Parson, W. et al. (2014) DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. Forensic Science International: Genetics. 13: 134-142

²⁵ Raccomandazioni GeFI nelle indagini di identificazione personale 2018, loc cit

con chiara comprensione dell'esatta composizione dei profili dei soggetti che lo compongono, circostanza che si verifica allorquando vi sia una componente maggiore (DNA di un individuo in quantità maggiore) ed una componente minore (ossia DNA dell'altro individuo in quantità minore).

Più di 4 alleli per locus indicano la presenza di più di 3 soggetti: in tali casi il profilo è definito **“profilo complesso”** e non è possibile alcuna deconvoluzione; non è in altri termini possibile distinguere le componenti del profilo definendo i profili dei diversi contributori.

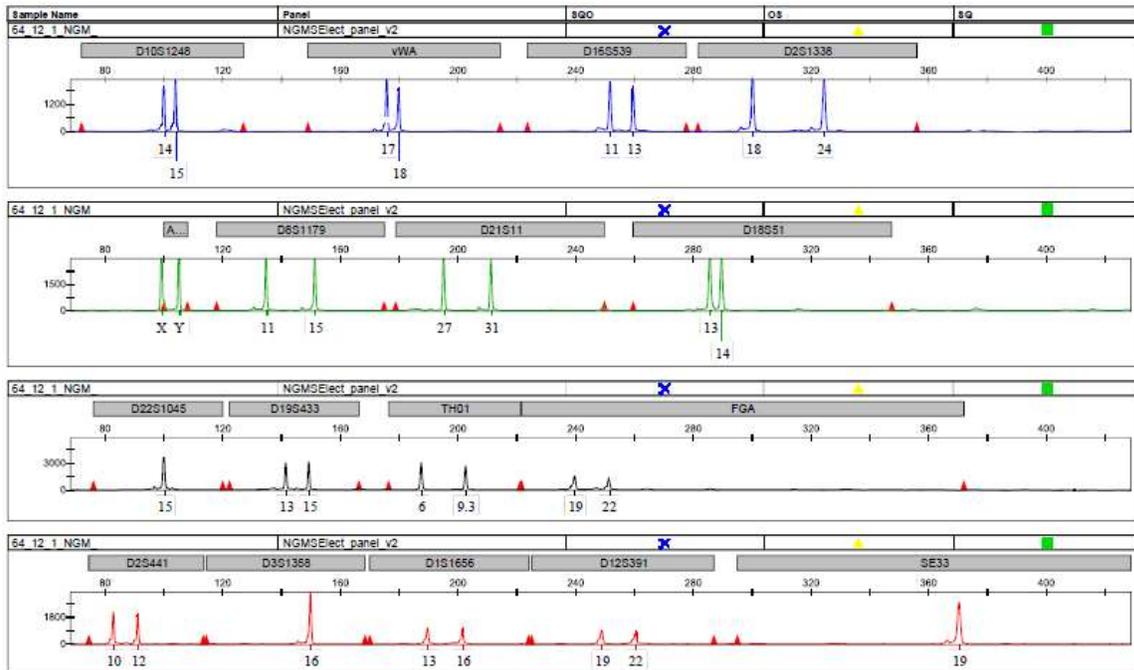


Figura n. 10. Profilo singolo (17 loci)

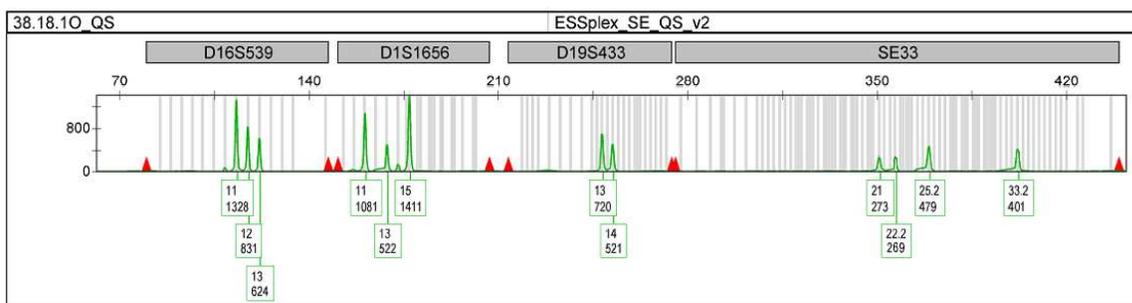


Figura n. 11. Profilo misto (4 loci nell'immagine)

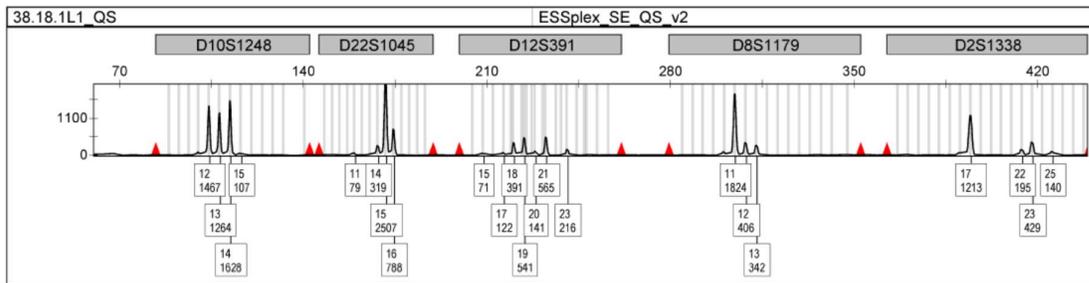


Figura n. 12. Profilo complesso (5 loci nell'immagine)

- altezza dei picchi: l'altezza del picco deve essere in ogni caso ben superiore al "rumore di fondo" da cui non deve essere confuso. Un'altezza prossima al rumore di fondo indica quantità di DNA particolarmente scarsa ed andrà considerata con particolare attenzione (si veda oltre – DNA in scarsa quantità).

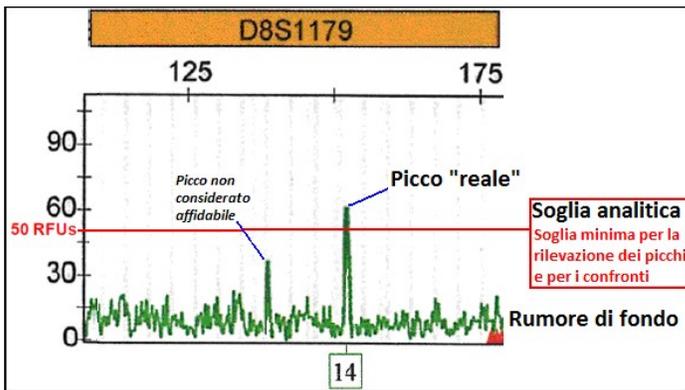


Figura n. 13. In questa immagine, al di sopra della soglia analitica di 50 rfu il picco può essere considerato "reale" ed utilizzato per confronti

- bilanciamento dei picchi di un singolo locus: per i loci aventi profilo eterozigote i due picchi che compongono il profilo devono avere uguale altezza (o comunque un rapporto contenuto entro valori noti alla letteratura scientifica). Un rapporto sbilanciato può essere espressione di scarsa quantità o qualità del DNA (si veda oltre – DNA in scarsa quantità).

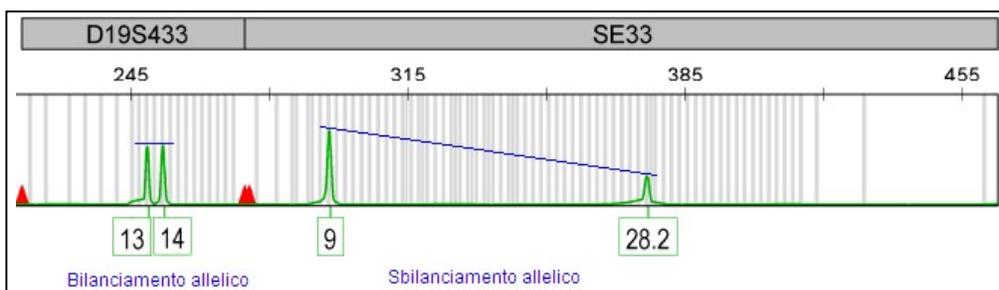


Figura n. 15. Bilanciamento e sbilanciamento allelico

- presenza di artefatti. Un artefatto è per definizione un prodotto inatteso della relazione di PCR o della corsa elettroforetica tale da simulare un vero prodotto, ossia un vero picco. Esula dagli scopi del presente testo la trattazione di tale argomento in maggiore dettaglio.

4.4.2. In caso di DNA in scarsa quantità (al di sotto dei 100 pg²⁶) ci si trova in una condizione definita “Low Copy Number DNA” (LCN-DNA) o “Low Template DNA” (LT-DNA) o, con termine più attuale, “trace DNA” o “touch DNA” e rappresenta una delle condizioni di maggiore criticità nell’interpretazione di un risultato.

Sono estremamente numerose e sempre più frequenti – data la sensibilità degli strumenti oggi in uso – le situazioni in cui ci si trova ad esaminare DNA in scarsa o scarsissima quantità, lasciato su oggetti anche solo maneggiati con tracce non visibili o per trasferimento da un soggetto ad un altro. In questo ultimo caso si parla di “trasferimento secondario” (o anche terziario) che si produce allorquando un soggetto cede materiale biologico proprio o altrui ad un altro soggetto che a sua volta lo deposita su una superficie/reperito: in questo modo l’ultimo soggetto si fa portatore di materiale biologico/DNA di un soggetto con cui non è mai direttamente entrato in contatto. Allo stesso modo un oggetto con materiale biologico può cederlo ad un altro che a sua volta lo trasferisce su un terzo senza essere entrato in contatto con il primo. Situazione non infrequente, ad esempio, con gli indumenti²⁷, come riportato schematicamente in fig. n. 16.

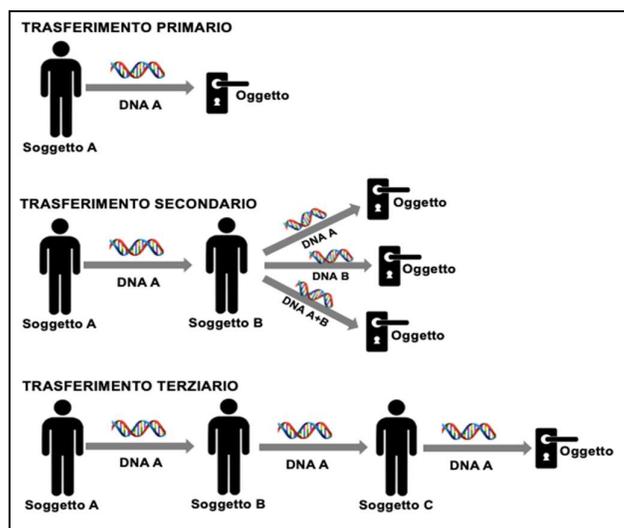


Fig. n. 16 Schema di trasferimento di DNA primario, secondario e terziario.

²⁶ Il dato quantitativo di 100 pg non è assoluto ma piuttosto riferito alla quantità ottimale di DNA da impiegare con i kit di uso forense che solitamente è di 5 volte maggiore.

²⁷ van Oorschot RAH, Szkuta B, Meakin GE, Kokshoorn B, Goray M. DNA transfer in forensic science: A review. (2019) Forensic Science International: Genetics 38: 140–166

Il termine LCN-DNA venne inizialmente riferito ad una tecnica di analisi più “spinta”, volta ad ottenere risultato positivo portando i protocolli analitici a condizioni-limite anziché condizioni di laboratorio standard, di cui si è accennato nell’introduzione. I termini “trace DNA” o “touch DNA” appaiono quindi più appropriati ad evitare malintesi.

