UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Reparto Carabinieri Investigazioni Scientifiche di Parma

Touch DNA: approcci metodologici e strategie di campionamento per l'analisi di tracce forensi con limitato contenuto di DNA

Relatore:
Prof.Alessandro Achilli

Correlatori:
Ten.Col.inv.sc. Nicola Staiti
Ten.inv.sc. Elena Corradi

Tesi Sperimentale di
Simone Ricciardo

Anno Accademico 2025/2026

RIASSUNTO

In ambito forense, la scena del crimine è un contesto in cui sono presenti numerosi reperti e tracce biologiche che, se correttamente individuati e analizzati, possono fornire informazioni determinanti per la ricostruzione di un evento delittuoso. Le impronte papillari sono una delle principali prove utilizzate per l'identificazione individuale. Oltre a conservare le caratteristiche morfologiche delle creste, il contatto con una superficie può determinare il deposito di materiale biologico dal quale è possibile recuperare DNA, anche quando l'impronta non presenta dettagli sufficienti per una valutazione dattiloscopica. L'analisi di questo materiale, comunemente definito "*touch DNA"*, rappresenta tuttavia una sfida per la genetica forense, a causa delle quantità spesso estremamente ridotte di DNA disponibile e della sua distribuzione disomogenea, ulteriormente influenzate dalle caratteristiche del substrato e dalle condizioni di deposizione. La complessità aumenta quando le impronte entrano in contatto con materiale ematico appartenente a un altro individuo, dando origine a tracce biologiche nelle quali possono coesistere contributi genetici differenti, non sempre facilmente distinguibili.

In questo contesto si inserisce il presente lavoro di tesi, svolto presso il Reparto Investigazioni Scientifiche dei Carabinieri di Parma, con l'obiettivo di valutare l'efficacia dei tamponi della linea innovativa microFLOQ® Direct nel recupero di DNA da impronte papillari e da impronte associate a sangue diluito, attraverso un confronto con i tradizionali tamponi floccati Copan.

La sperimentazione ha previsto la riproduzione di differenti condizioni di interesse forense mediante la deposizione di impronte sebacee, palmari ed ematiche su substrati di diversa natura, tra cui vetro, ceramica, superfici metalliche, specchio e cartongesso. Sono state inoltre analizzate impronte su superfici contaminate da sangue, impronte ottenute per asportazione (impronte negative) e impronte prodotte mediante il contatto di dita precedentemente contaminate con sangue appartenente a un altro donatore, effettuando, in alcuni casi, deposizioni successive (deplezioni) al fine di valutare il recupero del materiale biologico in condizioni differenti.

Le tracce, documentate fotograficamente, sono state in alcuni casi sottoposte a trattamenti chimici di esaltazione mediante Leuco Crystal Violet (LCV), Amido Black (AB) e ninidrina, per valutarne la compatibilità con le successive analisi genetiche. Il materiale raccolto con le due metodiche di campionamento è stato quindi analizzato attraverso lo studio dei marcatori STR (*Short Tandem Repeats*) e dei relativi elettroferogrammi, considerando la qualità dei profili ottenuti e la possibilità di riconoscere i contributi dei diversi donatori.

I risultati hanno evidenziato come, anche a partire da quantità limitate di materiale biologico, sia possibile ottenere informazioni genetiche utili e, in determinate condizioni, distinguere il contributo dell'individuo che ha depositato l'impronta da quello del donatore del sangue. In particolare, alcuni campionamenti mediante i tamponi microFLOQ® hanno consentito di ottenere profili genetici distinguibili anche dopo il trattamento con Leuco Crystal Violet, mostrando come l'esaltazione chimica non precluda necessariamente il successivo recupero di DNA. Tuttavia, il confronto con altri tamponi convenzionali Copan ha restituito risultati variabili: in alcune prove i microFLOQ® hanno permesso di individuare contributi genetici non rilevati con il metodo convenzionale, mentre in altre condizioni altri tamponi floccati hanno fornito risultati migliori. Non è pertanto emersa una superiorità sistematica di una metodica rispetto all'altra, evidenziando

l’importanza delle condizioni sperimentali nella scelta della strategia di campionamento.

Nel complesso, lo studio sottolinea il valore di un approccio integrato all’analisi delle impronte papillari, nel quale l’esame dattiloscopico e quello genetico-forense rappresentano strumenti complementari per valorizzare al massimo le informazioni ricavabili dalla medesima traccia. In determinate condizioni, i tamponi microFLOQ® costituiscono una possibile risorsa per il campionamento mirato di evidenze caratterizzate da quantità limitate di DNA o dalla presenza di contributi genetici multipli, offrendo l’opportunità di preservare parte del reperto per eventuali accertamenti successivi.

