

# **L' UTILIZZO DEL DNA - PROFILING NEL PROCEDIMENTO PENALE**

Prof. Vincenzo L. Pascali

Ordinario di Medicina Legale, Direttore dell'Istituto di Medicina Legale nell'Università Cattolica del S Cuore, Facoltà di Medicina A.Gemelli, largo F. Vito, 1 00168 Roma

Tel. 0635507031 0603053129 30154398

Fax 06 35507033

Tel.pers. 0335 5872736

e-mail: vince.pascali@rm.unicatt.it

## **Sommario**

- 1. Reperti, prelievi e tracce sulla scena del crimine, sul cadavere e sul vivente: una complessa e costosa macchina che può collassare**
- 2. Il test del DNA: come funziona oggi**
- 3. Degradazione, contaminazioni, misture e altri problemi che affliggono le procedure di DNA profiling**
  - Contaminato o misto?
  - Regole per l' interpretazione di una traccia formata da più profili
  - Se il profilo è affollato di picchi, commista è la traccia da cui deriva?
- 4. Un insidioso produttore di *profili* commisti: il LT /LCN DNA profiling**  
**Come un caotico fenomeno di LCN profiling può condurre a false attribuzioni di genotipo**  
***I false friends* di analisti distratti**  
**Un esempio di errore analitico con falsa attribuzione**
- 5. Le analisi di LT/LCNDNA nella cronaca giudiziaria internazionale e nella realtà italiana**
- 6. La mappatura del genoma umano e le connesse valutazioni statistiche**
- 7. La 'microbiologia forense'**

## **Reperti, prelievi e tracce sulla scena del crimine, sul cadavere e sul vivente: una complessa e costosa macchina che può collassare**

Il dispiegamento dei mezzi per la ricerca della prova (Art. 244. Ispezione; Art. 245. Ispezione personale; Art. 246. Ispezione di luoghi o di cose; Art. 247. Perquisizioni; Art. 249. Perquisizioni personali; Art. 250. Perquisizioni locali; Art. 251. Perquisizioni nel domicilio; Art. 252. Sequestro conseguente a perquisizione; Art. 253. Sequestro) ed in particolare l'esecuzione

del **sopralluogo giudiziario**, l'effettuazione dell'**autopsia** e le **indagini su persone immediatamente sospette** sono fasi di particolare importanza dell'attività istituzionale d'indagine promossa dal Pubblico Ministero, ed un cruciale aspetto dell'attività dei suoi ausiliari (medico legale, ufficiale di PG). In queste fasi si dispiegano attività consistenti in:

- Ricognizione di materiale utile all'indagine, descrizione verbalizzata del ritrovamento;
- Esecuzione di rilievi fotografici e videofotografici;
- Prelievo di reperti biologici, loro trasformazione in corpi di reato, avviamento agli esami di laboratorio.

Operazioni di tal genere sono intraprese sia in luogo aperto sia in luogo chiuso. Queste ed altre caratteristiche del luogo condizionano fortemente modi e tempi dell'intervento. Per ciascuna operazione, è molto rilevante la scelta dell'ausiliare più appropriato. L'ausiliare dovrà essere appropriatamente equipaggiato con strumento e materiali utili a descrivere, documentare e prelevare.

Secondo tradizione, nel nostro Paese i centri di indagine criminale che rispondono alle richieste del Pubblico Ministero sono i servizi di investigazione della Polizia di Stato e dei Carabinieri e gli istituti di medicina legale delle Università.

Nell'arco degli ultimi 15 anni, i servizi di polizia scientifica istituzionali e gli istituti di medicina legale hanno compiuto uno sforzo di riorganizzazione e di aggiornamento e progressi sostanziali si sono registrati nella qualità e nell'efficienza dei servizi a disposizione del Magistrato Requirente.

Quel che un tempo era un punto debole nel contesto dell'indagine d'identificazione criminale si è trasformato in un punto di forza, grazie agli sforzi di molti.

Il tema d'attualità e l'oggetto della riflessione di chi ha compiti organizzativi sembra dunque oggi risiedere non tanto nell'affinamento dalla qualità ed adeguatezza dei servizi posti a disposizione delle Procure quanto nella creazione di un più organico raccordo tra magistrato inquirente e suoi ausiliari: tra chi insomma dispone e chi deve fare. Obiettivi primari sono ritenuti:

- la libera circolazione delle informazioni all'interno dell'equipe che cerca le prove, pur nella cornice della riservatezza istruttoria;
- il coordinamento delle attività da intraprendere;
- la creazione di un coerente piano inferenziale che valorizzi ciò che si osserva-trova-conserva rispetto all'obiettivo probatorio.

Il valore relazionale delle cose oggetto di esame deve essere sotto il pieno controllo di chi dirige le indagini: a casa dell'indiziato si cercheranno tracce biologiche della vittima; nel dominio ambientale della vittima, tracce di persona da sospettare.