Già nel 1997 alcuni autori (Findlay et al)²⁸ avevano avuto modo di registrare alcuni degli effetti più comuni legati all’analisi di DNA in quantità scarsa o scarsissima, tra i quali la perdita di alleli o **drop-out allelico**, l’inserimento di alleli (**drop-in**), l’incremento di fenomeni artefattuali²⁹. Insomma, una serie di situazioni che complicano molto la possibilità di interpretazione corretta di un profilo genetico ma che sono ormai di riscontro quotidiano nel laboratorio di genetica forense.

Tali fenomeni sono legati al cosiddetto effetto stocastico della reazione di PCR in base al quale la reazione di moltiplicazione moltiplica stocasticamente (a caso) il DNA presente in scarsa quantità nella miscela di amplificazione.

L’immagine che segue (Fig. 17) dovrebbe meglio chiarire il concetto: in caso di DNA in quantità ottimale (lato sinistro) vi è un prodotto di PCR con picchi bilanciati; in caso di DNA in quantità estremamente ridotta (trace-DNA) viene amplificato preferenzialmente uno o l’altro dei due alleli (sbilanciamento allelico) o, addirittura, uno solo di essi con sbilanciamento estremo con perdita di un allele, ossia drop-out allelico (lato destro dell’immagine).

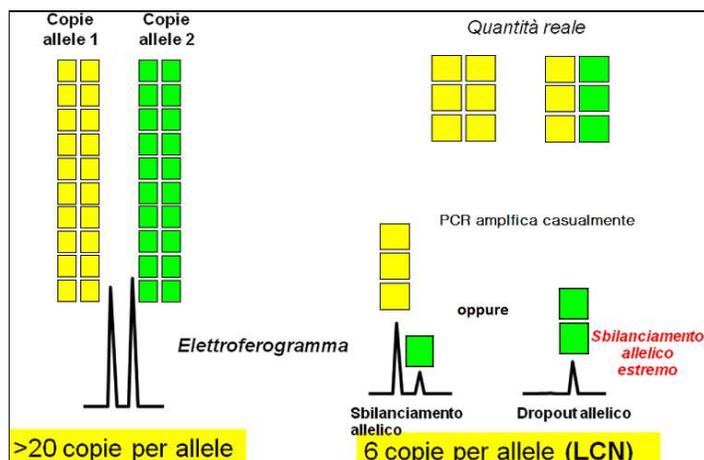


Figura n. 17. PCR: effetto stocastico. Il risultato dell’analisi con DNA in quantità ottimale è la produzione di un assetto eterozigote completo (a sinistra), mentre con quantità di DNA scarsissima la produzione di un assetto eterozigote sbilanciato (sbilanciamento allelico – penultimo a destra), oppure un falso omozigote (sbilanciamento allelico estremo – ultimo a destra).

²⁸ Findlay I, Taylor A, Quirke P, Frazier R, Urquhart A. DNA fingerprinting from single cells, Nature 389 (6651) (1997) 555–556.

²⁹ Molti dei termini tecnici qui citati sono ripresi nello “Schema di decreto del Presidente della Repubblica concernente regolamento recante disposizioni di attuazione della legge 30/6/2009, n. 85, concernente l’istituzione della banca dati nazionale del DNA e del laboratorio centrale per la banca dati nazionale del DNA (202)”.

L'immagine seguente (fig. n. 18) mostra, ingrandito ad un locus, l'esito di due analisi dello stesso DNA in quantità ottimale (parte superiore) ed in quantità "trace-DNA" (parte inferiore): il risultato è appunto la perdita di un allele (drop-out allelico)³⁰.

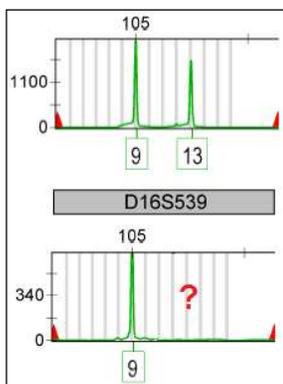


Figura n. 18. Analisi di uno stesso campione. Pannello superiore: DNA in quantità ottimale. Pannello inferiore: perdita di un allele (drop out allelico) a causa della scarsa quantità di DNA.

La perdita allelica (drop-out) è una delle conseguenze dell'effetto stocastico di PCR, a sua volta legato alla scarsa quantità di DNA, forse la più evidente e di complessa interpretazione ma, come detto, non l'unica, essendo possibili anche sbilanciamenti allelici, l'incremento di fenomeni artefactuali, il drop-in allelico.

4.4.3 La scarsa qualità del DNA estratto da un campione comporta conseguenze un poco diverse, evidenti nella figura seguente (fig. 19): scarsa qualità significa che il DNA ha subito un deterioramento che comporta la minore efficacia della reazione di PCR nell'amplificazione di frammenti a maggiore peso molecolare, ossia quelli sul lato destro della figura. In tale circostanza è possibile che uno dei due alleli di un profilo non venga amplificato, con conseguente perdita del picco.

Quando il fenomeno è più accentuato può verificarsi la perdita dell'intero locus per mancata amplificazione di entrambi gli alleli a quel locus con il risultato di un profilo parziale³¹ (si veda sopra).

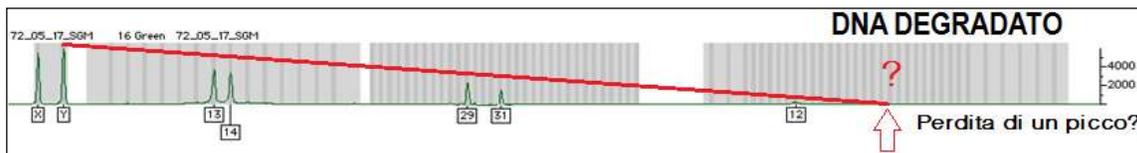


Figura n. 19. Perdita di un allele dovuta a scarsa qualità del DNA

³⁰ Butler JM (2014) Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation. Academic Press. 1 Edizione

³¹ Butler JM (2014) Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation, loc cit.

4.4.4 la ripetizione dell'analisi

Le situazioni di scarsa quantità e qualità del DNA, per i motivi sopra riportati, non possono che essere considerate di particolare difficoltà e, per tale motivo, la loro analisi richiede specifiche cautele. Una di queste – ancorché non l'unica – è la ripetizione dell'analisi, possibilmente utilizzando gli stessi parametri di laboratorio³². In condizioni di scarsa quantità/qualità di DNA è infatti possibile ottenere risultati anche diversi tra una ripetizione e l'altra, con conseguenti inevitabili contestazioni.

Almeno 10 loci dovrebbero fornire evidenza di ripetibilità dell'accertamento³³, mostrando il medesimo risultato che, diversamente, non può essere considerato attendibile.

La fig. n. 20 mostra il risultato di due analisi che, pur eseguite con le medesime tecniche e nelle medesime condizioni, mostrano risultati differenti.

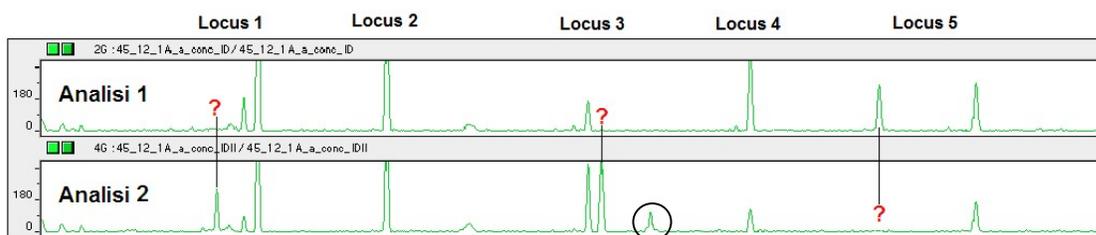


Figura n. 20. Stesso campione, due analisi (Analisi 1, Analisi 2), due diversi risultati. I punti interrogativi indicano la perdita (*drop-out*) di un allele presente invece nell'altra ripetizione. Cerchiato un allele in più (*drop-in*). In questo caso, la riproducibilità di risultato solo per pochi loci (locus 2 e locus 4) non consente di derivare un risultato affidabile. In caso di ripetibilità con almeno 10 loci il CT / perito può decidere per l'utilizzabilità del risultato.

Esistono tuttavia situazioni nelle quali il consulente tecnico / perito può invece derivare conclusioni differenti, le cui modalità interpretative devono però essere documentate³⁴.

4.4.5 L'acquisizione del risultato: note conclusive

Al termine di queste valutazioni (presenza di artefatti, valutazione della quantità/qualità del DNA, ripetizione dell'analisi), la “lettura dei risultati” si conclude con una delle operazioni di maggiore delicatezza e complessità dell'intero processo di analisi genetico-forense, ossia la valutazione della possibilità di procedere con il passo successivo, ossia con l'interpretazione del risultato oppure no. In altri termini, a questo punto si è chiamati a dare risposta alla domanda: il profilo ricavato è da

³² Gittelson S, Steffen CR, Coble MD (2016) Low-template DNA: A single DNA analysis or two replicates? *Forensic Science International*, 264, 139–145

³³ Raccomandazioni GeFI nelle indagini di identificazione personale. <http://www.gefi-isfg.org/temp/20112018100445.pdf>

³⁴ Raccomandazioni GeFI nelle indagini di identificazione personale. Loc cit.

considerarsi interpretabile oppure no? Gli artefatti o la scarsa quantità o qualità del DNA sono di grado tale da non renderlo interpretabile? La ripetizione del test è sufficiente a consolidare il risultato?

Il consulente / perito si trova quindi ad operare scelte in quell'area grigia nella quale deve decidere se propendere verso il colore bianco (è interpretabile) oppure verso il nero (non è interpretabile). Poiché quest'area di grigio è assai "liquida", potendo risentire della variabilità indotta da micro-variabili quali ad es. la pipettatura³⁵ dell'estratto di DNA, la variazione di frazioni di grado di temperatura degli strumenti, le stesse differenti strumentazioni, kit, condizioni di umidità, ecc., ecc., non è possibile inquadrarla più o meno rigidamente in parametri dotati di scientificità, quindi di riproducibilità ed affidabilità. E così il tutto è lasciato alla valutazione dell'esperto.

Il problema della "scientificità" nell'interpretazione si incontra normalmente anche nella fase di valutazione della significatività del "match" tra profili di soggetti di interesse e profili particolarmente complessi³⁶; di tale argomento si dirà nel prossimo paragrafo.

5. L'INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO ED IL CONFRONTO CON PROFILO GENETICO DI SOGGETTO DI INTERESSE

Il passo successivo a quello della acquisizione e della valutazione del risultato di un profilo (ad es. relativo ad una traccia) prevede il confronto con uno o più profili di interesse.

Tale confronto può fornire 3 tipi di risultato: compatibilità, incompatibilità, risultato non conclusivo.

Nel primo caso (compatibilità) non è possibile escludere il soggetto come possibile donatore della traccia, nel secondo si esclude tale eventualità, nel terzo non vi sono elementi sufficienti né per "attribuire" né per escludere, come spesso accade in caso di scarsa/scarsissima quantità di DNA o DNA particolarmente degradato.

Un esempio di compatibilità ed incompatibilità tra profili genetici è dato in tabella n. 2.

³⁵ Il termine tecnico "pipettare" si riferisce all'operazione di microprelievo di un'aliquota di estratto di DNA eseguito mediante appropriate pipette.

