



Azienda
Ospedaliero
Universitaria
Careggi



CONSIDERAZIONI
OMICIDIO MEREDITH KERCHER
5 GIUGNO 2009

Dr.ssa FRANCESCA TORRICELLI
Specialista in Genetica Medica
Professore a contratto di Genetica
Direttore Servizio di Diagnostica Genetica
Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi

Indice

- 1) Norme per la Gestione della qualità
- 2) Tracce miste
- 3) Contaminazione
- 4) conclusioni (rep 165B ,136,137,66,36A, 36B)

1 - Considerazioni riguardo le Norme per la Gestione della Qualità

La Dott.ssa Patrizia Stefanoni ha sottolineato che lavora, come tutti i professionisti, in termini di Buona pratica di Laboratorio (BPL).

BPL

Ritengo quindi opportuno per chiarire di che cosa stiamo parlando fare alcuni cenni riguardo questa problematica .

La Buona Pratica di laboratorio (BPL) rappresenta un insieme di regole riguardanti l'ispezione e la verifica delle procedure organizzative e delle condizioni in accordo alle quali sono programmate, svolte, registrate e comunicate le ricerche di laboratorio per le prove non cliniche. La BPL trova la sua origine negli USA sin dal 1976. In ambito comunitario la prima norma che ha introdotto ufficialmente la BPL per i prodotti chimici, globalmente intesi, è stata la direttiva del Consiglio Europeo 79/831/CEE del 16 settembre 1979. La direttiva- richiedeva, 'genericamente, che le prove di "safety" dovessero essere condotte rispettando i principi della BPL.

Tuttavia è solo con la direttiva del Consiglio Europeo 88/320/CEE del 9 giugno 1988, concernente l'ispezione e la verifica della Buona Pratica di Laboratorio, e con il suo primo adattamento al progresso tecnico (direttiva della Commissione Europea 90/18/CEE del 18 dicembre 1989) che sono state gettate le basi per una applicazione generalizzata dei principi della BPL.

In Italia, a parte alcuni brevi cenni ai principi della BPL in una circolare dell'allora Direzione Generale del Servizio Farmaceutico (la n. 54 bis del 30 marzo 1967), bisogna arrivare al 1992 per vedere codificate l'adozione e l'applicazione dei principi della BPL nella normativa nazionale e. precisamente. nel decreto legislativo 27 gennaio 1992. n. 120 di recepimento della direttiva del Consiglio Europeo 88/320/CEE e del suo primo adattamento al progresso tecnica (direttiva della Commissione 90/18/CEE).



ISO 9001 e la 17025.

Intanto in Europa nascono per le industrie le Nome ISO tra queste anche la ISO 9001/1 994 la cui ultima revisione è stata licenziata nel 2008

Tengo a precisare che, nell'ambito dei laboratori, tali certificazioni in Italia ancora non sono obbligatorie per poter svolgere la propria attività professionale, Per quanto riguarda in particolare la ISO 17025, attualmente 6 in corso un'ampia discussione se inserire tale obbligo anche nella legge che sta per essere emanata. Pochi laboratori Italiani, che eseguono indagini genetiche per malattie ereditarie rare, sono stati certificati per la ISO 9001, la ISO 15189. Tali laboratori hanno ritenuto di certificarsi per potersi adeguare agli altri stati membri dell'Unione europea nell' ambito della rete europea delle malattie rara, *ciò* che il nostro laboratorio della Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi ha ritenuto di fare.

La Norma UNI EN ISO 9001-2008 definisce quindi le regole relative alla gestione della qualità di una Azienda qualsiasi e viene conseguentemente adattata al laboratori che vengano considerati come fossero una azienda .

Viene poi quindi emanata la Norma ISO -DIS 15189 intitolata "Gestione della qualità nei laboratori di Analisi Cliniche " che prende in considerazione le norme della ISO 9001 adattandole in modo specifico alle caratteristiche proprie dei laboratori di analisi cliniche "

Le analisi effettuate nei laboratori di analisi cliniche afferiscono a differenti discipline di laboratorio che comprendono:

1. anatomia patologica incluse istopatologia e citopatologia; .
2. biochimica clinica, biochimica molecolare e monitoraggio dei farmaci;
3. sierologia trasfusionale incluse le prove di istocompatibilità;
4. ematologia e coagulazione;
5. immunologia clinica;
6. microbiologia clinica incluse batteriologia, parassitologia, virologia e micologia;
7. tossicologia clinica;
8. citogenetica incluse le prove di riproduzione;
9. infine anche la genetica e patologia molecolare

La Norma UNI EN ISO 17025, (2005) è una norma per i *laboratori* di prova fino ad ora obbligatoria per industrie alimentari e per laboratori di analisi di controllo qualità, rivolti particolarmente verso industrie che producono un prodotto alimentare. Questa norma definisce sia le regole per la gestione di un laboratorio sia le regole per assicurare la competenza tecnica del Laboratorio ad eseguire le prove (qualifica del , personale, controllo della strumentazione). La norma richiede di *definire* l'incertezza di misura del laboratorio , presentare i risultati secondo regole stabilite e ancora altro.