Si dovrà ora riflettere, anche a seguito di alcuni episodi (occorsi nel più o meno recente passato e diventati di pubblico dominio) in cui vi erano state carenze di indagine, più e più inchieste giudiziarie (tendenzialmente, tutte quelle in tema d'omicidio) tendono a trasformarsi in una gigantesca caccia all'oggetto, in cui la scoperta dell'autore del crimine è ritenuto come un epifenomeno obbligato di un' indagine 'a tappeto'.

Così, ripetuti accessi a luoghi rilevanti per l'inchiesta sono disposti in archi temporali spesso

assai lunghi e una singola indagine di sopralluogo mette in attività stuoli di specialisti. Centinaia (le cifre tendono ad essere di quest'ordine) di reperti si raccolgono sulle scrivanie dei pubblici Ministeri e finiscono per essere avviate senza alcuna selezione nei laboratori d'analisi.

Ciò non è senza conseguenze.

La raccolta e le analisi di laboratorio (specie di natura biologica in tema di DNA profilo) esigono una complessa macchina organizzativa che ha costi evidenti e costi occulti. Il costo in risorse umane e materiali tende a diventare ingentissimo. Nessuno o quasi nessuno si pone il problema di verificare se esista o meno una ragionevole proporzione tra l'esigenza di giustizia e i suoi costi materiali.

Alla immediata e non meditata considerazione che tende a credere (e a far credere) che l'ultima inchiesta giudiziaria sia invariabilmente la più importante si sacrifica ogni pur necessaria valutazione di costi e benefici.

Un tale stato di cose allunga i tempi di sviluppo e consegna dei rapporti/referti analitici/consulenze e fa esplodere i costi di gestione di un caso.

Parte di questi costi è spesso invisibile ai più, perché imputata a capitoli di spesa diversi da quelli appropriati (ad esempio, Ministero dell' Interno o della Difesa o dell' Università invece che al Ministero della Giustizia) ma ciò non è tutto.

Un tale stato di cose potrebbe presto o tardi condurre al collasso degli apparati d'indagine.

Ciò non potrà avvenire che quando il pubblico sarà in grado di percepire l'incidenza reale dei costi delle inchieste giudiziarie sui conti pubblici. L'esperienza di altri paesi lo dimostra. Una simile situazione si è già verificata in Gran Bretagna. Quel paese è stato la culla dei DNA profiles e i suoi servizi di polizia scientifica ne sono stati l'avanguardia scientifica e applicativa per due decenni. Al culmine dello stato di maturità del settore, dopo una storia scandita da centinaia di migliaia di casi affrontati e spesso risolti e dopo la costituzione di un gigantesco database di profili criminali, il modello investigativo inglese è collassato sui suoi costi. In novembre 2010 è giunta, apparentemente improvvisa, la notizia che il governo inglese ha posto in liquidazione l'intero Forensic Science Service (l'equivalente dei nostri servizi di polizia scientifica). Il pubblico ha improvvisamente scoperto che il FSS perdeva un milione di sterline al mese e la situazione è stata, con pragmatico giudizio tutto britannico, giudicata intollerabile. La stampa ha dunque pubblicato la notizia che il servizio sarà sciolto e che l'attività cesserà alla fine del 2011 (cfr: Forensic Science Service to close. Clive Cookson, Science Editor December 15 2010).

Immedie ma poco ascoltate sono state le proteste della comunità internazionale di genetisti forensi e la loro campagna di solidarietà nei confronti dei colleghi inglesi che rimarranno senza lavoro. Una lettera di protesta firmata da 32 ricercatori del settore (tra cui l'autore di queste note) è stata pubblicata dal Times (Closure of forensic service puts justice at risk | The Times 20 dicembre 2010).

Il settore subirà dunque una privatizzazione forzata e già oggi si assiste alla diaspora di ottimi scienziati verso un piccolissimo gruppo (un monopolio?) di agenzie di servizi internazionali che sembrano capaci di gestire l'attività forense su basi di profitto.

L'esperienza inglese deve indurre tutto l'ambiente giudiziario italiano (e le agenzie governative che nel nostro paese sono coinvolte nella gestione di laboratori forensi) a riflettere. Il settore è da noi ancora lungi dall'essere nella situazione inglese (il database nazionale - uno dei primi responsabili del collasso finanziario del settore pubblico forense - non è ad esempio ancora attivo) e dà appena segni di appesantimento.

Imparare dagli altrui errori è uno dei (pochi) privilegi di chi milita nella retroguardia.

## IL TEST DEL DNA: come funziona oggi

Ciò che negli anni ottanta andava sotto il nome di *DNA fingerprinting* è stato oggi ridenominato *DNA profiling*.

Il test ha ventisei annidi vita, essendo stato introdotto nel 1985 da Sir Alec J. Jeffreys (Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Nature. 1985 Jul 4-10;316:76-9), l'autentico pioniere di una disciplina che ha poi subito cambiamenti sostanziali.