³⁶ Butler JM, Kline MC, Coble MD (2018) NIST interlaboratory studies involving DNA mixtures (MIX05 and MIX13): Variation observed and lessons learned. *Forensic Science International: Genetics* 37: 81–94

Locus	Traccia	Indagato 1	Indagato 2
D3S1358	12,14	13,13	12,14
VWA	14,15	15,17	14,15
D16S539	9,11	13,15	9,11
D2S1338	19,22	22,23	19,22
D8S1179	13,15	9,10	13,15
D21S11	30,31.2	30,32.2	30,31.2
D18S51	12,13	11,13	12,13
D19S433	15,15	13,13.2	15,15
TH01	7,9.3	9,9.3	7,9.3
FGA	22,24	21,23	22,24
Amelogenina	X,Y	X,Y	X,Y

Tabella n. 2. Incompatibilità genetica traccia-indagato n. 1. Compatibilità genetica traccia-indagato n. 2

La presenza di artefatti della reazione di PCR, e/o DNA in quantità scarsa/scarsissima, e/o di DNA proveniente da più soggetti (profili misti o complessi) e/o una commistione delle 3 cose sono tra gli elementi che maggiormente determinano le situazioni-limite di interpretabilità o di inconclusività: in tali casi il limite tra una situazione e l'altra può essere davvero difficile da discernere con conseguenti accessi dibattiti nelle aule giudiziarie.

Come già più sopra riportato, le situazioni-limite quanto ad interpretabilità rappresentano certamente il lato debole degli accertamenti genetico-forensi, quell'area grigia difficilmente incasellabile in schemi predefiniti.

Verranno ora descritte le principali considerazioni a proposito delle questioni interpretative più chiare e quelle relative a casi particolari, spesso all'origine di molte contestazioni.

5.1 Il risultato di incompatibilità genetica tra due profili

Qualora il profilo genetico sia di qualità sufficiente ad una interpretazione affidabile, privo cioè degli effetti della scarsa quantità e qualità del DNA di partenza, e per uno o più loci esaminati si rilevi la presenza di una diversa composizione allelica dal profilo di raffronto, è possibile escludere con certezza la comune provenienza.

Non esiste un numero minimo di incompatibilità genetiche per poter dichiarare l'esclusione della comune origine nel confronto, ad esempio, traccia-indagato: l'analisi di un pannello sufficientemente esteso di marcatori ed il rilievo di più incompatibilità consente una diagnosi di esclusione in via di certezza. Anche il singolo "mismatch" (l'incompatibilità anche per un solo allele), una volta accertato che tale singola incongruenza non sia dovuta ad artefatto tecnico, costituisce elemento sufficiente per dichiarare la non comune origine di due profili genetici (fig. 21).

Il risultato di esclusione non necessita di alcun calcolo statistico.

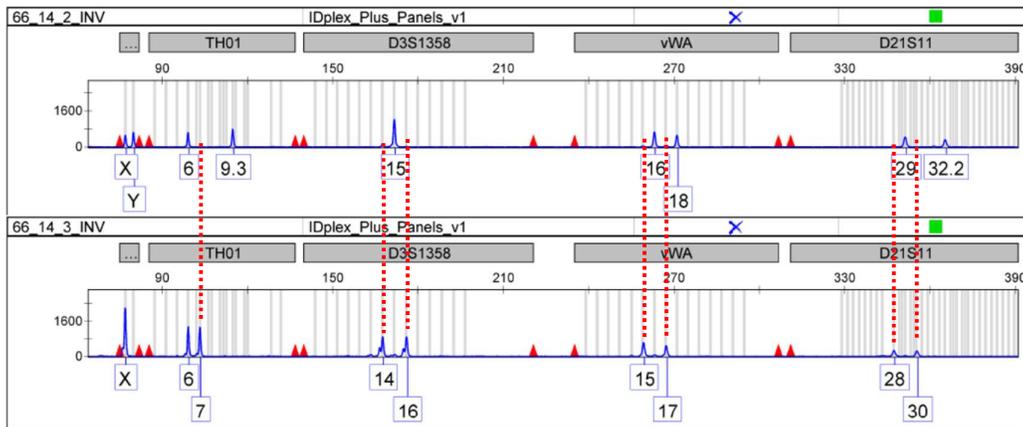


Figura n. 21. Profilo genetico chiaramente interpretabile, con incompatibilità per tutti i loci. Al locus TH01 i due profili condividono unicamente l'allele 6. I tratteggi rossi mostrano le incompatibilità.

Anche in caso di profilo misto o complesso, se uno o più alleli del soggetto di interesse (vittima / indagato) non sono presenti nel profilo in esame, vi è l'esclusione del soggetto come possibile contributore di quel profilo misto o complesso (figg. 22, 23).

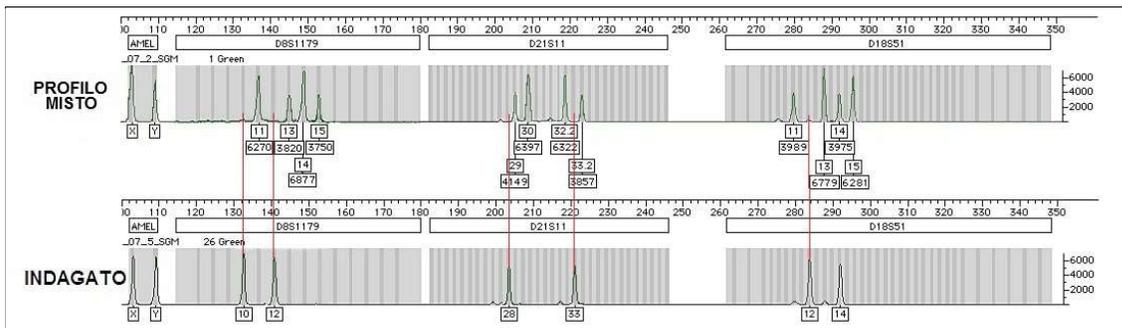


Figura n. 22. Incompatibilità tra un soggetto indagato ed una traccia con profilo misto. I tratti rossi indicano le incompatibilità.

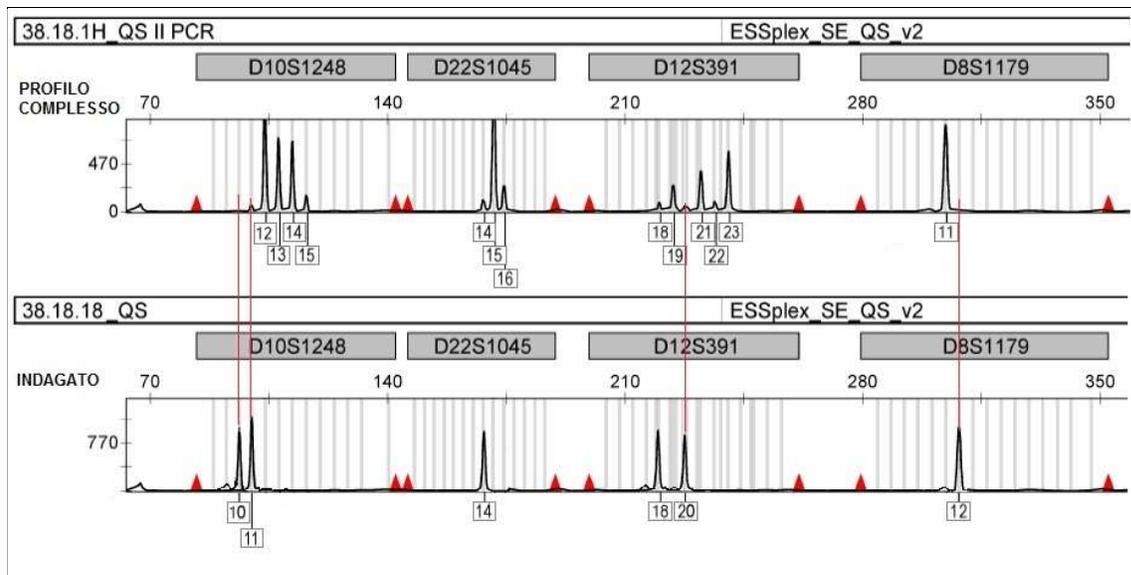


Figura n. 23. Incompatibilità tra un soggetto indagato ed una traccia con profilo complesso. I tratti rossi indicano le incompatibilità.

Esistono tuttavia situazioni nelle quali uno o più alleli della persona di interesse non compaiono nel profilo misto o nel profilo complesso mentre molti altri sono presenti.

La figura n. 24 mostra il risultato di un'analisi in cui, per tutti i loci tranne uno (il locus D18S51), nel profilo genetico della traccia si osservano anche le caratteristiche genetiche dell'indagato. Il profilo della traccia, quindi, presenta tutte le caratteristiche dell'indagato TRANNE UNA. Si tratta di incompatibilità genetica traccia-indagato oppure la mancata presenza dell'allele mancante può essere ricondotta ad un fenomeno artefattuale?

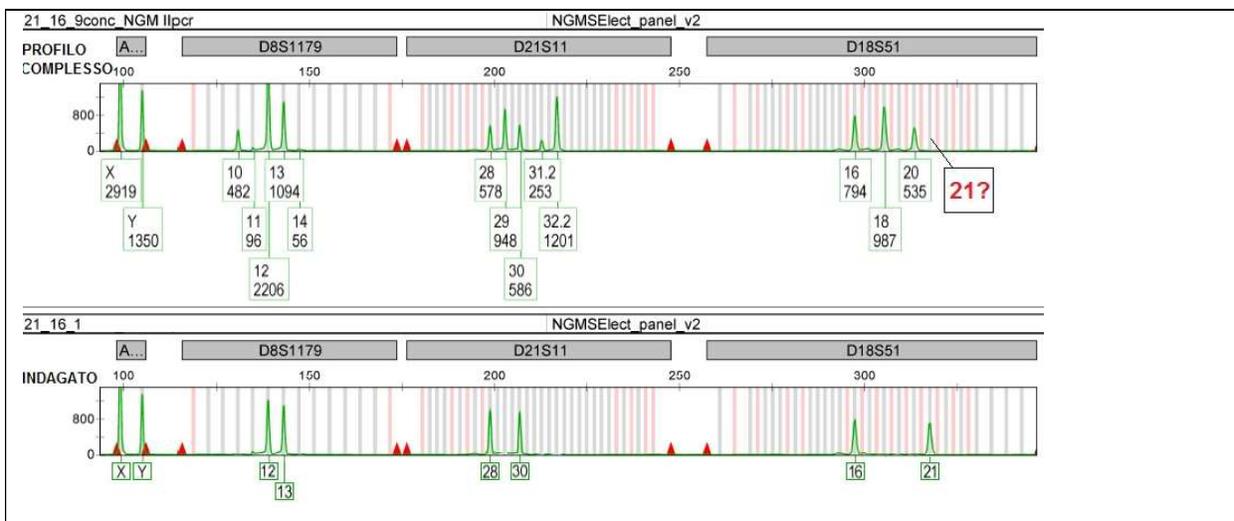


Figura n. 24. Incompatibilità tra un soggetto indagato ed una traccia con profilo complesso per un solo allele ad un solo locus e compatibilità per tutti i loci rimanenti: è vera incompatibilità o vi è stata "perdita" dell'allele 21, presente nel genotipo dell'indagato, a causa del fenomeno del *drop-out* a quel locus?

È questa un'altra situazione che presenta profili di estrema complessità, tali da generare contrasti anche violenti nelle aule giudiziarie. Al fine di effettuare una valutazione scientifica del risultato qualora nel profilo di una traccia non siano presenti tutte le caratteristiche alleliche del profilo della persona di interesse, sono state proposte delle soluzioni basate su un approccio statistico, delle quali si dirà nel paragrafo 5.2.3 (la genotipizzazione probabilistica).

