



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE GIURIDICHE  
"CESARE BECCARIA"

società italiana di biodiritto 



ASSOCIAZIONE ITALO-GIAPPONESE  
PER IL DIRITTO COMPARATO



STRUTTURA TERRITORIALE DI FORMAZIONE  
DECENTRATA DEL DISTRETTO DI MILANO

## PROVA GENETICA ED ERRORE GIUDIZIARIO

Aula Magna del Tribunale di Milano - Corso di Porta Vittoria

23 marzo 2015

# *Low copy number: il fattore "quantità" nell'impiego giudiziale del DNA*

*Carlo Previderè*

*Dipartimento di Sanità Pubblica,  
Medicina Sperimentale e Forense*

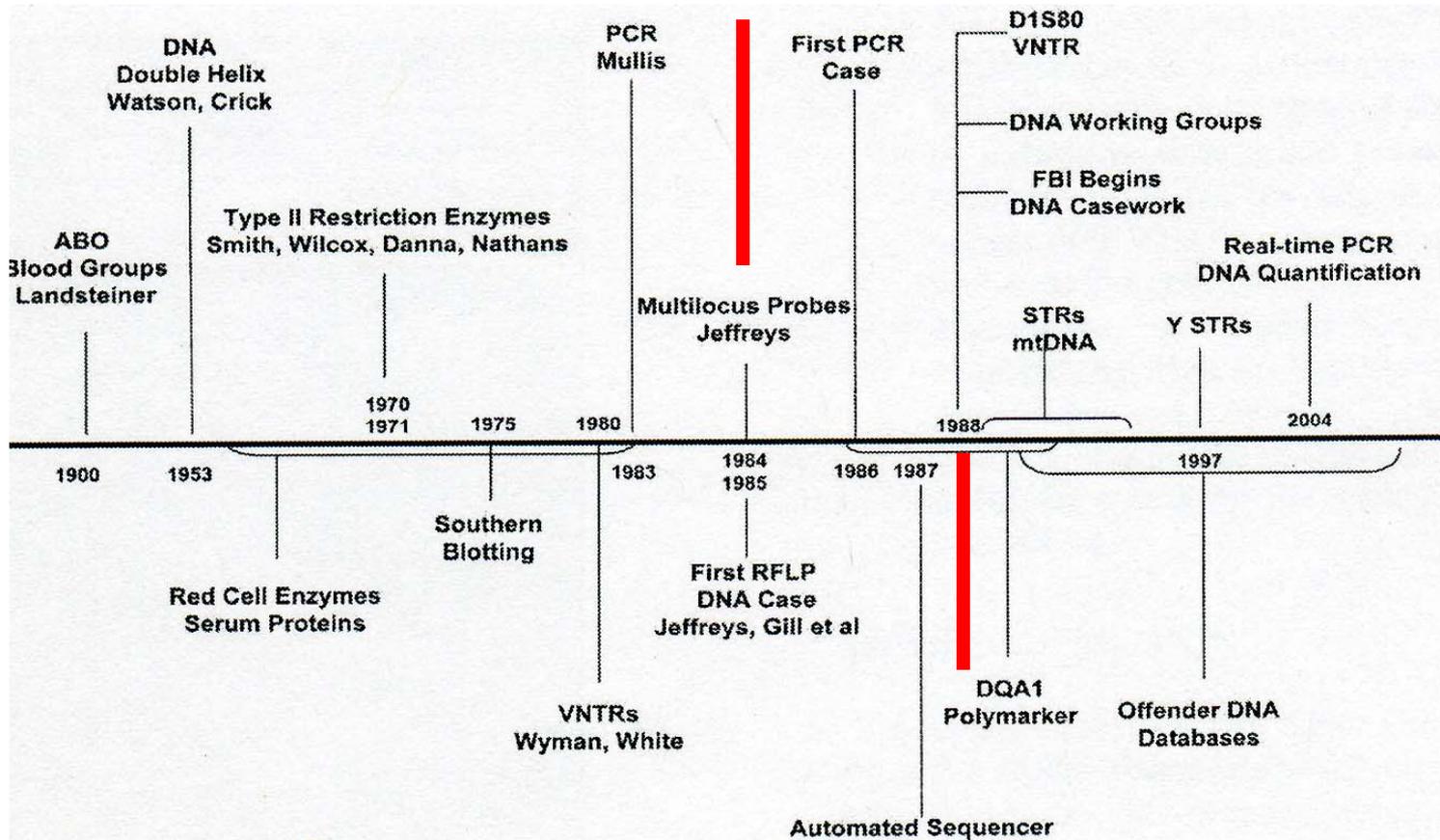
*Sezione di Medicina Legale e Scienze Forensi*

*Università degli Studi di Pavia*

*email: [previde@unipv.it](mailto:previde@unipv.it)*

# Il profilo genetico

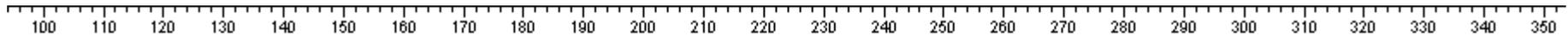
2015



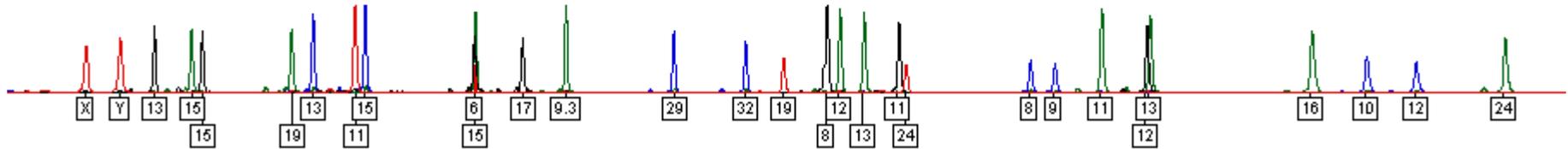
Identificazione di marcatori genetici polimorfici in grado di fornire un profilo genetico individuo-specifico a partire da differenti substrati biologici.