INTRODUZIONE 7
1. LA GENETICA FORENSE 9
1.1 LA FASE DI CAMPIONAMENTO NELLA GENETICA FORENSE 9
2. LE TRACCE BIOLOGICHE FORENSI 11
2.1 SANGUE E BPA 11
2.2 SALIVA 14
2.3 LIQUIDO SEMINALE 15
2.4 CELLULE EPITELIALI E TOUCH DNA 15
2.5 LE IMPRONTE DIGITALI 16
3. LE IMPRONTE DI SANGUE 18
3.1 TECNICHE OTTICHE DI RIVELAZIONE 21
3.2 TRATTAMENTI CHIMICI DI ESALTAZIONE 22
3.2.1 COMPOSTI AMINO-REATTIVI 24
3.2.2 COLORANTI PER LE PROTEINE 25
3.2.3 COMPOSTI EME-REATTIVI 26
3.3 MIGLIORAMENTI POST TRATTAMENTO CHIMICO 29
3.4 IMPRONTE EMATICHE DIRETTE E INDIRETTE 29
4. VARIABILITÀ GENETICA, POLIMORFISMI E MARCATORI MOLECOLARI 34
4.1 I POLIMORFISMI DI LUNGHEZZA STRs 35
5. MATERIALI E METODI 40
5.1 MATERIALI UTILIZZATI 41
5.2 TRATTAMENTI CHIMICI 42
5.3 TEST BIOLOGICI PRESUNTIVI E CONFERMATIVI 46
5.4 microFLOQ 50
5.4.1 MICRO-CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DELLA TRACCIA 51
5.4.2 MICROFLOQ E AMPLIFICAZIONE DIRETTA DEL DNA 52
5.4.3 VANTAGGI E CRITICITÀ DEL SISTEMA MICROFLOQ 53
5.5 ANALISI DEL DNA 54
5.5.1 ESTRAZIONE DEL DNA 54
5.5.2 QUANTIFICAZIONE DEL DNA 57
5.5.3 AMPLIFICAZIONE PCR 61
5.5.4 TIPIZZAZIONE: SEPARAZIONE E RILEVAZIONE 65
6. SPERIMENTAZIONE 67
6.1 DEPOSITO SEBACEO DELL'IMPRONTA DI UNA MANO SU VETRO 67

6.2 DEPOSITO DI IMPRONTE SEBACEE SU UNA PIASTRELLA IN CERAMICA 69
6.3 DEPOSITO PER ASPORTAZIONE DI IMPRONTE DI SANGUE SU VETRO 71
6.4 DEPOSITO DI IMPRONTE SEBACEE E TRATTAMENTO CON SANGUE DILUITO SU UN RUBINETTO 76
6.5 DEPOSITO DELL'IMPRONTA DI UNA MANO SU UNO SPECCHIO 84
6.6 DEPOSITO DI IMPRONTE SEBACEE SU ACCIAIO BIANCO 88
6.7 DEPOSITO DI IMPRONTE SEBACEE SU CARTONGESSO 96
6.8 DEPOSITO DI IMPRONTE DI SANGUE DILUITO SU UN RUBINETTO 100
7. RISULTATI COMPLESSIVI 106
8. CONCLUSIONI 108
BIBLIOGRAFIA 109
APPENDICE 1 113
APPENDICE 2 118
APPENDICE 3 127
APPENDICE 4 132
APPENDICE 5 146
APPENDICE 6 156
APPENDICE 7 178
APPENDICE 8 190
APPENDICE 9 208

INTRODUZIONE

Nell'ambito delle indagini svolte sulla scena del crimine, le impronte digitali rappresentano una delle più importanti forme di evidenza dattiloscopica in virtù del potere identificativo basato sull'analisi dei caratteri papillari; inoltre, in talune situazioni possono assumere un ruolo importante anche per l'analisi biologica.

Infatti, un'impronta depositata su una superficie può contenere una quantità variabile di materiale biologico, costituito principalmente da cellule epiteliali e da eventuali residui presenti sulla superficie cutanea. Tale materiale che rappresenta una forma di *touch DNA* consente di affiancare all'analisi dattiloscopica quella genetico-forense.

La quantità di DNA recuperabile da un'impronta può essere estremamente ridotta e fortemente variabile in funzione dell'individuo, delle modalità di deposizione, della superficie e delle condizioni ambientali. La possibilità di ottenere un profilo genetico interpretabile dipende pertanto non solo dalla presenza del DNA ma anche dall'efficienza delle procedure utilizzate per il suo recupero e la successiva analisi.