5.2 il risultato di compatibilità genetica tra due profili e l'approccio statistico

In caso di compatibilità tra due profili, qualora non vi siano problemi legati agli effetti della scarsa quantità e qualità del DNA di partenza, e per tutti i loci esaminati si rilevi piena corrispondenza tra gli assetti genetici esaminati, è possibile prospettare la comune origine dei due profili genetici.

La “semplice” corrispondenza di due profili genetici non è sufficiente per decretarne la comune origine: è infatti necessario domandarsi quale sia la significatività, ossia il “peso” di tale compatibilità. In altri termini: quanti altri soggetti casualmente possono condividere il medesimo profilo genetico rilevato identico nella traccia e nell'indagato?

Si tratta quindi di effettuare una valutazione di tipo statistico.

Il caso più semplice è quello che vede il confronto tra un profilo singolo (ad es. di una traccia con un unico contribuente) ed un soggetto di interesse (vittima / indagato – fig. n. 25).

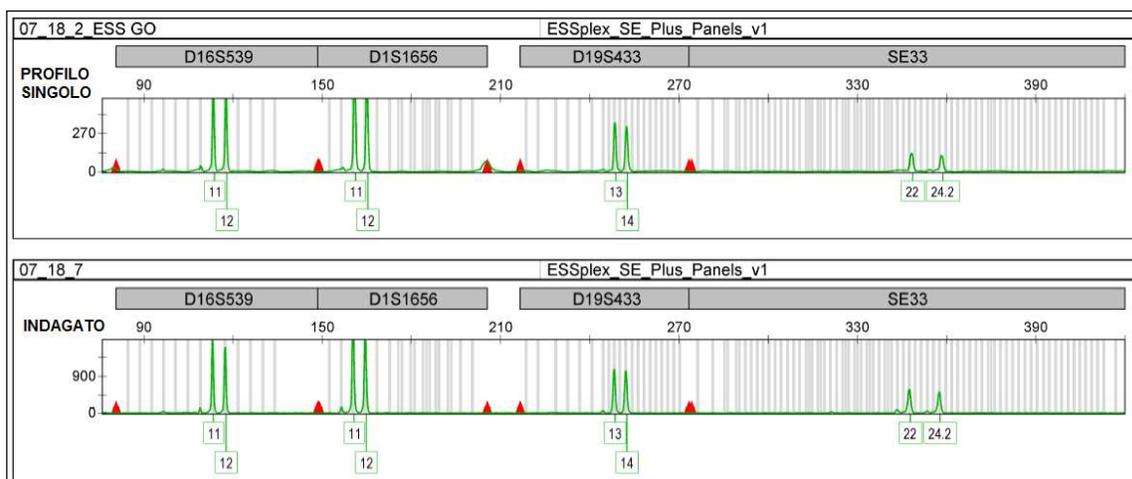


Figura n. 25. Esempio di compatibilità tra un soggetto indagato ed una traccia con profilo singolo

5.2.1 Compatibilità indagato-traccia. Profili singoli

In base alla conoscenza della distribuzione delle frequenze degli alleli dei loci esaminati, le frequenze a ciascun locus vengono moltiplicate tra loro ottenendo un valore finale che rappresenta la

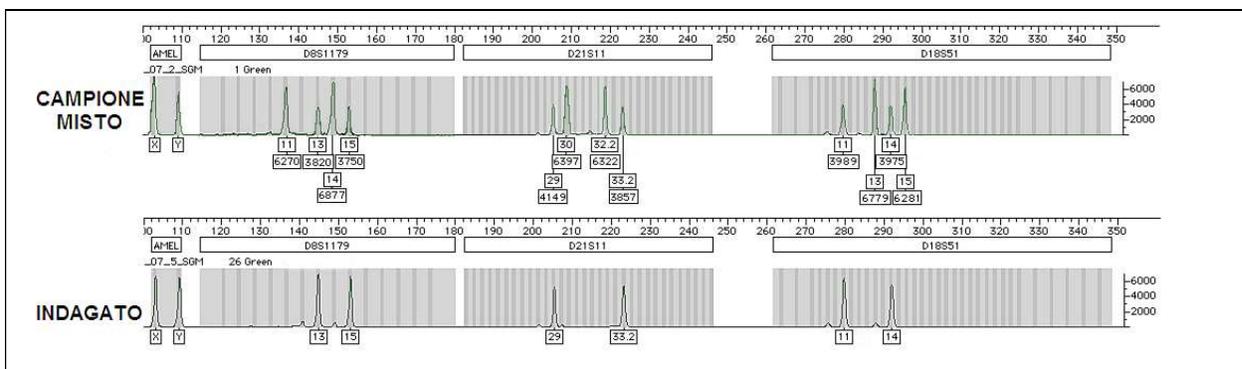


Fig. n. 26. Compatibilità profilo misto-indagato

La figura 26 consente altresì di apprezzare la presenza di una componente maggiore (i picchi più alti) ed una minore (i picchi più bassi), cosa che a sua volta consente di individuare i profili dei contributori: il contributore 1 è quello con componente maggioritaria, il contributore 2 è quello con componente minoritaria. Tale processo è anche definito *deconvoluzione* dei profili.

A questo punto, derivati i profili, è possibile confrontarli con il/i soggetto/i di interesse, che in questo caso potrebbero essere l'indagato e la vittima i cui profili sono riportati in fig. 27.

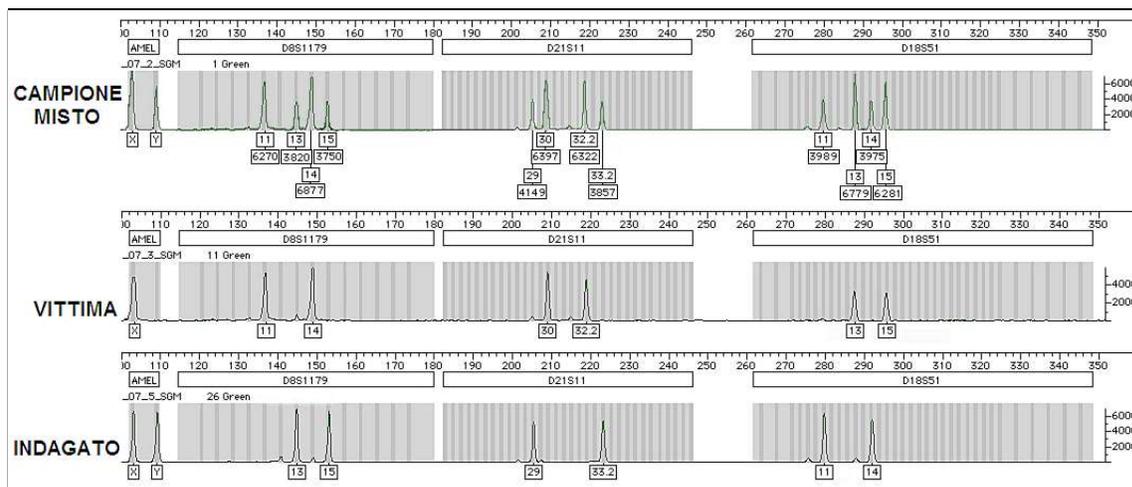


Fig. n. 27. Deconvoluzione del profilo misto: le due componenti sono risolvibili nei profili di indagato e vittima

In tali casi l'approccio statistico, volto come detto a definire la significatività della osservata non incompatibilità, segue le stesse modalità indicate per i profili singoli nel par. 5.2.1.

5.2.3 Compatibilità indagato-traccia. Profili complessi

In caso di profilo complesso, come detto, non è possibile derivare le componenti dei diversi contributori.

Una volta acquisito il profilo e valutatane la “complessità”, l’unica operazione possibile è quella di confrontarlo con il profilo della/e persona/e di interesse.

La figura 28 mostra come, all’interno del profilo complesso, sia possibile rilevare anche le caratteristiche genetiche dell’indagato.

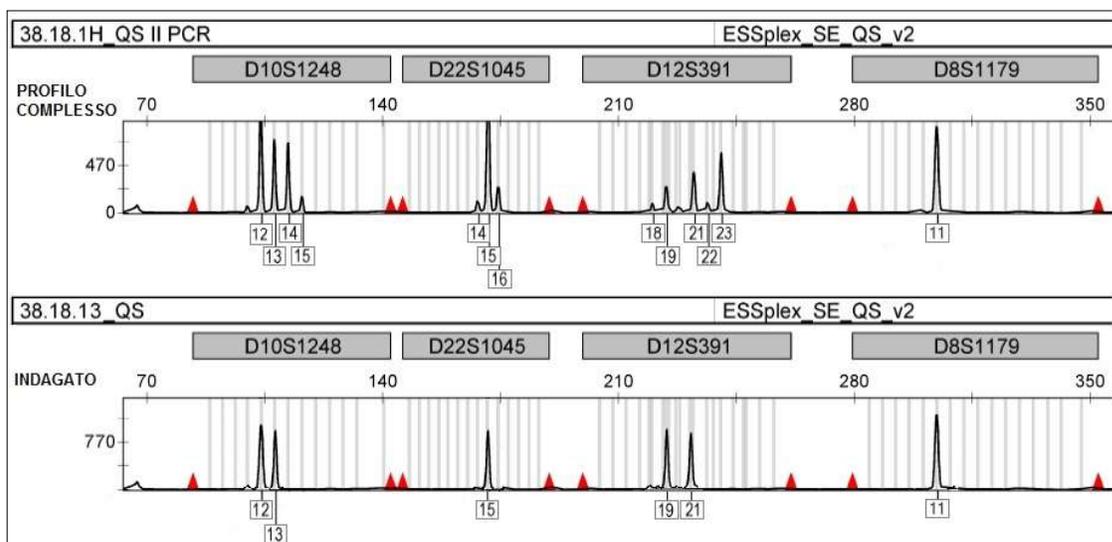


Fig. n. 25. Profilo complesso a confronto con il profilo di un soggetto indagato

In tali casi l’approccio statistico volto ad accertare la significatività della osservata non incompatibilità è assai differente da quello abbastanza semplice descritto nelle pagine precedenti: le frequenze degli alleli condivisi non sono infatti l’unico parametro da inserire nel calcolo statistico che si arricchisce di altri parametri, quali i risultati della ripetizione dell’accertamento, la presenza e posizione degli artefatti, l’altezza dei picchi, ecc.

La situazione certamente più critica è quella già in parte descritta al punto 5.1 ed in fig. n. 24, ossia allorquando le caratteristiche genetiche di un soggetto di interesse non siano tutte presenti nel profilo complesso. In tali casi la domanda è: mancano caratteristiche alleliche poiché si tratta di soggetti differenti (il soggetto di interesse non è tra i contributori del profilo misto), oppure il soggetto di interesse è tra i contributori e la mancanza di alcuni alleli è da ascriversi a fenomeni artefattuali ed alla scarsa quantità/qualità del DNA?

Al fine di ridurre la discrezionalità interpretativa a carico dell'operatore, sono stati sviluppati sistemi statistici, elaborati in software, che inseriscono nel calcolo anche la probabilità di drop-out (ossia la “scomparsa” di un allele), la probabilità di drop-in (ossia la “comparsa” di un allele dovuta a fenomeno artefattuale).

Tale modalità interpretativa, quindi, trova nella matematica delle probabilità una solida base scientifica, contribuendo in modo sostanziale ad una valutazione maggiormente scevra dai condizionamenti da parte dell'operatore: si è così introdotto il concetto della cosiddetta “genotipizzazione probabilistica” (*probabilistic genotyping*)³⁷.