Incremento della sensibilità analitica, grazie alla tecnica della PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

# IL PROFILO GENETICO

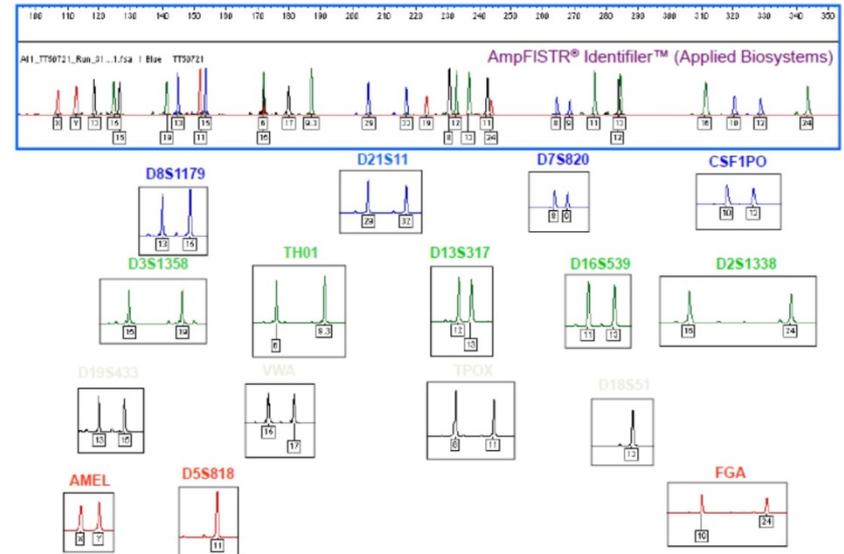
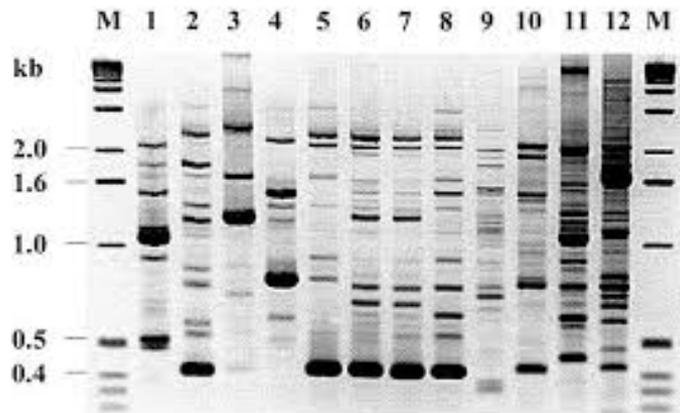


A11\_TT50721\_Run\_31...1.fsa 1 Blue TT50721



- Il profilo genetico è un insieme di caratteristiche genetiche acquisite analizzando specifici punti del DNA definiti nell'ambito di uno standard internazionale.
- Le metodiche di analisi sono ormai standardizzate e validate all'interno della comunità scientifica internazionale.
- Sulla base di queste caratteristiche è stato possibile definire banche dati del DNA.

# Il profilo genetico

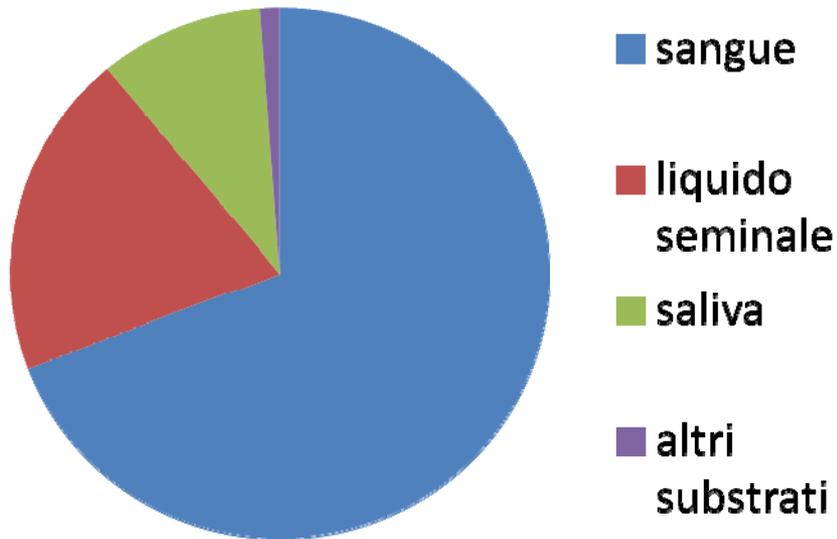


Sensibilità analitica incrementata di 6 ordini di grandezza. E' sufficiente una quantità di materiale biologico 1 milione di volte inferiore per ottenere un profilo genetico individuo specifico.