Nell' Aprile 2000, il GeFI (Genetisti Forensi Italiani) e la SIGU (Società Italiana di Genetica Umana) emana una serie di raccomandazioni sulle indagini biologiche di paternità e le indagini di identificazione criminale ¹.



Tra le varie raccomandazioni a lavorare in termini di BPL rilevo la raccomandazione qui trascritta:

"Lava lidazione emi etodi, e le correlative linee-guida debbono ricercare il consenso iù ampio della comunità scientifica e non essere patrimonio di un singolo esperto o di gruppi di esperti quantunque accreditati die sperienza. Còie particolarmente importante per il sistema giudiziario del nostro paese che non dispone di istanze preliminari di conalida dei metodi di scienza prestati all'amministrazione ellag iustizia.

Le Raccomandazioni del GEFI e della SIGU recepiscono orientamenti scientifici sui quali vie ampio consenso internazionale"

Tale raccomandazione inoltre viene riconsiderata nel commento fatto alla ISO 17025 dalla Società Internazionale di Genetica Forense (ISFG)

Nel maggio 2007 l' Organizzazione per la cooperazione economica e lo sviluppo (OECD) emana delle raccomandazioni specifiche per assicurare la qualità nell'ambito dei Test genetici molecolari ⁱⁱ. Una delle raccomandazioni sottolinea che, nell'ambito degli accreditamenti nei vari stati membri, si consideri che la ISO 15189 è rilevante per tutti i laboratori di analisi, ma non specifica per i laboratori che utilizzano test genetici molecolari mentre si adatta a tutti i laboratori la ISO 17025 utile per l'accREDITAMENTO di laboratori di esami e di calibrazione.

Questa panorama di norme, di raccomandazioni europee, ancora non sono così stringenti per i Laboratori Italiani. Si comincia adesso a sottolineare l'importanza di adeguarsi all' Europa, lo sottolinea anche l'ultimo documento " raccomandazioni delta Commissione Ministeriale per la Genetica " del Ministero del Lavoro ,della Salute e delle politiche Sociali pubblicato nel 2009 . Il bisogno di adeguamento deriva dal fatto che il DNA per indagini genetiche viene scambiato tra i vari laboratori europei e anche le prove di DNA per uso forense, anzi più precisamente i profili genetici, vengono sempre più considerati *dei prodotti* (quel profilo è di quel soggetto)

La dimostrazione che in Italia ancora non abbiamo laboratori di forense certificati ISO 17025 lo si evince dai documenti pubblicati dal SINAL (unico Ente sovraordinato che può dare la certificazione per questa ISO) che attesta quali laboratori sono certificati realmente ISO 17025: quelle presenti nell'elenco sono tutte strutture che lavorano nel campo alimentare. Sicuramente alcuni Laboratori pubblici di Forense, in questo momento hanno richiesto la visita di certificazione al SINAL (tra questi, come dichiarato in aula, il Laboratorio della Polizia Scientifica, il Laboratorio del Prof. Tagliabracci come anche il nostro a Firenze, e forse altri a noi sconosciuti), sottolineando quindi che la richiesta è volontaria. La ragione della richiesta è quella di poter stare alla pari con le analoghe strutture in Europa e forse anche di poter essere pronti qualora la Legge, in procinto di essere esecutiva, lo richieda .

Comunque, allo stato attuale, l'unica condizione per essere sicuri di lavorare bene é lavorare in linea con la BPL, riconoscersi ed attuare le linee guida (cioè le raccomandazioni) emanate dal Governo e/o dalle Società Scientifiche internazionali e/o nazionali

2 - Considerazione riguardo le tracce Miste

L'occorrenza di tracce miste può essere genericamente prevista qualora nel profilo genetico per marcatori autosomici siano individuate più di due forme alleliche a ciascun locus.

Nel caso di marcatori del cromosoma Y una traccia mista si caratterizza per la presenza di almeno due alleli a ciascun locus, poiché un unico soggetto maschile contribuisce con un'unica forma allelica possedendo egli un unico cromosoma Y ⁱⁱⁱ.