Si tratta di un importante avanzamento scientifico, basato sul teorema di Bayes, che non deve però essere considerato – come spesso accade quando si utilizzino software più o meno avanzati – come l'unica soluzione a problemi complessi, il principale dei quali risiede “a monte” dell'operazione di genotipizzazione probabilistica: il profilo ottenuto può essere considerato “interpretabile”? Le condizioni di scarsa quantità / qualità del DNA, gli artefatti o la parziale ripetibilità dell'analisi consentono di formulare giudizio di interpretabilità per quel dato profilo? A queste domande, ovviamente, l'utilizzo del software di genotipizzazione probabilistica non può dare risposta (par. 4.4.5).

Sono infatti molte le variabili che influenzano il risultato (quali le diverse condizioni d'uso, le variazioni di temperatura, di strumenti, ecc.), tanto che la possibilità di un'interpretazione “asettica”, inquadrata da parametri scientifici rigorosi e non soggetti alle fluttuazioni operatore-dipendenti non appare oggi prospettabile, né lo sembra nell'immediato futuro³⁸.

5.3 Il risultato non conclusivo

Tale fattispecie non merita particolare commento.

Si ha risultato non conclusivo quando vi sia assenza di picchi a più loci, prova del fallimento della reazione di PCR, oppure quando il risultato non sia ripetibile. In tale circostanza la scarsa quantità di DNA presente nella reazione di PCR fa sì, ripetendo l'analisi, che non si ottenga lo stesso risultato dell'analisi precedente (si veda il paragrafo relativo ai problemi tecnici nell'interpretazione del risultato).

³⁷ Gill P, Haned H, Bleka O, Hansson O, Dørum G, Egeland T. (2015) Genotyping and interpretation of STR-DNA: Low-template, mixtures and database matches - Twenty years of research and development. *Forensic Science International: Genetics* 18: 100–117.

³⁸ Butler JM, Kline MC, Coble MD (2018) *Loc cit*

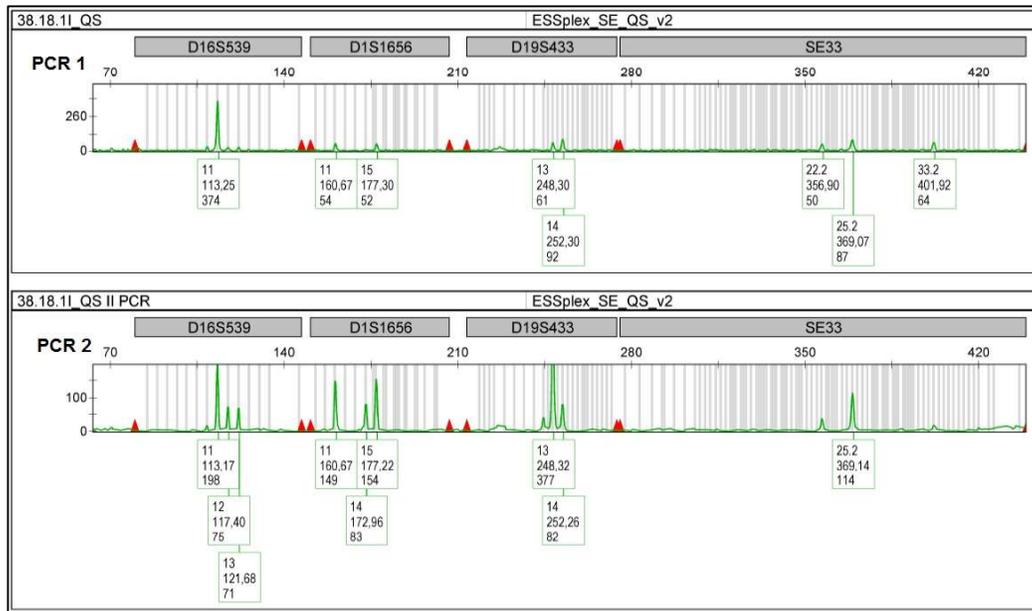


Fig. n. 26. Due analisi dello stesso campione (PCR 1 e PCR 2): risultato non conclusivo per mancanza di ripetibilità dell'accertamento.

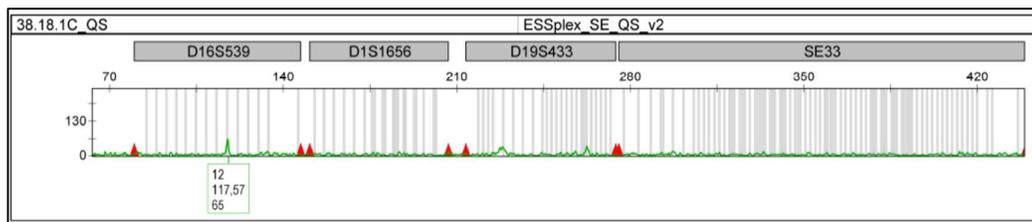


Fig. n. 27. Risultato non conclusivo per insufficiente quantità di DNA.

6. LA RICOSTRUZIONE DEL FATTO

Nei circa 30 anni di storia del DNA forense si è assistito ad un impressionante miglioramento della sensibilità di analisi, ossia della possibilità di analizzare quantità di DNA sempre più ridotte: si è passati dall'esame di tracce abbondanti, sempre "visibili" (macchie di sangue o liquido seminale), all'esame di quantità infinitesime, rilevabili su oggetti anche solo maneggiati. Mentre nel primo caso il rilievo di DNA in una traccia visibile poteva consentire un'agevole ricostruzione del fatto, indicando il contributore della traccia con affidabilità sconosciuta nella precedente epoca delle analisi dei gruppi sanguigni, nel caso di rilievo di DNA in quantità infinitesime i problemi interpretativi si sono moltiplicati. Qual è la rilevanza del rilievo di un profilo di DNA su un oggetto? Con quale modalità il materiale biologico è stato depositato su tale oggetto? In che circostanze? Quando? Di che materiale biologico si tratta? Sono tutte domande alle quali è spesso molto difficile se non impossibile dare risposta.

Infatti il “solo” rilievo di un profilo di DNA non è più sufficiente a definire le responsabilità di un soggetto: il DNA è ovunque ed ovunque si trovi può esservi stato trasferito attivamente o passivamente (si veda paragrafo 4.4.2 – trasferimento secondario e terziario) sia prima che il fatto criminoso sia stato commesso, sia durante (con o senza connessione al crimine), sia successivamente ad esso.

Il fatto poi che, in caso di scarse o scarsissime quantità di DNA, non si sia in grado di definirne l’origine biologica (è sangue, saliva, cellule cutanee, ecc.?), così come l’impossibilità di definire, ad es. in una mistura sangue-saliva, chi abbia lasciato cosa, aggiungono incertezza ad incertezza. Molti laboratori stanno dedicando energie e risorse nella ricerca di nuovi metodi per il rilievo di marcatori caratteristici di liquidi e tessuti biologici ma, ad oggi, non è stato raggiunto un accordo sul metodo scientifico d’elezione. Anche in caso di successo di queste nuove metodiche va comunque ricordato che, in caso di scarsissime quantità di materiale biologico-DNA, nessun metodo è in grado di assicurare contemporaneamente la definizione del materiale di partenza E il profilo del DNA.

La semplice presenza di materiale biologico-DNA su di un reperto, come detto, non consente di ricostruire la modalità con la quale tale materiale biologico-DNA sia stato depositato: se in modo violento o “innocente”.

La ricerca scientifica su questo argomento ha consentito di conseguire interessanti risultati quanto a modalità di trasferimento (più o meno energetico), sulle caratteristiche del rilievo di DNA al di sotto dei margini ungueali (se a seguito di graffiatura o per contatto innocente)^{39,40} ed in poche altre situazioni.

Quando si proceda all’interpretazione del rilievo di DNA in casi di trasferimento secondario, è necessario in primo luogo prospettare un ordine di accadimento degli eventi e le possibili variabili che ad essi si siano accompagnate, variabili che includono situazioni precedenti o coeve rispetto ai fatti di interesse.

In questi casi il dato scientifico ottenuto è di tipo statistico, derivato da casistica sperimentale e non da vera casistica forense: la ricerca – su casi simulati – consente di stabilire che in una certa percentuale di casi il rilievo di DNA al di sotto delle unghie avviene con modalità violenta, mentre in un’altra percentuale ciò non avviene, che in una certa percentuale il grado di intensità di pressione di

³⁹ Cook O, Dixon L (2007) The prevalence of mixed DNA profiles in fingernail samples taken from individuals in the general population, *Forensic Sci. Int. Genet.* 1 (1): 62–68.

⁴⁰ Matte M, Williams L, Frappier R, Newman J (2012) Prevalence and persistence of foreign DNA beneath fingernails, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2): 236–243.

un oggetto lascia più o meno DNA, che il trasferimento di DNA da un oggetto ad un altro può essere avvenuto secondo un certo ordine, ecc.

Una ricostruzione realmente scientifica dovrebbe essere in grado di fornire percentuali accurate in merito a tutte le situazioni di trasferimento del DNA (almeno le più comuni). La domanda da porsi in tali casi, per un corretto approccio scientifico dovrebbe essere: in quanti casi è possibile rilevare DNA (e se sì, in quale quantità) su un determinato oggetto dopo un determinato tipo di manipolazione? Su questa ricostruzione-base potrebbero inserirsi innumerevoli variabili quali la caratteristica di un soggetto di rilasciare più o meno DNA, il fatto che più persone abbiano partecipato, che le mani fossero contaminate da altro DNA, che la superficie di recupero del DNA fosse già venuta a contatto con altro o lo stesso DNA, ecc., ecc.

Ogni caso è diverso e la realtà del singolo caso, con tutte le variabili ad esso connesse, non consente di individualizzare le ricostruzioni; tuttavia l'approccio scientifico-statistico consente certamente di avere un minimo grado di conoscenza in più a disposizione del giudice o dell'investigatore.

La ricostruzione di un evento quindi, non può prendere le mosse unicamente dal dato scientifico: il dato scientifico dovrà ancora una volta – ed a maggior ragione in questi casi – essere oggetto di attento esame da parte del giudice, in grado com'è di percepirne i limiti e, insieme con gli altri elementi di cui dispone, farne un uso appropriato.

Allo stesso modo il PM e l'investigatore dovranno accuratamente evitare l'errore di semplificare oltremisura un risultato qualora incompleto di informazioni essenziali quanto alla natura del materiale biologico in esame, alle sue modalità di deposizione, alla presenza di profili genetici parziali o complessi.

Compito dell'esperto sarà quindi quello di condurre il giurista verso la migliore e più prudente interpretazione del dato nel contraddittorio delle parti.

7. L'ESPOSIZIONE DEI RISULTATI IN TRIBUNALE

Dunque, il ruolo dell'esperto si compie e si completa non già e non solo in laboratorio, ma anche in tribunale.

Tuttavia, affinché il contributo dell'esperto sia valutato per la sua effettiva capacità esplicativa ovvero (e ancora peggio) non abbia effetti fuorvianti, vi è necessità di una corte che sia – in tutte le sue componenti umane (accusa, difesa e giudici) – realmente in grado di comprendere il significato di questo apporto di conoscenza, di coglierne le eventuali criticità e di distinguere i dati scientificamente

inconfutabili da quelli frutto di interpretazione soggettiva. Stiamo parlando davvero di un passaggio assolutamente fondamentale. Va infatti sottolineato che la scienza gode di un peculiare livello di validità intersoggettiva capace di esercitare un forte impatto sul soggetto profano. Per il “non scienziato” è veramente molto facile abbassare la propria soglia critica e cadere vittima di un meccanismo di fascinazione (c.d. *science fascination*) che lo induce a ritenere indiscutibilmente vero ciò che viene presentato come “scientifico” anche se tale non è.