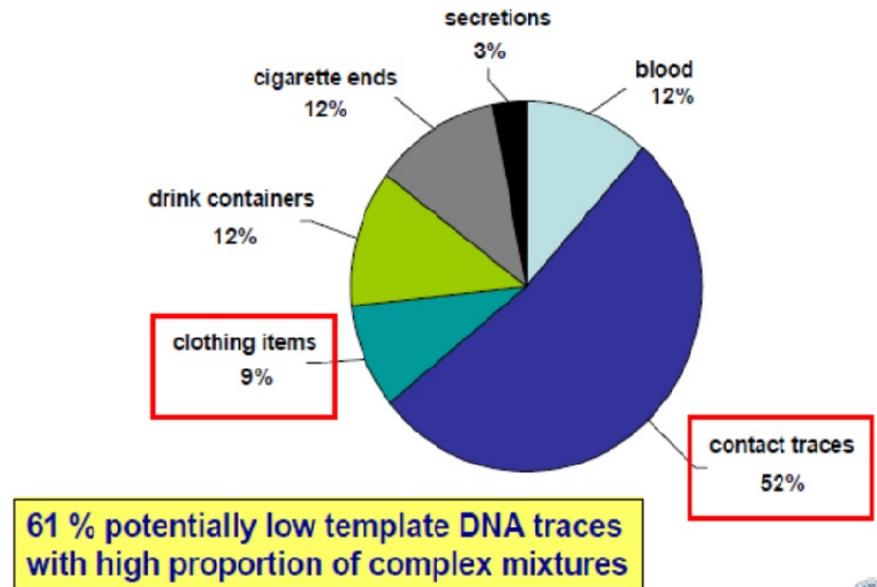
E' possibile tipizzare diversi substrati biologici ed ottenere profili genetici di alta qualità anche da reperti non recenti.

# Il profilo genetico

## campioni biologici 2000-2006

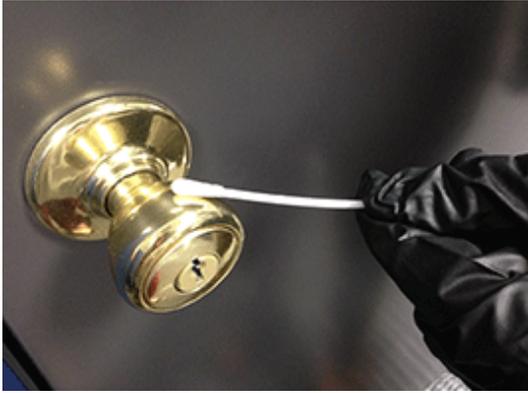


## Crime scene samples 2008 (n = 2400)



P.M. Schneider, GeFI Pavia 2012

# *Touch DNA*



Il DNA è ricavato dal DNA frammentato presente nelle cellule di desquamazione epiteliale che rimangono sull'oggetto, dopo il contatto. E' stata documentata la presenza di CNAs, *cell free nucleic acids*, DNA veicolato dal sudore.

# Touch DNA

Table 1: Summary of amount of DNA detected via contact.

Amount of DNA	Mean	Contact type/substrate	Source
0 - 5.2ng	0.52ng	glass held for 60s	Daly, et al <sup>4</sup>
0 - 14.8ng	1.23ng	fabric held for 60s	Daly, et al <sup>4</sup>
0 - 169ng	5.85ng	wood held for 60s	Daly, et al <sup>4</sup>
0.16 - 6.4ng	[blank]	swab of hands	Bright & Petricevic <sup>5</sup>
0-0.4ng	[blank]	fingers pressed on various substrates for 30s	Alessandrini, et al <sup>6</sup>
0 - 50.8ng	1.7ng	various volume crime evidence items	Raymond, et al <sup>7</sup>
[blank]	4.3ng	wallets held for 60s	Raymond, et al <sup>7</sup>
3.1 - 33ng	11.7ng	wallets held for various times	Raymond, et al <sup>7</sup>
[blank]	17.8ng	plastic knife held for 15 min.	van Oorschot and Jones <sup>8</sup>
6.8ng	[blank]	mug held for 15 min.	van Oorschot and Jones <sup>8</sup>
34ng	[blank]	glass held for 15 min.	van Oorschot and Jones <sup>8</sup>
[blank]	51ng	vinyl gloves worn for 20-90 min.	van Oorschot and Jones <sup>8</sup>
[blank]	11.68ng	cotton rubbed with palm, finger, and side of hand for 15s	Goray, et al <sup>9</sup>
[blank]	0.396ng	plastic rubbed with palm, finger, and side of hand for 15s	Goray, et al <sup>9</sup>

- Se una persona entra in contatto con un oggetto, necessariamente lascia proprie cellule? Esistono “buoni donatori” e “cattivi donatori”.
- Se le lascia, è possibile ricavarne il profilo genetico?
- Quanto tempo rimane il DNA sull’oggetto “toccato”?
- E’ possibile il trasferimento secondario?

# *Touch DNA*

- Il DNA è limitato quantitativamente, in quanto deriva da poche cellule.
- Molto spesso, vi sono molteplici contributori in quanto l'oggetto è stato utilizzato da più persone.
- I reperti possono essere non recenti, essere cioè relativi a casi giudiziari datati anche decenni. Vi può essere il problema della degradazione del DNA.
- Particolare cura deve essere posta nell'analisi di tali reperti per i pericoli di possibile contaminazione.

# *Touch DNA*

Perché è ora possibile l'analisi di questo tipo di reperti?

## **Incremento sostanziale della sensibilità analitica**

- dal 2007 in avanti vi è stato un susseguirsi di migliorie tecniche nello sviluppo di reagenti ed enzimi in grado di aumentare in modo significativo la sensibilità dei kit utilizzati per le analisi.
- Sviluppo di strumentazione analitica (sequenziatori) (ABI 3500) con sensibilità analitica 4 volte superiore rispetto a quella dei modelli precedenti .
- Alcuni laboratori hanno sviluppato protocolli “ad hoc” per l'analisi di LCN-DNA (aumentando i cicli di PCR).

# *Touch DNA*

L'incremento della sensibilità analitica è una  
lama a doppio taglio.

A fronte della possibilità di tipizzare virtualmente ogni tipo di reperto, vi è una maggiore responsabilità nel riportare risultati potenzialmente di grande impatto nell'ambito di un Procedimento Penale.

Tutto questo, alla luce della possibilità di contaminazione e di trasferimento secondario o terziario.