La definizione di traccia mista dal punto di vista pratico attiene alle varie componenti che l'hanno prodotta.

Uno degli esempi più frequenti è il riscontro di tracce miste nei reati di violenza sessuale, laddove tipicamente la componente femminile (cellule vaginali) sia mischiata a quella maschile (liquida seminale). Ma i casi possono essere i più svariati.

3 - Considerazioni riguardo la contaminazione

A - agenti biologici

Le analisi del DNA, per la loro sensibilità, inevitabilmente mettono in evidenza delle componenti cellulari minoritarie (contaminanti).

Le tecniche del DNA permettono infatti oggi di ottenere risultati anche dall'esame di cellule epiteliali, che vengono normalmente lasciate quando un soggetto si trovi a toccare un qualsivoglia oggetto oppure parti del suo corpo siano in contatto con lo stesso.

Il trasferimento, di cellule epiteliali avviene comunque per contatto, per cui se si rileva, un profilo genetico su un oggetto, è evidente che il soggetto donatore vi sia venuto in contatto o vi sia stato un trasferimento mediante altro mezzo.

Il fenomeno delle contaminazioni si può verificare anche in laboratorio, tuttavia l'esperienza del laboratorio deve essere tale da impedire tale evenienza (ad esempio la Dott.ssa Stefanoni in aula ha specificato che all'inizio di un'analisi, prima di cominciare una operazione con un reperto, appoggia sul banco un telo monouso e utilizza pinze ed altro monouso).

E' già nota da alcuni anni la possibilità di estrarre DNA da oggetti toccati.

Tuttavia la quantità di DNA che può essere recuperata varia molto e può dipendere da vari fattori: i principali sono la quantità di DNA lasciato sull'oggetto e la capacità di recupero ed estrazione del DNA dal campione. Possono inoltre influire fattori quali le caratteristiche del substrato, gli agenti atmosferici, il tempo di contatto, ecc. ^{iv}

La quantità di DNA lasciato su un oggetto toccato presenta una variabilità interindividuale; ciò rende possibile distinguere tra buoni e cattivi donatori. I motivi per cui ciò avvenga non sono ad oggi ben chiari. E' noto però che vi sia una corrispondenza tra pulizia delle mani e quantità di DNA depositato sull'oggetto ^v. La quantità di DNA che viene ricavata, da questo tipo di campione è generalmente molto esigua; per cui molto spesso si possono ottenere profili con alleli spuri o fenomeni di drop-in/drop-out. I profili ottenuti da DNA depositato su oggetti toccati risultano comunque c'è non facile interpretazione.

B - agenti chimici

Un possibile contaminante possono essere metalli, o altre molecole chimiche che competono con le soluzioni utilizzate per la PCR (amplificazione) determinando fallimento della reazione.

La varichina (ipoclorito di sodio) distrugge il DNA mediante un danno ossidativi quale la modificazione delle basi e la produzione di basi clorinate. L'esposizione del DNA a concentrazioni crescenti di ipoclorito di sodio determina un clivaggio delle eliche frammentando il DNA fino a generare singole basi. Possono comunque restare del DNA degenerato (frammentato) tale da rendere difficile l'analisi dei profili.

4 – Conclusioni

Dopo avere analizzato la documentazione acquisita dalla Aw. Maresca, riguardante i risultati delle analisi dei 228 reperti analizzati dalla Dr.ssa Stefanoni, possa rilevare che gli esami sono stati eseguiti utilizzando metodi di estrazione, di dosaggio di DNA, di amplificazione e di corse elettroforetiche e di sistemi di analisi, utilizzando Kits, strumenti e software raccomandati dalla Società Internazionale di Genetica Forense (ISFG). Quindi ci può confermare che tale metodologia di indagine sia stata eseguita in termini di BPL (Buona Pratica di Laboratorio).

Fatta questa importante considerazione ritengo opportuna soffermarmi su i risultati di alcuni reperti:

REP 166A – Borsa

La traccia A repertata sulla borsa ritrovata nella stanza della vittima, è risultata essere una "mistura di sostanze biologiche contenenti sangue umano". Confrontando il profilo autosomico misto ottenuto dalla traccia A (sono presenti dai 2 ai 4 alleli per locus) con i profili individuati di Meredith Kercher e Rudy Hermann Guede, possa asserire che trattasi di una traccia mista i cui donatori sono Meredith Kercher e Rudy Hermann Guede confortata anche dal risultato dell'aplotipo per il cromosoma Y, ottenuto sempre dalla traccia A, che coincide con l'aplotipo del cromosoma Y di Rudy Hermann Guede.