Non è possibile parlare dell’apporto della genetica forense al processo in modo disgiunto dalla formazione professionale e culturale di chi di quell’apporto dovrebbe giovare.

Bene, esistono almeno due studi empirici che dimostrano come la capacità di ragionamento individuale venga significativamente incrementata anche da sessioni di training molto brevi ed essenziali⁴¹. Ovviamente, tutto sta nello strutturare in modo efficace – oserei dire scientificamente corretto dal punto di vista cognitivo – le informazioni che vengono fornite.

Nel primo studio 347 soggetti sono stati sottoposti a 18 problemi statistici (appartenenti a tre categorie, probabilistici, oggettivi e soggettivi)⁴², alcuni dei quali risolvibili anche attraverso la legge dei grandi numeri o teorema di Bernoulli. Prima dell’esperimento, i candidati sono stati sottoposti ad un breve training consistente nella descrizione essenziale della legge dei grandi numeri e del significato del ragionamento a campione. Il risultato è stato quello di un incremento significativo delle applicazioni di regole statisticamente corrette ai problemi sottoposti.

Nel secondo lavoro, si è cercato di capire cosa è necessario per aumentare le “prestazioni” di una giuria posta davanti al problema dell’accertamento del nesso causale in controversie riguardanti patologie asseritamente legate all’esposizione a sostanze tossiche (in questo caso, il nesso era tra l’insorgenza di una patologia polmonare e l’esposizione al berillio). L’esperimento prevedeva un processo simulato in cui venivano presentate, da un teste esperto, quattro versioni di uno studio empirico volto a dimostrare l’esistenza del nesso causale. Solo una versione di questo studio era corretto. Mentre le altre tre violavano, alternativamente, uno dei noti criteri causali di Stuart Mill: la regola della variazione concomitante, la regola della precedenza temporale e la regola della *nonspuriousness*⁴³.

⁴¹ FONG G. T., KRANTZ D. H., NISBETT R. E., *The Effects of Statistical Training on Thinking About Everyday Problems*, in 18 “Cognitive Psychol.”, 253-292 (1986); SCHWEITZER N. J., SAKS M. J., *Jurors and Scientific Causation: What Don't They Know, and What Can Be Done About It ?*, in “Jurimetrics”, vol. 52, 2012, 4, 433. I due studi forniscono dei dati iniziali e sicuramente da approfondire. Ad esempio, in entrambi i casi le informazioni scientifiche sono state fornite subito prima del test. Non si sa se i risultati cambierebbero a distanza di tempo. Ma si tratta, senza dubbio, di un tema fecondo.

⁴² Nel primo caso era richiesto di giungere ad una conclusione sulle caratteristiche di una popolazione avendo a disposizione dati generati in modo randomizzato, nel secondo caso avendo a disposizione dati oggettivi e nel terzo caso dati soggettivi). In tutti i casi stiamo parlando di un tipo di ragionamento essenziale per valutare l’attendibilità delle conclusioni relative alle frequenze statistiche di determinati alleli nella popolazione.

⁴³ Cioè la serie causale non deve essere influenzata da eventi spuri. In questo caso, per violare il principio, lo studio inseriva un elemento confondente costituito dalla presenza di una seconda molecola in aggiunta al berillio.

Anche in questo caso la giuria era stata preparata con la presentazione di un articolo di quattro pagine sulla causalità e una scheda di due pagine su alcuni casi pratici. Il risultato è stato che la giuria precedentemente “formata” ha spuntato risultati migliori nella capacità di intercettare due dei tre studi viziati. L’obiettivo è stato ottenuto non spiegando alla giuria cosa fosse il berillio e che cosa ne pensavano gli scienziati, ma cercando di educare le persone a ragionare autonomamente in modo scientificamente corretto.

Questi due esperimenti dimostrano come sia fondamentale investire sulla formazione e sul training degli operatori del diritto. Naturalmente non si tratta di trasformare il giudice in un biologo, in un genetista, in uno statistico. Si tratta, piuttosto, di insegnare al giurista che cosa è scienza e che cosa non lo è secondo i costrutti epistemologici del sapere scientifico (ripetibilità, riproducibilità, condivisione della comunità di riferimento...). Si tratta di tenere presente la piramide della conoscenza (meta-analisi, revisioni sistematiche, studi randomizzati...), in cui la mera opinione dell’esperto si colloca ai piedi del sapere e non al vertice, come invece spesso si sente dire nelle aule dei tribunali. In questo modo il giurista non diventa un biologo, ma sa cosa chiedere al biologo (o chi per lui) e sa capire quando il biologo esprime un’opinione e non un dato verificato.

Un ambito specifico per il quale la formazione dovrebbe essere davvero obbligatoria per tutti è quello della statistica. Nelle pagine precedenti si è visto che il giudizio di compatibilità genetica è anche il risultato dell’applicazione di regole statistiche e che – nei casi complessi – l’approccio statistico svolge un ruolo fondamentale. Incredibilmente il giurista semplicemente ignora tutto ciò. Quindi al giurista si chiede di attribuire un “peso” a elementi di conoscenza che egli non sa come vengano generati e il cui significato probatorio difficilmente è in grado di apprezzare in modo appropriato. Tuttavia, anche questo si può imparare, apprendendo i fondamenti della statistica e insegnando agli esperti ad utilizzare un linguaggio che favorisca la comprensione delle probabilità.

7.1 Selezione dell’esperto

Una volta che si è fatto di tutto per garantire di disporre di una corte sufficientemente consapevole, si dovrebbero anche predisporre analoghi sforzi per assicurare la qualità a priori dell’esperto e la sua completa e reale indipendenza. Come ben noto, il giudice penale ed anche il pubblico ministero non hanno vincoli, né indicazioni nella scelta del proprio esperto, se si eccettua per la scarsamente significativa (almeno per come è, oggi, concepita) iscrizione all’albo dei periti e consulenti. Quindi, è il passaparola che, il più delle volte, orienta verso un nome piuttosto che un altro. Il che non è proprio un gran criterio di selezione.

Per contro, si è ormai compreso che significativa parte degli accertamenti genetici presuppongono interpretazioni soggettive e trattano dati qualitativi, piuttosto che quantitativi. Quindi, le capacità personali dell'esperto sono in grado di condizionare in modo pesante il risultato.

Peraltro, ragionando per analogia, si intravede qualche novità. L'articolo 15 della legge 24/2017 in materia di responsabilità medica stabilisce che le consulenze vadano affidate a “specialisti nella disciplina che abbiano specifica e pratica conoscenza di quanto oggetto del procedimento”. Questi specialisti vanno scelti entro un albo dal quale dovrà risultare “l'esperienza professionale maturata, con particolare riferimento al numero e alla tipologia degli incarichi conferiti e di quelli revocati”. Questa disposizione ha innescato un percorso virtuoso che ha condotto alla sottoscrizione di un protocollo d'intesa tra Consiglio Superiore della Magistratura, Ordine dei Medici Chirurghi e Odontoiatri e Consiglio Nazionale Forense, per la revisione dell'albo dei consulenti; revisione che è già cominciata. Ora, se si avverte l'esigenza di non affidare una consulenza cardiocirurgica a chi non ha mai praticato cardiocirurgia non si capisce davvero perché si possa affidare una consulenza su un campione biologico misto a chi non ha mai trattato quel tipo di analisi.

Una volta chiarito che l'esperto deve essere scelto tra coloro che assicurano determinati standard di qualità minimi, è anche molto importante consentire alle parti di verificare in modo rigoroso questa “qualità” nella fase iniziale del contraddittorio processuale. Le credenziali dell'esperto devono essere sottoposte a un rigoroso scrutinio. Purtroppo questo accade assai raramente nella nostra esperienza processuale anche e soprattutto per responsabilità delle corti, che tendono a ritenere inammissibili divagazioni o domande impertinenti tutte quelle domande rivolte a sondare la formazione professionale dell'esperto, la sua esperienza sul campo, il suo curriculum personale anche scientifico⁴⁴.

7.2 Linee guida

Le linee guida (o protocolli che dir si vogliano) sono procedure standardizzate e condivise dalla comunità scientifica di riferimento ritenute il *gold standard* in un determinato settore. Senza necessariamente dovere essere estrofili a tutti i costi, il GeFi (società scientifica dei genetisti forensi italiani) ha approvato — nel 2018 — due documenti rispettivamente dedicati alle raccomandazioni nelle indagini di identificazione personale e di accertamento parentale. I documenti sono ovviamente consultabili e scaricabili da chiunque. Naturalmente esistono linee guida prodotte da autorevoli enti —

⁴⁴ La Corte di Assise di Varese, n. 1/2018 (nel noto cold case dell'omicidio di Lidia Macchi) spende toni inusitatamente duri sulla consulente della difesa, che si era permessa di mettere in dubbio le risultanze grafologiche della consulente del pubblico ministero. La corte taccia la consulente dell'imputato di slealtà ai limiti della diffamazione e di metodo “ascientifico”. Peccato che questa consulente venga poi riabilitata in appello (Corte Assise Appello Milano, n. 32/2019) dove la corte, con ben maggiore accortezza, pone a confronto le due consulenti, evidenziano criticità e punti di contatto nel lavoro di ciascuna di esse, in un esemplare esercizio di contraddittorio orale.

ad esempio da Enfsi (European Network of Forensic Science Institutes — in tantissimi settori di interesse scientifico ... dalle impronte digitali, all'analisi di stupefacenti etc.

Già si è detto che alle linee guida la suprema corte dedica particolare attenzione, esigendone il rispetto. Naturalmente l'esistenza di linee guida in un particolare settore ed il fatto che queste siano state rispettate non vuol dire che quella specifica analisi sia poi indiscutibilmente corretta. Tuttavia, la disponibilità di linee guida e, ovviamente, la loro conoscenza da parte della corte rappresentano un punto di partenza importante per consentire al tribunale la corretta valutazione degli elementi offerti dall'esperto

7.3 Contraddittorio

Le premesse imprescindibili sono, dunque, una corte (in)formata sui principi che regolano la formazione del sapere scientifico e uno o più esperti in grado di assicurare uno standard di qualità elevato e controllabile. Con questi ingredienti, si deve poi passare all'ultima fase che è quella della presentazione e della discussione delle conclusioni. Da parte di diversi osservatori si è evidenziata la scarsa o nulla abitudine delle corti a sollevare unilateralmente questioni sull'attendibilità della prova scientifica. Se questo è vero – e probabilmente lo è – la missione è quella di addestrare le parti a fare bene il loro lavoro, perché il ruolo dell'accusa e della difesa nel contribuire al processo di *decision-making* è fondamentale.

E poi si può tentare di migliorare la performance di esame e controesame. Il sistema australiano adotta la modalità della *concurrent evidence*, detta più comunemente “hot tubbing”. La *concurrent evidence* è una procedura in cui tutti gli esperti sono presenti in una seduta comune. Gli esperti espongono la loro *opinion*. Poi ciascuno esprime la propria *opinion* su quella degli altri. Infine tutti vengono esaminati e controesaminati dalle parti. Non solo. Ciascun esperto ha la possibilità di commentare le valutazioni degli altri esperti, porre domande, chiedere chiarimenti. Questa sorta di discussione strutturata dovrebbe favorire l'emersione – anche agli occhi del giudicante – dei punti critici nelle teorie e conclusioni applicate dagli esperti e dovrebbe limitare la possibilità per gli stessi di formulare affermazioni troppo “ardite”. Secondo i suoi sostenitori, le principali virtù della *concurrent evidence* sono: riduzione della “partigianeria”, riduzione dell’“adversarial bias”, miglioramento della comprensione, riduzione dei costi. Sicuramente non sarà proprio e sempre così. E' impossibile e inutile dilungarsi, in questa sede, sulle critiche mosse al metodo da parte della dottrina australiana. Ma le potenzialità per incrementare l'efficacia dell'esame dibattimentale non meritano di essere ignorate.