La più spettacolare transizione nel settore si è verificata agli inizi degli anni novanta, quando la metodologia del fingerprinting (basata su un procedimento di laboratorio ingegnoso ma molto difficile da riprodurre: la Southern Blot analysis) è stata sostituita dall'introduzione della Polymerase chain reaction, che tutti (anche i non addetti ai lavori) conoscono oggi con l'acronimo di PCR.

PCR fu inventata negli Stati Uniti da un eccentrico biologo, Kary Mullis (Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Mullis KB, Faloona FA. Methods Enzymol. 1987;155:335-50), che dopo averne ricevuto in ricompensa il premio Nobel è scomparso praticamente di scena. La sua creatura ha rivoluzionato non solo la genetica forense, ma l'intera genetica e biologia molecolare come raramente è accaduto di osservare in passato.

Senza scendere in dettaglio tediosi e in fondo non necessari, PCR è una specie di fotocopiatrice molecolare, capace - in presenza di un originale di buona qualità (il DNA, nella sua interezza e senza particolari modificazioni nella sua struttura) e di un buon numero di fogli bianchi (quattro nucleotidi, le componenti basilari della molecola del DNA, più due sequenze oligonucleotidiche che funzionano da segnale di inizio e di fine della copiatura) - di riprodurre qualche milione di copie di una sola sequenza remotamente dispersa nel genoma umano.

I vantaggi di PCR sono stati subito evidenti a tutti:

1. la quantità, anche molto piccola di DNA di partenza può essere moltiplicata a dismisura rendendo semplicissima la successiva analisi qualitativa;
2. copie del DNA di partenza possono essere prodotte anche se l'originale da fotocopiare è molto maltrattato (per fenomeni di invecchiamento, legati al trascorrere del tempo e all'agire di fattori che lo distruggono) o chimicamente contaminato/inquinato.

Le frontiere dell'analisi di infinitesime quantità di genoma (si parla oggi di nanogrammi o picogrammi di partenza: un milionesimo-miliardesimo di grammo) si sono improvvisamente aperte all'analisi forense. Così, un bulbo di capello, un decimo di microlitro di sangue, una quasi impercettibile traccia di saliva sono divenuti un realistico oggetto d'analisi.

Tutto ciò, in teoria.

Naturalmente, anche una tecnica molto potente e versatile come PCR conosce limiti. Sono oggi noti numerosi fattori che inceppano il funzionamento della fotocopiatrice molecolare. Alcuni fra tutti: la componente degradata *eme* dell'emoglobina, il colore blu di un capo jeans e molte sostanze chimiche coestrate insieme dal DNA dalla inerente procedura di laboratorio. Quando **l'inibizione** prodotta da uno di questi fattori inibitori agisce sul campione, il procedimento tende dunque a non copiare più e a non dare risultato.

Inoltre, PCR è una procedura onnivora, capace di intercettare molecole di DNA a prescindere dalla loro provenienza. E molecole di DNA sono capaci di viaggiare da un luogo fisico all'altro,

spinte da fattori apparentemente banali (ad esempio, le goccioline del respiro dell'analista o di chi lo ha preceduto a contatto con un reperto; o ancora, il contatto fisico con le mani di chi ha maneggiato un reperto). Così, il processo di fotocopiatura riproduce un originale 'sbagliato' o - peggio - una miscela di DNA originale e di DNA estraneo. Questo aspetto della tecnologia (tendenza alla **contaminazione**) genera fatali errori, difficili da identificare.

La disponibilità di uno strumento così potente come PCR ha nel corso degli anni spinto gli analisti ad osare di analizzare infinitesime quantità di DNA proveniente dalla scena di un crimine: il fusto di un capello senza bulbo, una macchia di saliva che non si vede ad occhio nudo ecc. Ma reperti di questo genere sono inevitabilmente preda di contaminazioni ambientali. Come si dirà in seguito, una tale situazione ha finito con il generare situazioni in cui risultati falsati dalla contaminazioni sono stati presi per buoni.

## **Contaminazioni, misture e altri problemi che affliggono le procedure di DNA profiling**

L'analisi di una traccia, anche la più apparentemente banale, mediante PCR può riservare sgradevoli sorprese. L'esiguità del materiale di partenza, il suo stato di parziale degradazione, l'azione inquinante di DNA estraneo al contesto probatorio tendono a generare autentici **labirinti analitici** in cui l'analista, anche se esperto, può perdersi e può soprattutto perdere la propria capacità critica nei confronti di un risultato.

Gli esiti di un tale processo sono: la **falsa esclusione** (molto frequente) ma anche la **falsa attribuzione** di un profilo a persona sottoposta ad indagine (un evento purtroppo sempre più frequente, oggi).

Molti analisti sono disposti a riconoscere l'esistenza del primo problema: escludere, per errore, che una traccia appartenga ad un imputato. Essi tendono invece a **negare o sottovalutare l'esistenza del secondo problema**: attribuire, per errore, una traccia ad un imputato.