REP 171 B - Felpa e REP 59B – Reggisenò

I reperti 171 B e 59B, repertati rispettivamente sulla felpa e sul reggisenò riportano il profilo di Meredith Kercher. È stato eseguito, in entrambi i reperti, anche l'analisi dell'aplotipo del cromosoma Y che è risultato essere lo stesso del profilo ottenuto da Rudy Hermann Guede. Questo è possibile data la maggiore sensibilità del Kit utilizzato per l'analisi del cromosoma Y in grado di evidenziare un profilo in presenza di minime quantità di DNA.

REP 165B -Gancetto , di reggisenò

Nel caso di specie un gancetto per reggisenò dovrebbe contenere necessariamente una componente cellulare di colei che indossava l'indumento (Meredith) che quindi lo aveva presumibilmente toccato e in ogni caso aveva avuto la pelle a contatto con essa. Tale componente è attesa essere maggioritaria e così risulta infatti dai profili elettroforetici presentati dal Consulente del PM.

Questi, esaminando il Consulente del PM i profili autosomici misti rileva anche la presenza di una componente allelica minoritaria in termini quantitativi, stimata dal consulente di parte circa 1 a 10. Lasciamo un attimo da parte la valutazione di questo complesso profilo.

La traccia viene anche caratterizzata per i marcatori del cromosoma Y, esame che permette di "annullare" dal punto di vista tecnico il maggior contributo femminile e di evidenziare la componente esclusivamente di origine maschile^{vi}. Tale esame ha evidenziato un profilo genetico di ottima qualità perfettamente compatibile con il DNA di Raffaele Sollecito. È vero che sono presenti altre forme alleliche, ma in termini quantitativi minoritari rispetto alla componente principale.

La comparazione sul database YHRD per 17 marcatori del cromosoma Y ha dimostrato 0 match con gli aplotipi presenti^{vii}. I consulenti della difesa Sollecito nella relazione prodotta nel corso del procedimento, in particolare il Prof. Tagliabracci riferisce che: *"il profilo fornito (dal Consulente del PM) ricorre 25 volte nel dataset (lo stesso del Consulente del PM) di 36174 aplotipi (11 loci)"* Infatti il Prof. Tagliabracci ha utilizzato per la ricerca di un uguale profilo nel database soltanto 11 loci di quelli esaminati dal Consulente del PM che in realtà aveva individuato in modo molto chiaro ben 17 loci permettendole, aumentando il numero, di essere molto più sensibile nell'individuazione di un soggetto maschile con lo stesso profilo. Questa valutazione fa capire anche come mai i nuovi Kits commerciali, riconosciuti idonei per l'uso nella forense, abbiano aumentato il numero di loci da esaminare da 11 a 17

Di fatto la medesima situazione si nota nel profilo autosomico, ove è vero vi sono forme alleliche aggiuntive (sottolineate appositamente, locus per locus dal consulente della difesa Sollecito Prof. Francesco Vinci nella relazione da lui redatta e prodotta nel corso del procedimento), ma certamente minoritarie rispetto alle forme alleliche indicate dalla Dott.ssa Stefanoni.

Sostanzialmente quindi evidente che il profilo misto per i marcatori autosomici corrisponde proprio a una miscela originata da una componente maggioritaria



appartenente a Meredith e a una minoritaria COMPATIBILE con Sollecito.

E infatti la Dott.ssa Stefanoni correttamente conclude dicendo a pag. 202 delle trascrizioni dell' esame reso davanti al GUP "... mistura di sostanze biologiche appartenenti ad almeno .due individui... ." non escludendo la presenza di una componente minoritaria derivante da altri soggetti. Pur comprendendo le eccezioni sollevate dai consulenti delle difese degli indagati , ovvero la indicazione della presenza di ulteriori profili genetici , se pur minoritari derivanti da altri soggetti, questo consulente non può non evidenziare che l'intero accertamento riscontra in modo certo la presenza di tutti i loci corrispondenti al profilo di Raffaele Sollecito

Più avanti "...risultato di compatibilità, compatibile con l'ipotesi di mistura di sostanze biologiche (presumibilmente cellule di sfaldamento) appartenenti a Sollecito Raffaele e a Meredith".