Un'altra tecnica, suggerita questa volta dalla psicologia cognitiva, è quella del cosiddetto "avvocato del diavolo". Cioè si tratta di porre a confronto l'esperto con qualcuno di pari competenza che, per "ruolo" ma sempre con imparzialità (e quindi non al servizio di una delle parti), assuma una posizione contraria al fine di suscitare una discussione sui possibili punti controversi.

In definitiva, la fase di acquisizione della prova dovrebbe avvenire con le migliori modalità possibili.

Questa ottimizzazione delle procedure deve coinvolgere anche l'esperto, almeno sotto due punti di vista.

Il primo concerne la scelta di un linguaggio comprensibile per la corte, chiaro e tale da presentare le conclusioni in modo non fuorviante.

Il secondo concerne il superamento di atteggiamenti eccessivamente di parte o fortemente polarizzati sulla posizione della parte assistita (soprattutto questo vale per gli esperti del PM o delle altre parti private). È noto che la collocazione processuale degli esperti di parte, nel sistema processuale italiano, è quantomeno ambigua. Il consulente, come noto, non è assimilabile ad un testimone. Egli è un ausiliare della parte, pubblica o privata che sia e quindi non è avvertito dell'obbligo di dire la verità e delle conseguenze penali sussistenti in caso di sua violazione. A questa situazione parte della giurisprudenza di merito ritiene di porre rimedio obbligando a giurare il consulente sui fatti posti a fondamento delle sue valutazioni. Cioè, almeno quelli – obiettivi e inconfutabili – devono essere veri. Naturalmente, si tratta di una forzatura obiettivamente non prevista dal codice e di limitata efficacia.

Il tema degli obblighi di condotta del consulente non è solo italiano. Altri hanno pensato di agire in modo esplicito. E così il sistema giudiziario australiano ha implementato, dal 2013, un vero e proprio codice di condotta per tutti gli esperti. Le prime tre regole stabiliscono che: "1.1 An expert witness has an overriding duty to assist the Court on matters relevant to the expert's area of expertise; 1.2 An expert witness is not an advocate for a party even when giving testimony that is necessarily evaluative rather than inferential; 1.3 An expert witness's paramount duty is to the Court and not to the person retaining the expert". Si tratta di affermazioni molto forti e che pongono un netto solco rispetto al consulente/ausiliare della nostra dottrina e giurisprudenza.

Non meno interessante il fatto che l'expert report (cioè la nostra consulenza o perizia) debba necessariamente indicare training, studi ed esperienze che hanno consentito all'esperto di acquisire una specializzazione nella sua particolare materia, debba separare in modo netto fatti ed opinioni e specificare le ragioni scientifiche sulle quali le opinioni si fondano. Infine, l'esperto deve dichiarare di essersi conformato al codice di comportamento prescritto.

Anche l'*Enfsi* ha istituito un codice di condotta, questa volta vincolante solo moralmente e non legalmente. Tra le varie prescrizioni, si dice che il dovere primario del consulente è verso la giustizia;

che il consulente deve agire solo nell'ambito delle proprie competenze; che deve operare sulla base di principi condivisi in ambito professionale, utilizzando metodologie scientificamente validate ed equipaggiamento appropriato e idoneo; che deve presentare le proprie conclusioni in modo equilibrato e imparziale.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'analisi del DNA in ambito forense ha rappresentato e rappresenta certamente uno dei più significativi avanzamenti sia nelle indagini giudiziarie sia come mezzo di prova nei settori penale e civile: si pensi alla possibilità di escludere un soggetto erroneamente accusato di un crimine da ascriversi invece ad un altro, piuttosto che agli accertamenti giudiziali della paternità, materia ormai pressoché completamente delegata alle analisi tecniche.

Col tempo questo tipo di analisi ha raggiunto un elevatissimo grado di notorietà anche grazie ai media ed alle celebrazioni di serie televisive di successo che hanno consegnato all'opinione pubblica (ma anche a certi addetti ai lavori) un messaggio di scientificità – e, talvolta, di infallibilità – tale da risolvere virtualmente ogni crimine.

Una “prova scientifica” con caratteristiche di tale portata è così entrata nelle aule di tutti i tribunali del mondo, in molti casi distorcendo però il concetto di ciò che effettivamente possa definirsi scientifico.

Per Newton il metodo scientifico si riferisce al corpo delle tecniche volte all'esplorazione dei fenomeni, all'acquisizione di nuova conoscenza ed all'integrazione di essa con la precedente. È basato sulla raccolta di elementi osservabili, empirici e misurabili, soggetti a specifici principi di ragionamento⁴⁵.

Per il Vocabolario Treccani è Scienza l'insieme delle cognizioni acquisite attraverso la ricerca scientifica, [...] l'insieme delle conoscenze quale si è configurato nella sua struttura gerarchica, nelle sue partizioni disciplinari, nei suoi aspetti organizzativi e istituzionali, a partire dalla rivoluzione scientifica del Seicento, concepita inizialmente (per es. con Galileo) come concezione del sapere alternativa alle dottrine tradizionali, in quanto sintesi di esperienza e ragione, acquisizione di conoscenze verificabili e criticabili pubblicamente.

Per l'Enciclopedia Britannica, alla voce “Science”, si legge: “*any system of knowledge that is concerned with the physical world and its phenomena and that entails unbiased observations and systematic experimentation*”.

⁴⁵ Isaac Newton, *Philosophiae Naturalis Principia Mathematica*.

I concetti essenziali del ragionamento scientifico sono:

- a) un'ipotesi è costruita a partire da una convinzione (credenza)
- b) l'ipotesi è testata sperimentalmente ed un corpus di dati è raccolto a supporto della credenza
- c) una valutazione da parte della comunità scientifica (*peer review*) consente di verificare la solidità della procedura.

Su questi concetti si basa l'analisi del DNA forense: “con l'eccezione dell'analisi del DNA nucleare, nessuna analisi criminalistica (si pensi agli studi balistici, delle impronte di pneumatici o di scarpe, della grafia, ecc., ndr) ha dato prova con rigore di avere la capacità di dimostrare coerentemente e con un elevato grado di certezza una connessione tra un reperto ed un dato individuo o una data origine poiché, in termini di base scientifica, le discipline che in generale si basano su principi analitici hanno un notevole vantaggio sulle discipline che si basano sull'interpretazione dell'esperto”⁴⁶.

L'analisi del DNA quindi eccelle per “scientificità”.

Ma è l'analisi del DNA che si fonda su metodi scientifici, non il contorno, non – ad esempio – la ricostruzione di una scena criminis.

L'analisi del DNA in condizioni ottimali è infatti certamente fondata su metodi scientifici solidi, in base ai quali è possibile ripetere una determinazione, misurare la lunghezza di un frammento di DNA, confrontarlo con un altro (dopo averlo misurato) e derivare, in caso di compatibilità, dei numeri o delle percentuali, derivate in base a dati di frequenza nella popolazione (dopo averne misurato la distribuzione).

Un livello di accuratezza scientifica sconosciuto ad altre discipline criminalistiche basate invece sulla opinione, sull'esperienza, sull'“occhio” dell'esperto.

Al fine di rendere le misurazioni del DNA (leggasi, analisi di laboratorio) quanto più affidabili possibile si è fatto ricorso a criteri di uniformità delle procedure analitiche attraverso l'accreditamento dei laboratori ai più alti standard di qualità (serie ISO 9000, ISO/IEC 17025), aderendo così alle raccomandazioni dello *European Network of Forensic Science Institutes* – ENFSI ed in linea anche con quanto disposto dalla normativa nazionale (legge 85/2009) in tema di accreditamento dei laboratori deputati alle analisi dei profili genetici da inserire nel database nazionale del DNA.

⁴⁶ *With the exception of nuclear DNA analysis, however, no forensic method has been rigorously shown to have the capacity to consistently, and with a high degree of certainty, demonstrate a connection between evidence and a specific individual or source. In terms of scientific basis, the analytically based disciplines generally hold a notable edge over disciplines based on expert interpretation.* STRENGTHENING FORENSIC SCIENCE IN THE USA. A PATH FORWARD. National Academy of Science, USA, 2009, pag. 7. ISBN: 0-309-13131-6. Disponibile su: <http://www.nap.edu/catalog/12589.html>

Gli standard di qualità indicano per i laboratori di misurazione (tra i quali rientrano quelli di genetica forense) tassative procedure analitiche da seguire, concorrendo così ad ottenere un risultato affidabile.

Va ricordato che l'affidabilità di un test si riferisce alla possibilità di ottenere risultati quanto più possibile identici tra una ripetizione di un test e l'altra. Pertanto, un test è affidabile se, ripetendolo, si ottiene il medesimo risultato o un risultato molto simile: quanto più simili i risultati, tanto più affidabile il test in questione.

Diverso il caso della validità di un test.

Affidabilità e validità di un test sono concetti assai differenti ma spesso assimilati, complice il linguaggio comune e la scarsa conoscenza del reale significato nel contesto scientifico.

La validità di un esperimento si riferisce infatti alla sua appropriatezza nell'ottenere risposte congruenti allo scopo che l'esperimento si propone, fornendo risposte alle domande: l'esperimento misura ciò che si pensa debba misurare? Quanta incidenza hanno le variabili sul risultato finale del test? È stato considerato un numero sufficiente di variabili?⁴⁷

È evidente che, ad una attenta analisi dei risultati, in molti casi è l'interpretazione del tecnico a suggerire il risultato ultimo del test, essendo le variabili in ambito forense spesso estremamente numerose e raramente (per non dire mai) tutte conosciute.

Quasi mai infatti il risultato di compatibilità o di incompatibilità tra il profilo genetico di una traccia e quello di un soggetto indagato sono in grado di rispondere alle domande dell'investigatore o del giudice in merito alle circostanze di deposizione del DNA rilevato, quindi rispetto alle modalità di accadimento del fatto. Quasi mai quindi i risultati dell'analisi del DNA sono in grado di fornire elementi decisivi in merito alla ricostruzione di un fatto, così da consentire di distinguere ricostruzioni diverse.

Le procedure di "misurazione" del DNA, quindi, si realizzano nelle fasi analitiche di laboratorio, non certo alle fasi che lo precedono né a quelle che seguono.

⁴⁷ Glaser A.N. High-Yield Biostatistics, Epidemiology, and Public Health. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore (USA), 4th Ed., 2014 pp. 68-69.

Alcuni Autori^{48,49,50} hanno così sintetizzato l'argomento in una serie di punti e proposto una modalità "scientifica" di approccio all'indagine forense basata sullo studio delle probabilità secondo il modello bayesiano⁵¹.

I punti proposti dai citati Autori sono raccolti nella cosiddetta gerarchia delle proposizioni (*hierarchy of propositions*) in base alla quale il livello-base è costituito dalla "sub-origine" (*sub-source*), ossia la provenienza di un certo profilo genetico, il secondo livello dall'accertamento della natura del materiale biologico contenente il profilo genetico rilevato (*source*), il terzo dalle modalità di deposizione (*activity*), il quarto se i primi tre costituiscono reato (*offence*).