La ragione che induce ad simile atteggiamento risiede tutta fraintendimento del paradigma della variabilità del codice genetico. Si sostiene che:

- a) il codice genetico è unico per ciascun individuo;
- b) la contaminazione è un fenomeno cieco (casuale), cioè intercetta DNA di individui selezionati a caso nell'ambiente;
- c) un reperto critico non potrà quasi mai contaminato dal DNA dell'accusato ma da quello di persone che non c'entrano nulla con lui;
- d) tutti gli analisti adottano ormai la regola di permettere l'ingresso del DNA dell'imputato in laboratorio quando l'analisi della traccia d'interesse è ormai conclusa e i due DNA non possono più sovrapporsi al suo interno;
- d) pertanto, l'esito di un test in cui una traccia dimostri di avere un profilo uguale all'imputato non potrà mai essere il frutto di una contaminazione e sarà quindi autentico.

Questo rassicurante ragionamento può essere tuttavia fallace, al ricorrere di semplici circostanze: la contaminazione di un campione che abbia scarso contenuto del DNA proveniente dalla scena del crimine. Vedremo come ciò può avvenire e con quanta frequenza. Per comprendere il tema servono tuttavia alcune semplici nozioni tecniche.

## Contaminato o misto?

Per verificare come il problema appena descritto si materializzi occorre prima chiarificare alcuni concetti di base.

Una **mistura** è, come **concetto biologico**, il prodotto della mescola di due DNA diversi all'origine (tessuto biologico mescolato ad altro tessuto biologico) oppure in laboratorio (tessuto misto ad estratto di DNA; estratto mescolato ad estratto). Convenzionalmente, il **contaminato** è rappresentato dal DNA prevalente, mentre il **contaminante** è la componente quantitativamente minoritaria della mistura. Non vi sono altre proprietà né fisiche né biologiche che aiutino a descrivere la situazione che si crea quando due o più fonti di DNA si uniscono insieme in un solo campione o traccia.

In ogni caso che prospetti una mescolanza di DNA, è di grande interesse comprendere se la mescola si è creata al volgere dell'azione criminosa. Senonché, distinguere biologicamente tra contaminante e contaminato non aiuta a capire se entrambi i DNA della mescola abbiano a che fare con la meccanica di un crimine commesso nel contesto del suo formarsi (ad esempio: aggressore e vittima sanguinano formando una sola macchia; o ancora il DNA delle cellule vaginali e quello dello sperma si mescolano in un prelievo vaginale). Meno che meno aiuta a comprendere quale dei DNA è estraneo al quadro probatorio (è stato deposto prima di esso, dopo di esso, o comunque non c'entra nulla con il fatto delittuoso).

A complicare le cose, nel comune **linguaggio giudiziario** si riserva spesso la parola **mistura (o traccia mista)** ad entrambe le situazioni, senza particolari distinzioni. Bisognerebbe invece riservare il termine 'mistura' ai soli casi in cui si ha la prova che due tessuti di persone diverse si siano effettivamente mescolati. La prova non può che essere esterna al profilo di DNA. Per esempio, osservare al microscopio cellule vaginali e spermatozoi mescolarsi insieme (oppure provare biochimicamente che saliva e sangue sono presenti in una singola traccia) aiuta ad assegnare il successivo profilo di DNA ad aggressore e vittima. Una tale evidenza deve sempre essere ricercata ma non è sempre possibile ottenerla. Ad esempio, non si potrà mai avere prove del fatto che sangue di un secondo soggetto si sia mescolato a quello di un primo individuo, poiché la positività alle prove di natura ematica dell'uno oscurano quelle dell'altro.

Servono dunque regole di precauzione, da adottare per prevenire errori semantici e interpretativi. Eccone alcune:

- 1) La qualità di essere contaminante e contaminato non coincide affatto necessariamente con quella di essere estraneo o contestuale rispetto al fatto che interessa giudizialmente;
- 2) la distinzione tra DNA estraneo e DNA contestuale non è qualità che possa essere svelata dall'esame del profilo in se stesso. Questa è viceversa o una deduzione proveniente da altre prove di laboratorio oppure una deduzione tipicamente circostanziale e fuori dalla portata dall'analista;
- 3) è in definitiva il giudice a dover spesso emettere l'ipotesi che una traccia possa essere una autentica traccia mista; l'analista deve invece confermarla o smentirla;
- 4) a prescindere da ciò, l'interpretazione di una traccia complessa è possibile, ma a condizione che si segua rigorosamente un corretto procedimento teorico.

## Regole per l'interpretazione di una traccia formata da più profili

Quando si abbia la necessità di confermare che una traccia sia autenticamente mista e di spere

quali individui vi abbiano contribuito, l'analista può entrare in gioco ed esprimere un giudizio tecnico sui due temi.

L'espressione di tali giudizi ha anch'esso regole.