Questa problematica assume particolare rilevanza sulla scena del crimine, dove il materiale biologico disponibile può essere scarso, distribuito in maniera non uniforme o associato a matrici complesse. Il campionamento di una traccia deve quindi essere effettuato cercando di massimizzare il recupero del materiale genetico, limitando al contempo il consumo della traccia stessa e le possibili perdite di DNA durante le fasi di trattamento.

Le procedure convenzionali di estrazione e purificazione possono determinare una perdita di materiale geneticamente informativo nei campioni con una ridotta quantità di DNA. Per questo motivo, negli ultimi anni sono stati sviluppati approcci alternativi basati sulla *direct PCR*, nei quali il materiale biologico viene sottoposto direttamente alla fase di amplificazione riducendo o eliminando le fasi intermedie di estrazione e purificazione del DNA.

Un'ulteriore complessità è rappresentata dalle impronte digitali contaminate da sangue. In una scena del crimine caratterizzata dalla presenza di sangue, infatti, un'impronta può entrare in contatto con il materiale ematico prima o dopo la sua deposizione. La traccia risultante può quindi contenere contemporaneamente il materiale biologico associato all'impronta e quello proveniente dal sangue. Questa situazione può assumere particolare importanza sia dal punto di vista dattiloscopico sia da quello genetico, poiché il profilo ottenuto può essere costituito da una miscela di contributi biologici differenti.

In questo contesto si inserisce l'interesse per i sistemi di campionamento miniaturizzati quali i tamponi microFLOQ Direct. Il loro impiego consente di effettuare un campionamento localizzato di una quantità molto ridotta di materiale biologico, preservando la maggior parte della traccia per eventuali analisi successive.

La particolare configurazione del tampone, associata alla possibilità di trattare il campione in protocolli di amplificazione diretta, permette di ridurre il numero di passaggi analitici e, potenzialmente, le perdite di DNA associate alle procedure convenzionali. Studi sperimentali hanno dimostrato la possibilità di ottenere profili STR mediante *direct PCR* a partire da campioni di sangue

diluito, saliva e *touch DNA* raccolti con tamponi microFLOQ, evidenziandone il potenziale nell'analisi di campioni caratterizzati da quantità limitate di materiale biologico.

Questo progetto di tesi nasce con lo scopo di prendere in considerazione impronte digitali depositate su differenti substrati e sottoposte a diverse condizioni sperimentali, con particolare attenzione alle impronte associate a materiale ematico in differenti concentrazioni e diluizioni.

Tale approccio permette di simulare una situazione di interesse nella pratica forense, nella quale un'impronta papillare può essere rinvenuta in prossimità di una traccia ematica o risultare direttamente contaminata da essa. La complessità di tali reperti rende necessario considerare contemporaneamente la componente dattiloscopica e quella biologica, valutando sia la possibilità di visualizzare e interpretare l'impronta, sia la possibilità di recuperare materiale genetico sufficientemente conservato e amplificabile.

Alla luce di queste considerazioni si è scelto di analizzare il ruolo dei tamponi microFLOQ a confronto con i tamponi floccati nel moderno iter della genetica forense, con particolare attenzione al recupero di tracce biologiche caratterizzate da un ridotto contenuto di DNA e al loro possibile impiego nell'analisi delle impronte digitali quando queste ultime non sono rilevanti dal punto di vista dattiloscopico.

L'elaborato si concentra sullo studio delle caratteristiche tecnologiche dei tamponi microFLOQ e sulla loro applicazione al recupero di *touch DNA* mediante procedure di amplificazione diretta (*direct PCR*), nonché al campionamento di materiale biologico da impronte digitali contaminate da sangue.

L'obiettivo finale è valutare se il micro-campionamento mediante tamponi microFLOQ possa rappresentare uno strumento efficace per integrare due differenti livelli di indagine sulla scena del crimine: l'identificazione dattiloscopica dell'impronta e la caratterizzazione genetica del materiale biologico a essa associato.

1. LA GENETICA FORENSE

La genetica forense è una branca delle scienze forensi che applica le conoscenze della biologia molecolare e della genetica dell'identificazione individuale in ambito giudiziario. Permette di analizzare tracce biologiche ritrovate sulla scena del crimine con lo scopo di riconoscere: un soggetto, stabilire relazioni biologiche o escludere individui da un'indagine investigativa.