*“Does the presence of a single cell (or even a few cells) in an evidentiary sample truly have meaning?”*

(Butler J.M., 2015, in Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation)

# Cos'è il DNA *Low Copy Number* (LCN-DNA)?

## LT-DNA (*Low Template DNA*)

## LL-DNA (*Low-Level DNA*)

- *definizione basata su una quantità:*

“the analysis of any sample that contained less than 100 pg of template DNA”  
*quantità che corrisponde a (circa 15 cellule)*

*(Gill P., FSI, 2000)*

- *definizione “qualitativa”, basata sull’analisi dei profili genetici*

“LCN typing simply can be defined as the analysis of any DNA sample where the results are below the stochastic threshold for reliable interpretation”

(Budowle, 2009 <http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp12proc/contents/budowle.pdf>)

- *definizione “operativa” basata sulla riproducibilità dei risultati*

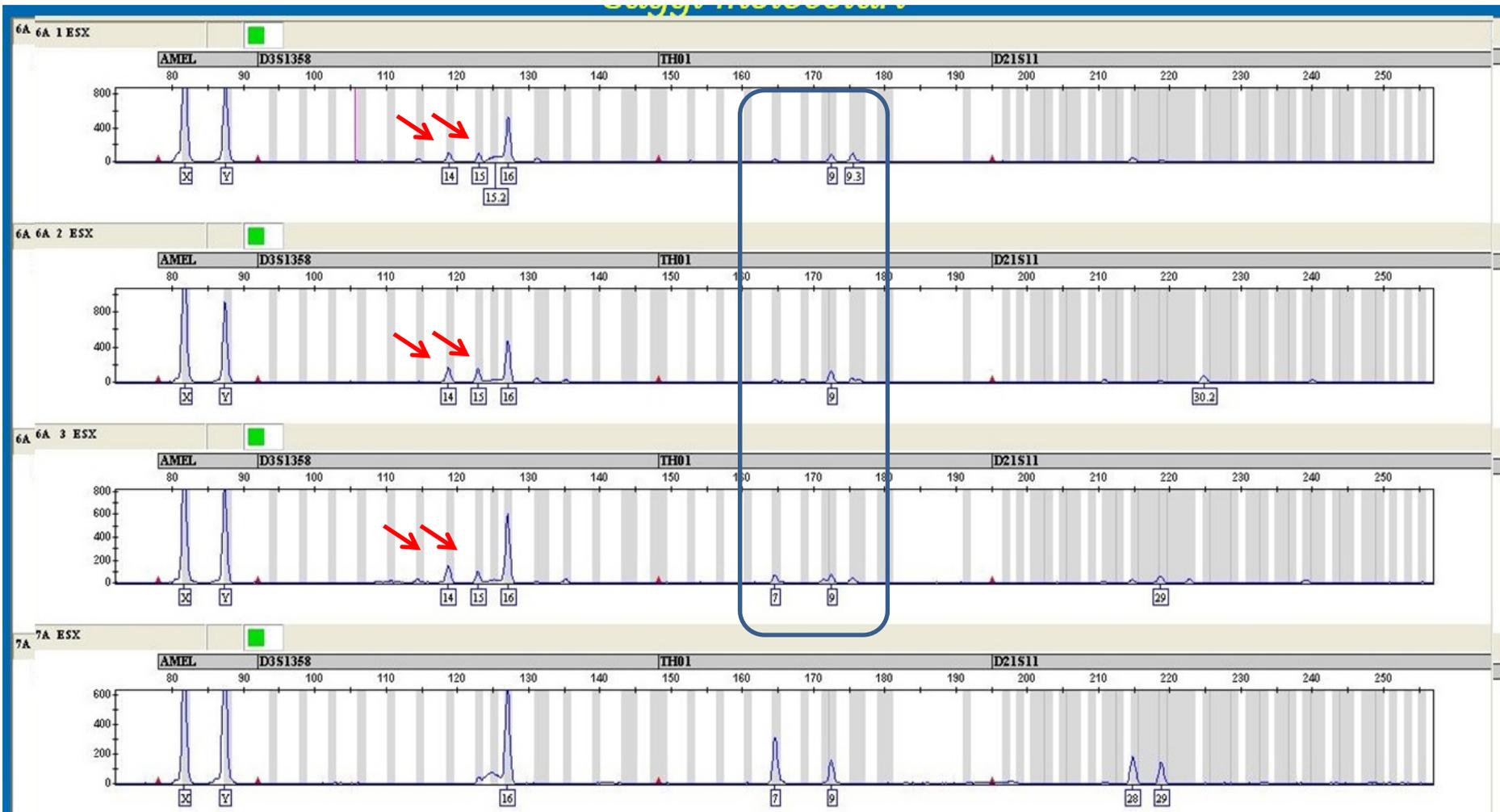
Se un profilo non è riproducibile in esperimenti indipendenti è un LCN-DNA

*(implicito in questa definizione è il fatto che i risultati non siano frutto di una singola amplificazione ma che si ottengano da differenti repliche)*