1. Assunzioni a priori (cioè precedenti al procedimento di interpretazione) sono anzitutto necessarie perchè l'interpretazione avvenga ordinatamente. Il giudizio su quanti contribuenti siano presenti in una traccia è il derivato di assunzioni circostanziali (oltre che sulle caratteristiche del profilo [essenzialmente, il numero di caratteri presenti: in ciascun gene: a) un individuo (da un minimo di un carattere ad un massimo di due caratteri); b) due individui (tre-quattro caratteri al massimo presenti); e così via];
  - 1) una traccia può essere palesemente mista oppure occultamente tale (due genomi di persone tra loro strettamente imparentate possono, entro certi limiti, sembrare un genoma solo);
  - 2) l'interpretazione di una traccia mista è un procedimento preciso, che non può essere sostituito da giudizi affrettati e suggestivi ('ci sono tutti geni dell'imputato, ergo l'imputato è presente nella traccia – e tutto il resto non importi'); il più appropriato procedimento è stabilito e descritto all'interno di documenti ufficiali della società internazionale di genetica forense (Editorial on the recommendations of the DNA commission of the ISFG on the interpretation of mixtures. Schneider PM, Gill P, Carracedo A. Forensic Sci Int. 2006 Jul 13;160(2-3):89; DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. Gill P, et al. Forensic Sci Int. 2006 Jul 13;160(2-3):90-101). E' quasi certo che, se si disattendono queste raccomandazioni, l'interpretazione della mistura sarà fallace.

### **Se il profilo è affollato di picchi, commista è la traccia da cui deriva?**

Il fatto che un profilo in cui ricorrano marcatori genetico con più di due caratteri (picchi, secondo l'aspetto che essi assumono nei printouts del computer interfacciato alla macchina-sequenziatore) non è affatto a priori una garanzia che la traccia sia effettivamente mista – cioè sia il derivato di una commistione di due tessuti, ciascuno appartenente ad individuo diverso. La traccia può essersi contaminata in ogni altra fase del suo lungo viaggio verso il laboratorio e può averlo fatto dopo essersi trasformata in estratto di DNA, dunque in laboratorio.

Non vi è pertanto nessun' altra via per stabilire l'autentica natura di una traccia mista che non sia quella di **studiarla come traccia e non come profilo di DNA**. Ciò impone di sottoporre la traccia ad un accurato esame fisico (com'è fatta, quali ne sono le dimensioni, quale ne è il colore, come reagisce a sorgenti di luce a varia lunghezza d'onda, come reagisce biochimicamente e immunologicamente).

Studiare le caratteristiche fisico chimiche di una traccia significa comprendere se è umana e a quale/i quanti tessuti appartenga.

Alcuni analisti, talvolta per il timore di consumarne una parte cospicua e di non essere in grado di produrre un profilo, danno al preferenza alla produzione del profilo, consumando interamente la traccia.

Questa omissione compromette la possibilità di far diagnosi di autentica traccia mista ed è un grave colpo alla credibilità della successiva analisi molecolare. In ogni caso, l'errore è grave anche quando il profilo non si riveli misto.

## Un insidioso produttore di *profili* commisti: il LT /LCN DNA profiling

Non avere a disposizione abbastanza materiale per produrre una seria diagnosi generica/specifica ed un buon profilo è divenuto sempre più frequente, negli ultimi tempi.

Grandi progressi si ottengono oggi nella ricerca di sempre più potenti kits commerciali in grado di aggredire con facilità anche un minuto ammontare di cellule umane ottenendone un profilo purchessia.

Gli analisti tendono dunque a considerare suscettibili d'analisi anche minutissime tracce o addirittura aree giudicate come di particolare interesse investigativo (la lama perfettamente pulita di un'arma da taglio; il fermaglio di chiusura di un indumento intimo, eccetera), anche quando su queste aree non vi sia alcuna traccia visibile ad occhio nudo.

Questo modo di operare è in se stesso comprensibile: l'autore di un crimine tende ad occultare le tracce visibili e a trascurare quelle che non vede. L'analista vuole vedere chiaro anche dove l'occhio nudo non vede.

Il procedimento di estrazione di DNA da una piccola area o da una minutissima traccia (visibile o non visibile) permette di raccogliere quantità veramente molto scarse di materiale: spesso meno di un nanogrammo o anche molto meno.

Questa situazione è conosciuta come **low copy number DNA analysis o Low template DNA analysis**.

Sulla precisa definizione di LCN o LT non vi si è oggi accordato tra i ricercatori. Ma la prospettiva offerta da un simile terreno di caccia al colpevole è ben descritta da due considerazioni.