Il 1° livello (*sub-source*) è quello al quale viene dedicata oggi la maggiore quota di impegno e di tempo, ossia il rilievo di un profilo genetico da una traccia, dando così risposta alla domanda: "il DNA nella traccia coincide con quello (ad es.) dell'indagato?". E certamente su questo punto non vi sono questioni di "scientificità", dato che la prova del DNA si è visto essere scientificamente solida.

Il 2° livello (*source*), ossia la determinazione del materiale biologico di provenienza, in molti casi già rappresenta – come più volte detto – un problema di non facile soluzione, non essendo spesso agevole determinare con sufficiente grado di confidenza la natura di una traccia.

In questo modo, la domanda: "di quale materiale biologico è costituita la traccia?" se non può avere risposta sminuisce di molto il valore della corrispondenza genetica accertato al livello precedente. Qualora, viceversa, si sia in grado di dare risposta alla domanda, non si pongono questioni di scientificità, essendo ben note le basi scientifiche degli accertamenti della natura dei vari materiali biologici e le modalità di analisi.

Il 3° livello (*activity*) prevede (o dovrebbe prevedere) l'accertamento delle modalità di deposizione di una traccia: il DNA rilevato (ad es. sotto le unghie) è stato lasciato con modalità "innocente" oppure in un tentativo di difesa?

In questo caso la scientificità dell'accertamento viene decisamente meno. Il punto infatti è: quali attività? Il DNA è presente sul reperto perché effettivamente connesso con il delitto? Vi è stato

⁴⁸ Cook, R., et al., A hierarchy of propositions: Deciding which level to address in casework. *Science and Justice*, 1998. 38(4): p. 231-240.

⁴⁹ Evett I.W. et al., Interpreting small quantities of DNA: the hierarchy of propositions and the use of Bayesian networks. *Journal of Forensic Science*. 2002;47(3):520-30.

⁵⁰ Buckleton J.S., Bright J.-A., Taylor D., Evett I.W., Hicks T., Jackson G., Curran J.M. Helping formulate propositions in forensic DNA analysis. (2014) *Science & Justice* 54(4) 258-261

⁵¹ Una disamina approfondita riguardante l'approccio bayesiano esula dalla presente trattazione. In estrema sintesi l'approccio bayesiano si riferisce ad una posizione epistemologica che trova collocazione nel ragionamento scientifico (ma non solo) e si basa sulla teoria delle probabilità. Pertanto i due presupposti-cardine dell'approccio bayesiano sono: a) il ragionamento scientifico, ad esempio la conferma di un'ipotesi o una teoria, può essere quantificato ed agganciato ai principi dello studio delle probabilità; b) l'approccio bayesiano fornisce una modalità di come poter imparare dall'esperienza.

trasferito per trattamento incongruo del reperto? (contaminazione). Era presente prima che il delitto venisse commesso?

Sono assai scarse le pubblicazioni scientifiche in grado di soddisfare la domanda: “in quanti casi, nella situazione di specie, il DNA rilevato è stato deposto in modo innocente o, al contrario, violento?”. È evidente che una risposta caso per caso è impossibile, potendo la ricerca e i dati scientifici fornire solo parametri generali. Parametri che però costituiscono elementi importanti per il giudice.

Allo stato attuale, pertanto, la stragrande maggioranza (se non tutte) le interpretazioni fornite da questo o quel consulente sulle modalità di deposizione di un profilo genetico non possono che essere molto lontane dal riflettere un dato scientifico, non essendovi studi sufficienti al riguardo.

Per queste ragioni la ricerca si sta orientando verso lo studio delle variabili che influenzano le modalità di trasferimento del DNA nel tentativo di ottenere stime probabilistiche nella generazione di profili genetici nelle situazioni più frequenti. Operazione tutt'altro che agevole essendo pressoché infinite le variabili coinvolte.

Infine, il 4° livello (*offence*) prevede la decisione del giudice sulla base delle informazioni ricavate ai livelli precedenti insieme con gli altri elementi di cui il giudice dispone. Non riguarda l'analista forense.

Queste informazioni possono essere espresse numericamente con valori probabilistici impiegando un approccio statistico di tipo bayesiano, volto a verificare la validità di una determinata affermazione se non considerandone almeno una alternativa generando il c.d. rapporto di verosimiglianza (*Likelihood Ratio – LR*) che assume questa forma:

$$\frac{\text{Probabilità del dato se è vera l'ipotesi dell'accusa}}{\text{Probabilità del dato se è vera l'ipotesi della difesa}}$$

Il risultato è un numero che sarà assai elevato in caso di preponderanza dell'ipotesi accusatoria, basso se non addirittura negativo in caso di preponderanza dell'ipotesi difensiva.

L'approccio bayesiano mediante il rapporto di verosimiglianza consente perciò di rappresentare le diverse ipotesi in modo più preciso e misurabile.

Diversi scienziati^{52,53,54} hanno fornito importanti contributi a questo tipo di approccio, appunto quello bayesiano⁵⁵, che ha contribuito a rendere l'interpretazione delle analisi forensi in generale più

⁵² Evett, I. (1984). "A Quantitative Theory for Interpreting Transfer Evidence in Criminal Cases." *Journal of the Royal Statistical Society - Series C* 33: 25-32.

⁵³ Cook, R., I. Evett, et al. (1998). A Model For Case Assessment And Interpretation. *Science and Justice* 38 (3): 151-156.

⁵⁴ Evett, I. and Joyce, H. (2005). Career Story: Consultant Forensic Statistician. *Significance*: 34-37.

⁵⁵ V. nota 42

“scientifica”, ed in particolare l’analisi genetica di tracce biologiche in quantità scarsa o scarsissima con assai maggiore rigore scientifico attraverso il citato metodo della “genotipizzazione probabilistica”.

Dunque la ricerca assume ancora una volta rilievo determinante a dare sempre maggiore grado di scientificità ad una argomentazione, pur nella consapevolezza dell’importante limite imposto dall’enorme variabilità delle situazioni, come sopra ricordato.

Dal punto di vista della ricerca il sistema italiano potrebbe essere eccezionalmente favorito: infatti, sia gli accertamenti disposti dal PM, sia quelli disposti in sede di giudizio, possono essere svolti sia presso laboratori “istituzionali” (RIS Carabinieri, Polizia scientifica), sia presso istituti universitari che hanno per l’appunto nella ricerca la loro specifica missione.

Nel 2011 il ministero dell’Interno britannico, attraverso il Forensic Science Regulator⁵⁶, ha prodotto un documento⁵⁷ a conclusione di un processo di revisione condotto presso università, laboratori e fornitori di servizi forensi dal quale è emersa l’estrema preoccupazione per lo scarso livello di qualità delle università inglesi nel campo della ricerca nelle scienze forensi: la maggior parte degli studi presentati dagli atenei britannici sono risultati condotti come progetti di tirocinio di studenti, in piccola scala, con scarso controllo e revisione da parte di esperti realmente avvezzi al confronto nelle aule dei tribunali, proprio là dove le scienze forensi trovano la loro applicazione.

Ebbene da allora la situazione non si è di molto modificata: la maggior parte della ricerca, anche di grandi gruppi, è condotta in via sperimentale in laboratorio mediante simulazioni, essendo estremamente complesso raccogliere dati dall’attività di routine quotidiana, cosa che richiederebbe una numerosità casistica difficilmente concepibile. Tra l’altro in un Paese, la Gran Bretagna, patria della criminalistica, dove le analisi sono condotte in modalità routinaria in un elevato numero di casi in ambiti diversi però da quello universitario, essendo coinvolti soprattutto laboratori privati dopo la chiusura del Forensic Science Service⁵⁸ nel 2010.

Il nostro Paese, invece, nonostante la posizione privilegiata quanto a possibilità di ricerca, soffre di un atavico limite: la scarsa propensione della Magistratura ad eseguire indagini di laboratorio, tra le quali anche quelle genetiche. Ci si trova così nella condizione di non poter usufruire del contributo

⁵⁶ Gruppo del Ministero dell’Interno britannico incaricato assicurare che lo svolgimento dei servizi di scienze forensi operanti nel sistema giudiziario penale siano sottoposti ad un regime di standard di qualità appropriato

⁵⁷ Review of Research and Development in Forensic Science: University Responses. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/118917/forensic-review-universities.pdf (Ultimo accesso il 13/9/2020).

⁵⁸ Il Forensic Science Service (FSS) è stata per decenni la principale azienda di stato britannica fornitrice di servizi di scienze forensi alle forze di polizia in Inghilterra e Galles. A causa degli elevati costi di gestione ne è stata decretata la chiusura nel dicembre 2010.

dell'Università come motore per la ricerca in un settore che, come detto, solo nella ricerca trova il modo di migliorare la propria "scientificità".

Il fenomeno riguarda la totalità dei reati ma assume caratteristiche ancora più preoccupanti per i reati sessuali, ossia proprio quelli per i quali è massima la possibilità di rilevare trasferimento di materiale biologico dagli aggressori alle vittime (e naturalmente, ma con minori possibilità di rilievo, dalle vittime agli aggressori), ancor più nel caso di vittime adolescenti. In tali casi si è visto che il numero di analisi del DNA richieste dall'Autorità Giudiziaria in una ricerca condotta in un arco temporale di 10 anni (2006-2015) non raggiunge il 2% (1,9%)⁵⁹.

Tale dato stupisce non poco ove si consideri l'allarme sociale creato dal reato commesso su vittima adolescente che ben richiederebbe il maggiore sforzo investigativo possibile nella raccolta delle prove e nel loro uso dibattimentale. Con il conseguente inevitabile impoverimento anche della ricerca.

Si è sottolineato come la ricerca abbia potuto fornire elementi utili a standardizzare le procedure di laboratorio ed a minimizzare l'impatto dell'interpretazione di risultati complessi, quali quelli ottenuti dopo analisi di DNA in quantità scarsa o scarsissima o in profili complessi anche mediante l'impiego di analisi computerizzate mediante software.

Questo porta ad un'ultima considerazione.

In generale, l'immissione di strumenti tecnici di ultima generazione, con maggiori e migliori capacità analitiche, potrebbe portare a concludere erroneamente per l'inutilità, parziale o totale, dell'apporto umano, lasciando le risposte più delicate "alla tecnologia".

Il profano potrebbe infatti percepire dalla facilità di utilizzo degli strumenti informatici, data ormai la diffusione ad ogni livello di applicazioni ("app") in grado di risolvere virtualmente ogni necessità, la fuorviante idea di una specie di completezza, perfezione ed accuratezza scientifica, semplicemente "premendo un bottone".

Nulla di più pericoloso.

Purtroppo si sta facendo strada l'idea che "premere il bottone" sia la via sicura verso la soluzione certa e affidabile di ogni questione.

Questo non vale per la ricerca scientifica ed il mondo scientifico in generale, in continua evoluzione com'è.

⁵⁹ Piccinini A, Vignali G, Bailo P, Barbara G, Gennari G, Di Candia D, Albertini V, Kustermann A (2019) Management of DNA evidence collected on adolescents in sexual assault investigations: A 10-year review from a large Italian rape centre. *Medicine Science and the Law*. In press. DOI: 10.1177/0025802419858538.

Un mondo che trova nel continuo miglioramento (mai nel raggiungimento della perfezione) la sua forma di espressione, nello studio, nel confronto e nella conoscenza le armi di sviluppo e progresso.

Confronto, sviluppo e conoscenza a tutti i livelli, sia nel mondo biologico-forense, sia in quello giuridico (e giudiziario) oltre che nei media, spesso coinvolti nella gestione più o meno superficiale di tematiche talora di estrema complessità.

Il mondo della Genetica forense, purtroppo, non trova in alcuna “app” la soluzione dei suoi numerosi problemi.