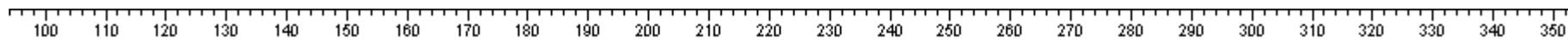


# Perché è così problematica l'analisi in condizioni di DNA *Low Copy Number* ?

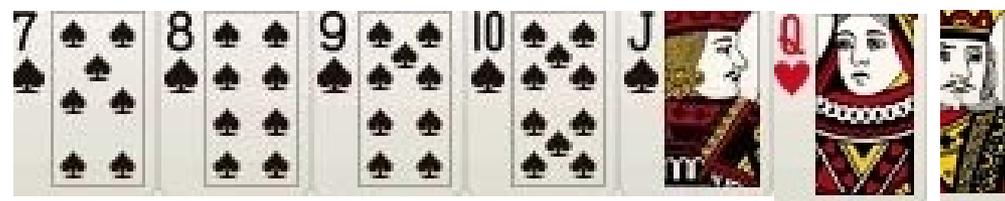
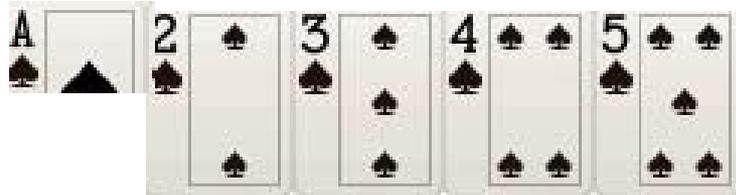
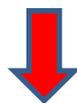
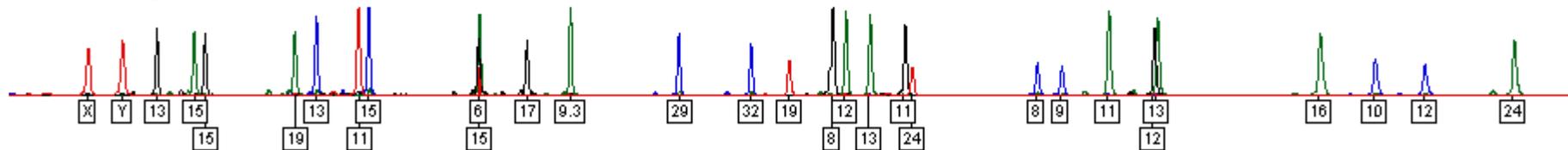
**Allele drop-in ADI** (contaminazione, danneggiamento del DNA)



# Perché è così problematica l'analisi in condizioni di DNA *Low Copy Number* ?



A11\_TT50721\_Run\_31...1.fsa 1 Blue TT50721



↑  
ADO

↑  
Locus drop-out

↗  
ADI

↑  
ADO

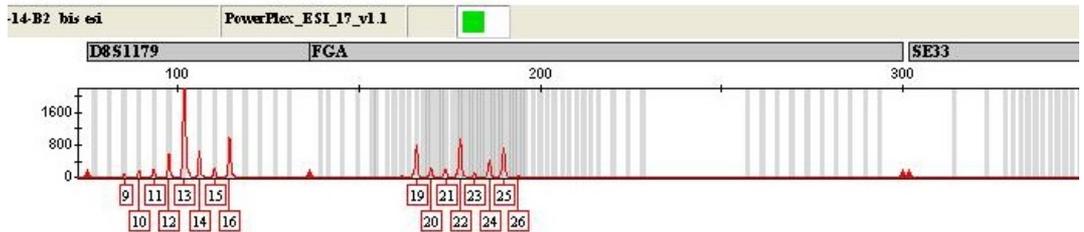
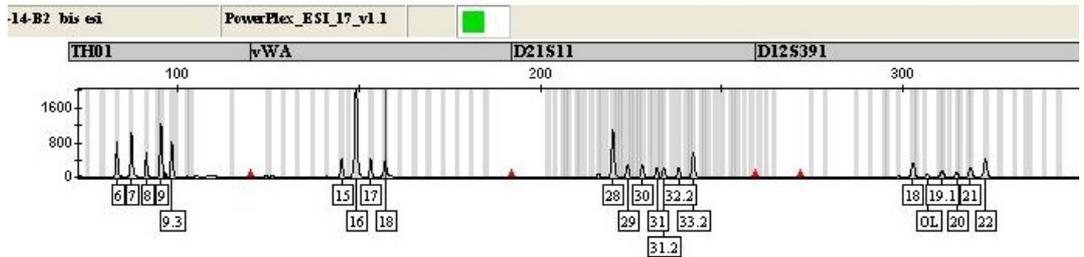
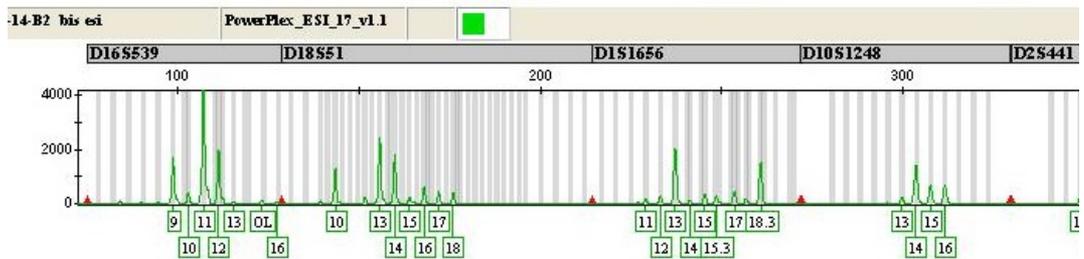
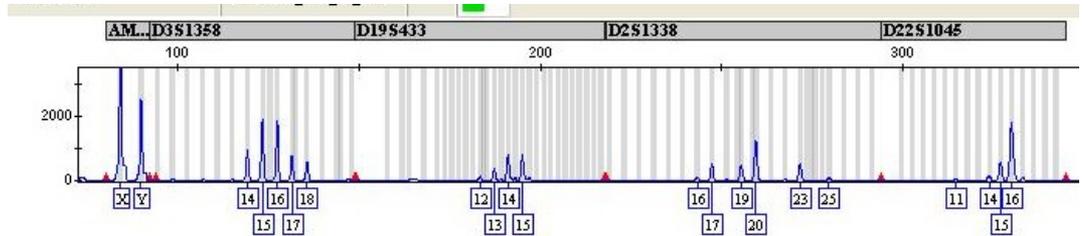
# Perché è così problematica l'analisi in condizioni di DNA *Low Copy Number* ?