- A) Un nanogrammo (un milionesimo di grammo) di DNA corrisponde a circa 660 cellule nucleate, cento picogrammi è l'ammontare di 66 cellule, un picogrammo (un miliardesimo di grammo) è meno del contenuto in DNA di una cellula. Il limite di visibilità ad occhio nudo di una traccia dipende dal tipo di tessuto che la contiene ma è spostato sul versante del nanogrammo o più e non su quello del picogrammo. Molti dei kit appena immessi sul mercato promettono di amplificare DNA da soli 100-250 pg. Cioè promettono di estrarre **un profilo da una traccia invisibile** e probabilmente non caratterizzabile biochimicamente. Fatta l'estrazione di una traccia invisibile e non caratterizzata nella sua natura tissutale, sorge dunque il serissimo problema di stabilire quale DNA si stia realmente sottoponendo all'analisi molecolare e se esso abbia davvero conservato una precisa relazione di derivazione dalla traccia. Contaminare, con una manciata di cellule estranee al contesto probatorio (cento, supponiamo), un campione che proviene da una traccia mai neppure vista è così facile da non poter mai essere escluso né a priori né a posteriori rispetto all'analisi: la contaminazione sarà infatti anch'essa invisibile.
- B) Lo scarso ammontare in DNA non è il solo problema. Avviare all'analisi PCR un estratto il cui ammontare in DNA sia pari a 100 pg non significa che l'analista disponga di tutto il pur esiguo DNA. La degradazione diminuisce l'ammontare di molecole realmente disponibili per ciò che abbiamo chiamato fotocopiatura molecolare. In carenza di molecole stampo, la reazione di PCR tende ad amplificare per caso alcuni caratteri e a trascurarne altri. Il genotipo originario della traccia è dunque solo parzialmente – soprattutto capricciosamente copiato. Il capriccioso rimaneggiamento del genotipo originario avviene inesorabilmente su tutto il DNA a bassa concentrazione: su quello evidenziano come su quello che lo ha accidentalmente (ma tanto spesso inevitabilmente) inquinato.

Pertanto, più spesso di quanto l'analista sia normalmente disposto ad ammettere, **l'analisi di LCN/LT DNA si trasforma nell'analisi di una traccia alterata e contaminata** da due fenomeni: il primo (inquinamento ad opera di caratteri casualmente assunti dall'ambiente) è chiamato dropping in e **dropins** i caratteri spurii aggiuntivi che appaiono nei tracciati elettroforetici. Il secondo fenomeno si chiama dropping out e **dropouts** sono dette le perdite dei caratteri originari.

A render ancora più insidioso il processo è la circostanza che le modifiche tendono ad assumere la forma di **tracciati elettroforetici LCN /LT che sembrano provenire da tracce miste**. I tracciati sono tuttavia di scarsa qualità e sono instabili poiché la **danza dei caratteri (dropins/dropouts)** altera continuamente l'assetto genetico rendendolo dissimile da prova in prova.

Supponiamo ora che l'esiguità dell'estratto non permetta neppure la ripetizione per più volte di una prova e che l'analista ritenga legittimo il profilo dedotto dall'unica prova portata a termine.

Questa insidiosissima situazione analitica sarà l'anticamente dell'errore giudiziario.

Alcuni analisti giudicano questo fenomeno come poco preoccupante. Essi ritengono che l'errore che ne derivi sia sempre a favore dell'imputato. Infatti non ritengono plausibile che dropins e dropouts provenienti da cellule di individui resi a caso costruiscano un genotipo identico a quello di una persona accusata.

Questa rassicurante considerazione è fallace. Per le seguenti considerazioni.

### **Come un caotico fenomeno di LCN profiling può condurre a false attribuzioni di genotipo**

Chi crede che un processo casuale di alterazione del genotipo come quello introdotto dai cambiamenti dropin/dropout possa ben difficilmente ricostruire il genotipo di un individuo accusato di un crimine non ha forse ed in linea di principio tutti i torti. Ma questa convinzione può essere smentita, almeno in alcune circostanze.

Per dimostrare il loro assunto, essi invocano anzitutto una convinzione sbagliata: che la probabilità di riprodurre un determinato genotipo (l'accusato) ad opera di dropins/dropouts sia uguale alla probabilità di ricorrenza casuale di quel determinato genotipo. Questa, essendo il profilo costituito da una quindicina di marcatori genetici (loci), è il prodotto della probabilità di ricorrenza di ciascun genotipo preso individualmente. Si tratta di una probabilità effettivamente così piccola da essere trascurabile. Considerando per semplicità che la probabilità media di ogni genotipo sia pari a circa il 2-3%, la probabilità combinata è infatti astronomicamente remota.

Tuttavia, il processo di dropin/dropout altera la struttura unitaria del genotipo, così che ogni carattere non risulta più legato all'altro nel tradizionale legame mendeliano del genotipo. La probabilità di ricorrenza casuale di un allele considerato da solo è invece molto più alta: molti alleli, in se stessi considerati, possono essere presenti nel trenta-quaranta per cento dei soggetti presi a caso. Pertanto, la probabilità che PCR costruisca un genotipo LCN artificiale è molto più alta di quanto non lo sia se gli alleli continuassero ad essere amplificati essendo associati nella combinazione del genotipo originario (cfr: Prosciuttini e coll. Forensic Sci Int. 2003 Jan 28;131(2-3):85-9).

Una tale probabilità sarebbe ugualmente ancora troppo bassa per materializzare, con questo processo, il rischio di creare false catene di genotipo compatibili con una persona assunta a caso (l'imputato).

Senonché, la corrente pratica forense ha rivelato che un certo numero di laboratori commette

alcuni fatali errori di interpretazione, che chiudono il cerchio rendendo inevitabile l'errore.