Nel caso di specie le caratteristiche osservate del profilo misto in cui sono presenti oltre ai loci autosomici , maggioritari di Meredith, anche tutti i loci autosomici di Raffaele Sollecito e la presenza di un cromosoma Y il cui aplotipo è compatibile con l'aplotipo ottenuto dal campione di saliva prelevato da Raffaele Sollecito, rendono, a nostra parere, non necessaria alcun altro tipo di valutazione per stabilire **che la traccia mista presente sul gancetto contiene sicuramente una componente maggioritaria appartenente a Meredith e a una minoritaria COMPATIBILE con Sollecito.**

Si potrebbe obiettare di introdurre anche una valutazione numerica in grado di sostenere il peso di questa compatibilità. Infatti l'interpretazione di profili misti complessi, del tipo di quello rappresentato, potrebbe richiedere l'impiego di sistemi probabilistici esperti di analisi in grado, una volta indicata una serie di profili genetici possibili, di calcolare la probabilità di ciascuno di essi. Attualmente non esistono software commerciali validati disponibili per condurre analisi su questo tipo di tracce complesse. Pertanto come dichiarato dalla Società Internazionale di Genetica Forense (ISFG), a commento della ISO 17025, non è possibile, per raggiungere un risultato delle analisi eseguite, utilizzare sistemi che non siano validati o che non siano ripetibili in altri laboratori attenersi a questo vuol dire lavorare secondo la buona pratica di laboratorio: BPL)

Reperto 136: campionatura di presunta sostanza ematica prelevata dal contenitore di plastica trasparente per cotton-flock

Reperto 137: gocciolature di presunta sostanza ematica prelevate dall'interno del lavabo

Reperto 66: campionatura di presunta sostanza ematica prelevata dal margine dello scarico del bidet

L'esame degli elettroferogrammi relativi alle tracce di cui sopra evidenzia la presenza di profili genetici misti,

Anche in questo caso le conclusioni del Consulente sono corrette e forse anche troppo prudenti Si tratta evidentemente misture cellulari dervanti da due soie donne (il



Consulente dice invece "almeno due individui di sesso femminile".) Non vi sono tuttavia loci ove risulti la presenza di un numero maggiore di quattro alleli; anzi solo tre loci presentano quattro forme alleliche diverse. Tale caratteristica indica come i contributori non siano più di due. E l'analisi del locus amelogenina non mostra la presenza del cromosoma Y, per cui si deve trattare necessariamente di due donne.

Sul reperto 66 sono presenti in alcuni loci forme alleliche aggiuntive che possono però essere considerate componenti contaminanti.

Il confronto dei profili misti con i profili di Meredith e Arnanda evidenzia la costante presenza di tutte le forme alleliche delle due donne, in quantità variabile tra diverse tracce. Tale condizione permette quindi di asserire che l'ipotesi che le macchie miste si siano originate dalle due donne contro l'ipotesi che possano derivare da Meredith e da un'altra donna sconosciuta superiore a 1×10^{15} (1×10 elevato alla 15). Tale valore numerica è talmente elevato da far considerare praticamente impossibili ipotesi alternative.

Reperto 36A Grosso coltello lungo 31 cm con manico nero- traccia manico (profilo di Amanda Knox)

Reperto 36B Grosso coltello lungo 31 cm con manico nero-traccia lama (profilo di Meredith Kercher)

Le due tracce 36A e 36B, repertate in localizzazioni differenti del coltello (rispettivamente sul manico e sulla lama), riportano i profili genetici di Amanda e Meredith. .

Il profilo 36A include, per tutti i loci, gli alleli appartenenti ad Amanda Knox la quale deve essere considerata il donatore di tale traccia, al di là di ogni ragionevole dubbio. Sebbene il reperto 36B presenti un profilo parziale a causa della scarsità di campione, tale profilo può essere riconducibile alla vittima.

Ds.ssa Francesca Torricelli

Riferimenti bibliografici

ⁱ "Raccomandazione sulle indagini biologiche di paternità e le indagini d'identificazione criminale" Aprile 2000, il sito GEFI (<http://www.mclink.it/personal/MD1696/gefi> e il sito SIGU (<http://sigu.univr.it>)



- ii "OECD guidelines for quality assurance in molecular genetic testing" 2007
- iii Gill et al. " DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the interpretation of mixtures" Forensic Sci Int 2008 160 (2-3):90-101
- iv Alessandrini, Tagliabracci, et al., "Fingerprints as evidence or a genetic profile: morphological study on fingerprints and analysis of exogenous and individual factors affecting DNA typing," J Forensic Sci. 2003 May; 48(3):586-92.
- v Lowe et al., The propensity of individuals to deposit Dna and secondary transfer of low level Dna from individuals to inert surfaces. Forensic Sci Int 129,2002; 25-34).
- vi Gusmao L et al, "DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis." Int J Legal Med. 2006 Jul; 120(4):i 91 -200
- vii Willuweit S et al. 'Y chromosome haplotype reference database (YHRD): update." Forensic Sci Int Genet. 2007 Jun;1(2):83-7. Epub 2007