- I profili genetici che si ottengono dall'analisi del “*touch DNA*” possono essere di complessa interpretazione.
- Una data traccia può essere stata originata dal contributo di più soggetti, i quali hanno concorso ad originare la traccia in misura quantitativamente differente.
- Possono essere contestualmente presenti fenomeni stocastici legati alla bassa quantità di DNA presente nel reperto

# Perché è così problematica l'analisi in condizioni di DNA *Low Copy Number* ?

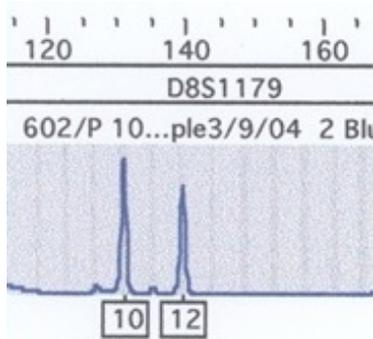
Contestuale contributo di  
almeno 4 soggetti.

Impossibile la  
*deconvoluzione*,  
ovverosia l'identificazione  
dei profili genetici dei  
singoli contributori



*Cosa si può fare per capire se un profilo genetico LCN è attendibile?*

**Poiché questi fenomeni artefattuali sono *stocastici*, cioè casuali, si cerca di testare la riproducibilità dei risultati in più esperimenti indipendenti**

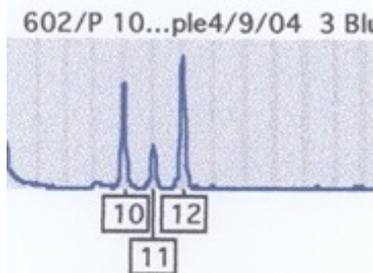


I esperimento

*Profilo consensus*

**10-12**

*Vengono riportate le caratteristiche genetiche che si ripresentano in più del 50% delle osservazioni*

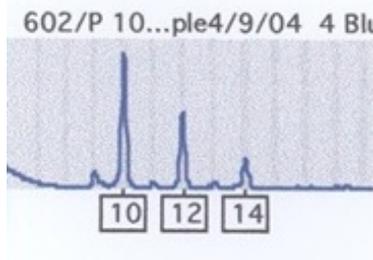


II esperimento

*Profilo composito*

**10-11-12-14**

*Vengono riportate tutte le caratteristiche genetiche osservate*



III esperimento

*Quali sono le indicazioni delle società scientifiche internazionali?*

Devono essere condotti studi di validazione all'interno di ogni laboratorio per la definizione di regole interpretative per il LCN-DNA. Per ogni kit, devono essere prese in considerazione variazioni dei protocolli per aumentare la sensibilità del saggio (*maggior numero di cicli di PCR, nested PCR, minore volume di reazione, WGA prima dell'amplificazione*).

Per evitare problemi legati ad eventi stocastici nel corso dell'amplificazione di LCN-DNA, il profilo *consensus* dovrebbe essere ricavato da almeno due/tre amplificazioni indipendenti (repliche).

*SWGDM- FBI Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, 2010*

# Quali sono le indicazioni delle società scientifiche internazionali?

## International Society for Forensic Genetics

### FORENSIC SOFTWARE RESOURCES

The ISFG is supporting OPEN SOURCE software projects in forensic accessible software packages offered to our scientific community.

The ISFG is listing these software applications as a service to the forensic providing any warranties on software performance. It is the responsibility of the user to perform the necessary validations and performance checks for the selected program meet any application requirements.

- ☞ Forensic DNA Statistics website
- ☞ LRmix Studio Community Edition
- ☞ Open source forensic package for R
- ☞ MixtureCalc v1.2 Excel sheet
- ☞ Mixture Analysis Excel sheet (for deconvolution)
- ☞ likeLTD ver. 4.1 for R
- ☞ MixSep mixture separation software for R
- ☞ DNAMIX3 for mixture calculation
- ☞ FamLink kinship software
- ☞ The bracket script (for replicated STR results)
- ☞ DNA commission recommendations 2012: Excel sheet for LR calculation drop-in events

A new website dedicated to **Forensic DNA Statistics** and interpretation of STR results has been launched:

☞ <https://sites.google.com/site/forensicdnastatistics/>

2012

Forensic Science International: Genetics 6 (2012) 679–688



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

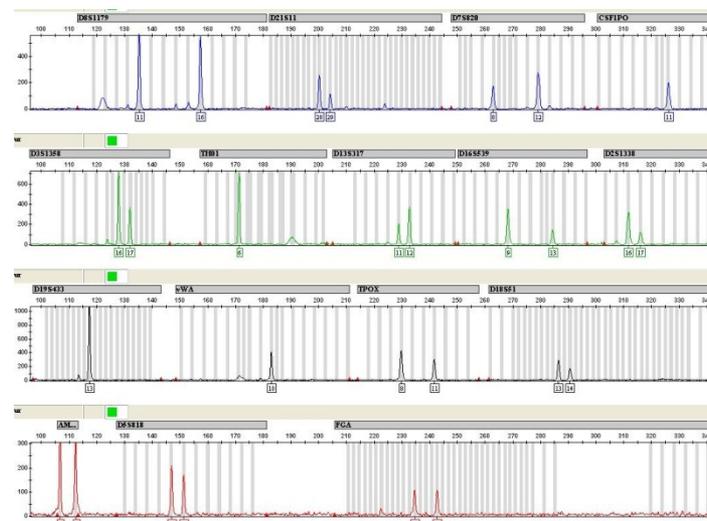
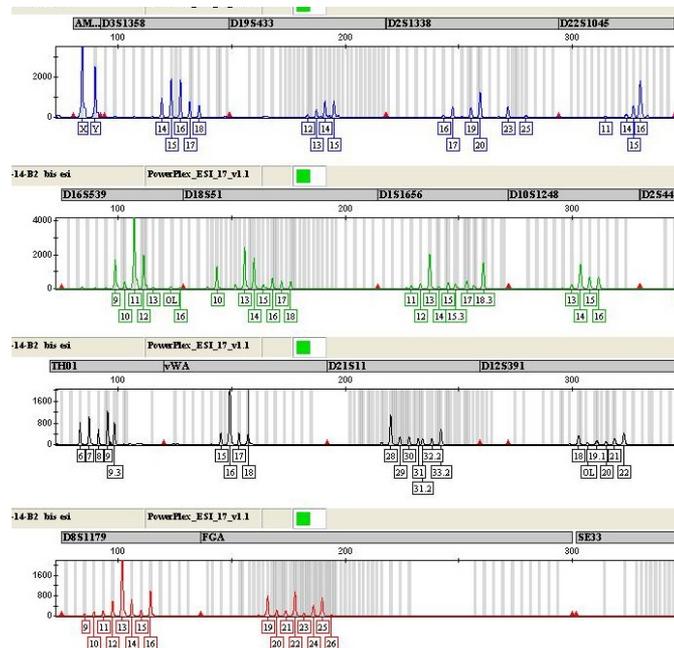
Forensic Science International: Genetics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fsig](http://www.elsevier.com/locate/fsig)

DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods

P. Gill<sup>a,b,\*</sup>, L. Gusmão<sup>c</sup>, H. Haned<sup>d</sup>, W.R. Mayr<sup>e</sup>, N. Morling<sup>f</sup>, W. Parson<sup>g</sup>, L. Prieto<sup>h</sup>, M. Prinz<sup>i</sup>, H. Schneider<sup>j</sup>, P.M. Schneider<sup>k</sup>, B.S. Weir<sup>l</sup>

Esistono più opzioni per un approccio statistico che preveda l'utilizzo di un software di valutazione probabilistica dei genotipi



SOFTWARE DI  
INTERPRETAZIONE  
STATISTICA



INDAGATO

# Valutazione dei risultati di un'analisi LCN-DNA

LR (likelihood ratio), ovvero sia un rapporto di probabilità, vengono tipicamente confrontate le ipotesi dell'accusa e della difesa. Il risultato ottenuto indica quanto è più probabile un'ipotesi rispetto all'altra.

$$LR = \frac{Hp \text{ (ipotesi dell'accusa)}}{Hd \text{ (ipotesi della difesa)}}$$

Se il risultato è **>1**, l'ipotesi è favorevole all'accusa  
Se è **uguale a 1**, l'ipotesi è neutra  
Se è **< 1**, l'ipotesi è a favore della difesa

Value of likelihood ratio	Verbal equivalent
> 1-10	Weak support for proposition
10-100	Moderate support
100-1000	Moderately strong support
1000-10,000	Strong support
10,000-1,000,000	Very strong
> 1,000,000	Extremely strong

<sup>6</sup> Association of Forensic Science Providers. Standards for the formulation of evaluative forensic science expert opinion. Science and Justice 49 (2009) 161-164

TABLE 13.1 Probabilistic Genotyping Software Programs (as of March 2014)

Program Name	Type	Creator(s)	Availability
LRmix	Discrete (semi-continuous)	Hinda Hared & Peter Gill	Open-source <a href="https://sites.google.com/site/forensiconstatistics/PCR-simulation/lrmix">https://sites.google.com/site/forensiconstatistics/PCR-simulation/lrmix</a>
Lab Retriever	Discrete (semi-continuous)	Developed by David Balding and maintained by Norah Rudin and colleagues	Open-source <a href="http://www.scieg.org/lab_retriever.html">http://www.scieg.org/lab_retriever.html</a>
likeLTD	Discrete (semi-continuous)	David Balding	Open-source <a href="https://sites.google.com/site/baldingstatisticalgenetics/software/likeLTD-r-forensic-dna-r-code">https://sites.google.com/site/baldingstatisticalgenetics/software/likeLTD-r-forensic-dna-r-code</a>
FST	Discrete (semi-continuous)	Adele Mitchell	Proprietary to the NYC OCME Forensic Biology Laboratory
Armed Xpert	Discrete (semi-continuous)	Developed by USACIL and maintained and improved by NicheVision	Commercial product <a href="http://www.armedxpert.com/">http://www.armedxpert.com/</a>
TrueAllele	Fully-continuous	Mark Perlin	Commercial product <a href="http://www.cybgen.com/">http://www.cybgen.com/</a>
STRmix	Fully-continuous	Duncan Taylor, Jo-Anne Bright, John Buckleton	Commercial product <a href="http://strmix.esr.cri.nz/">http://strmix.esr.cri.nz/</a>
DNA View Mixture Solution	Fully-continuous	Charles Brenner	Commercial product <a href="http://dna-view.com/">http://dna-view.com/</a>

Discrete (semi-continuous) methods use only the allele information in conjunction with probabilities of drop-out and drop-in. Fully-continuous methods use peak height data and other parameters in addition to the allele information.

Butler, J.M. (2015) *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation* (Elsevier Academic Press: San Diego), p. 341

For complex DNA profile, there is no predominant or overarching standard interpretation method (*Peter Gill, report to the UK Forensic Science Regulator, 2012*).

Nessuno è ancora in grado di dire con certezza se nella medesima situazione questi software forniscono un risultato comparabile.