### **I *false friends* di analisti distratti**

Nella traduzione dalla lingua inglese all'italiano, un certo numero di vocaboli sembrano accattivare chi traduce, assonando con parole che nel linguaggio madre sono quasi identiche foneticamente ma hanno ben diverso significato. *Bald* significa calvo e non baldo nel senso di coraggioso. *Scholar* significa studioso egregio e non scolaro inesperto.

Così, questi analisti assumono regole che sembrano rassicurarli sulla propria infallibilità e invece li portano fuori strada.

Ecco alcuni dei *false friends* dell'analista inesperto di LCNDNA:

1. Posso ottenere il profilo dell'imputato; che importa dunque sapere di che natura è la traccia da cui esso mi proviene?
2. Ho un profilo complesso con molti picchi in un profilo misto LCN; alcuni questi combaciano con quelli dell'imputato; dunque li attribuirò a lui, tout court; trascurerò tutti gli altri, poiché essi sono dropins;
3. Ho un profilo complesso a più picchi in cui un solo picco è a comune con quello dell'imputato; il profilo può essere il suo poiché il picco mancante è dropped out;
4. Ho un profilo complesso che in parte combacia con quello dell'imputato ed un altro profilo di altra prova PCR in cui altri markers combaciano con lui: questo non è un caso e dunque li unisco insieme in un profilo 'di consenso'. Compilerò dunque una tabella in cui i due frammenti di profilo appaiono come se fossero derivati dalla stessa prova;
5. Il profilo, riprodotto in più prove è instabile e solo in una prova esso combacia con quello dell'imputato; attribuirò a lui il profilo compatibile, gli altri li eliminerò;
6. Ho costruito una tabella corrispondente a quella di una traccia mista; l'imputato vi compare sempre, pur in compagnia di altri picchi; pertanto dichiaro che la traccia è mista e che in essa compare l'imputato
7. Le contaminazioni escludono, io invece ho attribuito. Non posso pertanto essermi sbagliato.

Ed ecco, in sintesi la diagnosi dei relativi errori propiziati dai *falsi amici*.

1. La diagnosi generica e specifica è essenziale per definire mista una traccia, qualunque ne sia il profilo
2. Non c'è alcun modo per identificare i dropins; soprattutto, dropins non sono certo per definizione tutti i caratteri che non combaciano con quelli dell'imputato;
3. Non c'è modo per capire quale carattere è dropped out. Dropout non è certo per assunto ciò che manca per far combaciare la traccia all'imputato;
4. Non è generalmente lecito unire insieme il prodotto di due reazioni di PCR; non lo è mai se il campione è un LCN DNA.
5. Nelle reiterazioni del profiling di un campione LCN, non è lecito scartare le prove incompatibili e tenersi quelle compatibili.
6. Una tabella che rifletta l'ipotesi di una traccia mista deve essere soggetta a deconvoluzione combinatoria e probabilistica secondo un rigoroso protocollo di interpretazione.
7. L'incerta lettura di un incerto tracciato elettroforetico può indurre più d'uno a vedere

attribuzioni di genotipo dove non ce ne sono.

### **Un esempio di errore analitico con falsa attribuzione**

L'esempio che riporterò illustra il caso dell'attribuzione di una macchia biologica mai vista (di cui non si è mai dimostrata l'esistenza) ad un imputato, attraverso una complessa serie di errori e sviste analitiche e di interpretazione.

Un difficile reperto contenente molte macchie in stato di profonda degradazione indotta dall'azione del lungo lasso di tempo trascorso e dall'essere stato esposto agli agenti atmosferici è offerto all'analista per l'esecuzione di un esame in tema di profilo genetico.

Gli estratti di DNA deducibili dal reperto sono in teoria numerosissimi (il reperto è ampio, le macchie grandi ed evidenti).

Gli estratti lumeggiano tuttavia la prospettiva di una LCN analysis: il DNA è profondamente degradato e le copie di molecole veramente intatte sono scarse.

Nessuna attendibile prova di laboratorio è raccolta sul tipo di tessuto su cui sta lavorando; ora si suppone che vi possa essere una mistura di sangue proveniente da una vittima (il cui profilo è da dedurre da reperti più o meno altrettanto difficili) e da un imputato; ora invece si suppone che vi sia sovrapposizione tra sangue e saliva.

L'analista conosce a priori il profilo dell'imputato; quello della vittima è dedotto mediante reiterazione di prove sul reperto e su altri.

L'analista decide di allestire molte decine di estrazioni e da ciascuna molte reazioni PCR. I profili prodotti alla fine del processo sono poco più –poco meno di un migliaio.

Il profilo che ne deriva è tecnicamente di scadente qualità; esso sembra commisto ma è altamente instabile: pochissime prove sono tra loro comparabili in profilo.

L'analista si riserva la facoltà di scartare tutte le prove incompatibili (più o meno, tutte, considerate ciascuna individualmente).

Del migliaio di prove, l'analista salva solo pochi profili che sembrano assomigliargli a quello dell'imputato.

Tuttavia nessuno di questi è da solo in grado di assicurare sull'inesistenza di esclusioni a questo o quel marcatore dei 15-20 marcatori esaminati. L'analista decide allora di operare un'altra semplificazione smembrando l'unitarietà di ciascun profilo proveniente da ogni singola prova. Egli sceglie qua e là quelle parti di profilo che sono identiche a quelle dell'imputato (oppure che gli somigliano: i profili considerati non sono mai di buona qualità) e le astraе dal contesto incompatibile.

Egli costruisce dunque un profilo artificiale derivante da ciò che ha conservato dalle varie prove dopo l'eliminazione dei caratteri di disturbo (dropins).

La tabella (definita eufemisticamente come '*tabella di consenso*') riporta un genotipo identico a quello dell'imputato.

Questo esempio dimostra come sia possibile far emergere un profilo compatibile da una congerie di prove inconcludenti.

L'esempio è fittizio. Nel costruirlo ho tuttavia composto in un unico quadro l'insieme di errori e forzature indebite che ho potuto riscontrare in un certo numero di casi di indagine criminale realmente occorsi.

## **Le analisi di LT/LCNDNA nella cronaca giudiziaria internazionale e nella realtà italiana**

La potenziale e devastante fallacia di una errata interpretazione di un profilo da LT7LCN DNA è nota da tempo agli esperti.

Un acceso dibattito si è sviluppato sul più corretto modo di impiegare LT DNA senza incorrere nelle fatali secche dell'errore tecnico e conseguentemente giudiziario.

Chi volesse farsi un'idea delle posizioni scientifiche espresse sinora e di quanto il tema sia ancora aperto può consultare le colonne dell'autorevole *Forensic Science International-Genetics* (in particolare, si veda il volume 5 del gennaio 2011). Oppure può leggere la News Feature pubblicata su Nature il 18 marzo 2010 (Nature, 464, 347-348). In quest'ultimo commentario sono anche narrati alcuni errori giudiziari occorsi nelle corti di giustizia inglesi e riportati i commenti di esperti schierati per opposte opinioni (i detrattori di LCN DNA analysis e i suoi estimatori).

La realtà del nostro paese non fa ovviamente eccezione in questo panorama. Ciò che tuttavia è mancato è, nel nostro ambiente forense, **l'apertura di un dibattito scientifico nel contesto dei processi in cui LCN è stato utilizzato**. Eppure si tratta di casi il cui corso processuale ha meritato il tono sensazionalistico della carta stampata. Molti di questi processi largamente noti al grande pubblico si sono conclusi con l'emissione di una sentenza di condanna grazie a profili LCN. Mentre vi sono solide ragioni scientifiche per dubitare che le prove scientifiche esibite fossero corrette ciò sia avvenuto.

La quasi totale mancanza di credito accordato alle opinioni di consulenti tecnici della difesa, che pure parlavano aderendo strettamente ai reali problemi tecnici sottostanti, stupisce e preoccupa. Preoccupa in pari misura la totale ed acritica concessione di credito ad analisi condotte senza un preciso metodo e senza garanzie tecniche.

Più recentemente, un'inversione di tendenza sembra emergere con la riconsiderazione in sede tecnica di perizie condotte senza sufficienti requisiti di attendibilità.

Sullo sfondo resta tuttavia il problema posto dall'editoriale di Nature che si è appena citato: 'L'aula di giustizia non è il miglior posto per lo sviluppo di un dibattito serio su LCN'. Il più importante contesto in cui fare emergere i problemi e le opinioni, oltre a quello delle riviste scientifiche e dei congressi specialistici, resta quello dell'ambiente giudiziario. E' più è più intollerabile che la Magistratura requirente e Giudicante non abbia potuto essere informata del problema se non quando vi fosse l'assillo della gestione del caso concreto – nel quale inevitabilmente finiscono col prevalere altre logiche che la pura discussione scientifica. Il processo si nutre inevitabilmente di molto altro che di perizie in tema di DNA profiling e la suggestione di un esame tecnico mal fatto può alterarne il delicato equilibrio di tesi contrapposte a confronto.

L'ambiente giudiziario ha anche in parte sofferto dell'influenza di un certo atteggiamento dell'opinione pubblica che ha fatto dei profili di DNA (forse ed inizialmente non senza motivo) oggetto di enfasi e di iperbole positiva. L'iperbole incondizionata ha finito per troppo spesso coinvolgere e influenzare l'opinione tecnica sull'operato dei laboratori che sono preposti a produrli –specie quelli pubblici delle forze di polizia.

Invece, è solo attraverso una capillare azione di informazione tecnica nei confronti dell'organico della Magistratura sugli attuali problemi di cui soffre l'applicazione dei DNA profiling in Italia che

si può restituire a questa metodologia il giusto ruolo che per essa si deve rivendicare:  
non sempre prova regina ma solo Prova, da vagliare e verificare in ogni caso cui essa sia applicata.