**NON ESISTE UN APPROCCIO GIUDICATO MIGLIORE DI UN ALTRO, ALL'INTERNO DELLA COMUNITA' SCIENTIFICA INTERNAZIONALE, PER L'ANALISI DEL LCN-DNA.**

# Pareri discordanti all'interno della Comunità Scientifica Internazionale, circa l'analisi LCN-DNA

REVIEW

doi: 10.3325/cmj.2009.50.207

CMJ

Validity of Low Copy Number  
Typing and Applications to  
Forensic Science

Bruce Budowle<sup>1,2</sup>, Arthur  
J. Eisenberg<sup>1,2</sup>, Angela van  
Daal<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Forensic and  
Investigative Genetics, University of  
North Texas Health Science Center,  
Ft Worth, Tex, USA

Budowle( 2009) suggerisce di utilizzare il LCN-DNA solo per sviluppare spunti investigativi e/o per l'identificazione di resti umani

FORENSIC SCIENCE

doi: 10.3325/cmj.2009.50.250

CMJ

Validation of Testing and  
Interpretation Protocols for Low  
Template DNA Samples Using  
AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Identifier<sup>®</sup>

Theresa Caragine<sup>1</sup>, Rebecca  
Mikulasovich<sup>1</sup>, Jeannie  
Tamariz<sup>1</sup>, Ewelina Bajda<sup>1</sup>,  
James Sebestyen<sup>1</sup>, Howard  
Baum<sup>2</sup>, Mechthild Prinz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Office of Chief Medical Examiner  
of the City of New York, The

Applicando i protocolli operativi sviluppati nel laboratorio forense del Chief Medical Examiner, NY, USA, Caragine et al. (2009) hanno fornito il 100% di tipizzazioni corrette relativamente a più di 400 casi forensi.

*In quanti casi, l'analisi di "touch DNA" ha fornito profili genetici utilizzabili?*

Dati che provengono da presentazioni tenute convegno dell'American Academy of Forensic Sciences nel 2014 mostrano un tasso di successo piuttosto basso, attorno al 10%.

Presentazione A110,  
Polizia di NYC

Solo il 10% di 9.500 campioni da "touch evidence swabs" raccolti dal 2007 al 2011 hanno fornito risultati utilizzabili.

Presentazione A114,  
Contea di Allegheny

L'analisi di 56 prelievi da maniglie di portiere di autovettura ha fornito risultati attendibili solo in relazione a 6 reperti.

# L'analisi del LCN-DNA in Italia

Tutti i laboratori di genetica forense sia delle Forze dell'Ordine che dei laboratori universitari analizzano costantemente reperti da “*touch DNA*”. Quanti laboratori hanno sviluppato protocolli di validazione di profili genetici in condizioni LCN-DNA?

La società scientifica nazionale dei Genetisti Forensi Italiani (Ge.F.I) ha in programma di istituire un tavolo di lavoro “*interforze*” permanente, all'interno dell'organo di controllo della Banca Dati del DNA, che definisca le linee guida per l'interpretazione dei profili LCN-DNA e profili misti.

Quanti laboratori utilizzano i software di interpretazione statistica dei profili genetici complessi? Quali software vengono maggiormente utilizzati e con quale consapevolezza?



**EUROFORGEN**  
Network of Excellence

Home

**About EUROFORGEN-NoE**

The main objective of the European Forensic Genetics Network of Excellence – EUROFORGEN-NoE – is the creation of a European Virtual Centre of Forensic Genetic Research.

Forensic genetics is a highly innovative field of applied science with a strong impact on the security of citizens. The project, funded by the SECURITY programme of the European Commission under the 7<sup>th</sup> Framework Programme, started in January 2012 and will run for 5 years. It is coordinated by Prof. Peter Schneider of the Institute of Legal Medicine at the University Hospital of Cologne, Germany.

The network includes 12 partners from 8 countries including leading groups in European forensic genetic research. It aims to create a close integration of existing collaborations as well as to establish new interactions in this highly specialized field of security. Therefore, all key players such as scientists, stakeholders and end-users (e.g. police institutions and the justice system),

**EUROFORGEN-NoE** - The research leading to these results receives funding

# L'impiego giudiziale del LCN-DNA in Italia

Il caso più importante di valutazione di analisi LCN-DNA in ambito giurisprudenziale, è quello del delitto di Meredith Kercher, avvenuto a Perugia nel 2007.

In realtà, in quel caso, più che a profili genetici con artefatti originati da una bassa quantità di DNA, si è fatto riferimento alla possibilità di **contaminazione dei reperti** (coltello, gancetto), condizione che ha originato profili genetici LCN.

# L'impiego giudiziale del LCN-DNA in Italia

Siamo in attesa di conoscere le motivazioni della sentenza di condanna all'ergastolo dell'esecutore e del mandante dell'omicidio di Mauro Rostagno, sociologo e giornalista, avvenuto il 26 settembre 1988.

Il processo si è, in gran parte, basato sull'analisi del DNA condotta su frammenti di un sottocanna del fucile utilizzato per l'omicidio, “esplosi” a seguito di una modifica dell'arma per aumentarne la potenza.

Si è, quindi, cercato di stabilire se, su tali frammenti, fossero ancora presenti substrati biologici del soggetto che aveva utilizzato l'arma e se questi fossero riferibili all'imputato.

L'analisi era complicata dal fatto che almeno 8 soggetti, con sicurezza, potevano essere entrati in contatto per motivi professionali con i reperti.

I periti hanno concluso che **“i dati forniscono un supporto molto forte all'ipotesi che il DNA dell'imputato sia presente nelle misture campionate”**.

## *Conclusioni*

Esistono solo raccomandazioni operative su come dovrebbero essere valutati i profili genetici ottenuti da touch DNA ma NON esiste un modo unico, chiaro e condiviso di valutare questo tipo di risultati.

La valutazione è lasciata interamente allo scienziato forense che potrà essere proponso ad interpretare i dati o più cauto, dipendentemente da vari fattori.

“The crucial element that the scientist brings to any case is the **interpretation** of those observations. This is the heart of forensic science: it is where the scientist adds value to the process”

*Ian Evett (2000). The impact of the principles of evidence interpretation on the structure and content of statements. Science&Justice, 40, 233-239.*

## *Conclusioni*

“If you cannot explain your evidence to someone that is not from the field (like a judge) – and you need a lot of technical excuses to report something – than the result is not good. You should leave it on a desk and not take it to court. This is a very common sense approach to this problem”

*(Prof. P. M. Schneider, Conferenza Internazionale “The hidden side of DNA profiles: artifacts, errors and uncertain evidence”, Roma, Aprile 2012)*