L'introduzione delle tecniche di analisi del DNA ha rivoluzionato il panorama forense moderno, permettendo alti livelli per la discriminazione individuale rispetto ai precedenti metodi sierologici. La svolta si ebbe nel 1985 quando Alec Jeffreys sviluppò il metodo del "*DNA fingerprinting*", che si basa sullo studio delle regioni ipervariabili del genoma umano, il quale rese possibile l'identificazione genetica individuale con un alto livello di accuratezza e portò velocemente allo sviluppo delle metodiche molecolari nei procedimenti giudiziari.

Con il passare del tempo, l'avanzamento della tecnologia ha permesso una significativa evoluzione delle tecniche analitiche, passando dalle RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ai moderni sistemi basati sulla PCR (*Polymerase Chain Reaction*), fino all'impiego di sistemi completamente automatizzati ad alta sensibilità.

Ad oggi l'analisi dei loci STR (*Short Tandem Repeats*) è il *gold* standard della genetica forense, grazie alla capacità di ottenere profili genetici altamente discriminanti anche a partire da quantità minime di DNA. Contemporaneamente all'evoluzione delle metodiche di amplificazione e tipizzazione genetica, è migliorata l'attenzione nei confronti della fase preanalitica, ovvero il recupero delle tracce biologiche sulla scena del crimine. Infatti, la qualità del campione raccolto è fondamentale per l'analisi del profilo genetico finale, definendo l'importanza del campionamento come una fase cruciale dell'intero processo.

1.1 LA FASE DI CAMPIONAMENTO NELLA GENETICA FORENSE

La fase di campionamento rappresenta una delle fasi più delicate dell'analisi forense, poiché i possibili errori derivanti dalla raccolta delle tracce biologiche compromettono irreversibilmente il risultato analitico finale.

L'obiettivo principale del campionamento consiste nel recuperare la maggiore quantità possibile di materiale biologico cercando, nel migliore dei modi, di mantenere la sua integrità e qualità. Tuttavia, molte superfici che si trovano sulla scena del crimine risultano complicate per il campionamento a causa delle caratteristiche del substrato, della presenza di inibitori oppure dell'esiguità della traccia biologica. Solitamente il campionamento delle tracce biologiche viene effettuato mediante i tamponi in cotone o rayon, che vengono inumiditi con acqua sterile o con soluzioni tampone. Sebbene questi strumenti siano ampiamente utilizzati, presentano alcuni svantaggi:

- scarsa efficienza nel rilascio del materiale biologico
- perdita di DNA durante la fase di estrazione
- elevato rischio di contaminazione

- difficoltà nel recupero di tracce molto localizzate
- efficacia limitata nelle analisi di *touch DNA*

L'aumento della sensibilità delle tecniche PCR ha evidenziato l'esigenza di strumenti di campionamento più efficienti e specifici per il recupero di tracce biologiche contenenti quantità minime di DNA. In questo scenario si inseriscono i tamponi microFLOQ Direct Swabs, che hanno lo scopo di rilevare scarse quantità di materiale biologico con protocolli di *direct amplification.*

2. LE TRACCE BIOLOGICHE FORENSI

Le tracce biologiche sono tra gli elementi più rilevanti nell'ambito delle indagini forensi, in quanto permettono l'identificazione a livello genetico di un soggetto tramite l'analisi del DNA contenuto nei materiali biologici ritrovati sulla scena del crimine.

La possibilità di riuscire a ricondurre un profilo genetico a uno specifico individuo ha determinato un profondo cambiamento nel sistema giudiziario e investigativo, rendendo la genetica forense uno strumento essenziale per l'accertamento dei fatti e l'attribuzione delle responsabilità penali. Per traccia biologica si intende ogni possibile materiale di origine umana, animale o vegetale che presenta acidi nucleici analizzabili. Questi reperti possono essere visibili a occhio nudo oppure presenti in quantità microscopiche e difficilmente individuabili senza l'ausilio di metodologie specifiche. L'elevata sensibilità delle moderne tecniche di biologia molecolare permette di ricavare dei profili genetici anche da scarse quantità di materiale, ampliando notevolmente le possibilità investigative. L'importanza delle tracce biologiche non dipende unicamente dalla presenza del DNA ma anche dal contesto in cui sono ritrovate.

Una corretta interpretazione forense richiede un'attenta valutazione che vada a considerare:

- Le modalità di deposizione
- La natura del substrato
- Le dinamiche del trasferimento
- I possibili rischi di contaminazione
- Il deterioramento della traccia nel corso del tempo

L'acquisizione e l'analisi delle tracce biologiche devono, di conseguenza, essere eseguite seguendo rigorosamente il protocollo al fine di garantire l'integrità del campione e l'affidabilità del risultato analitico.

2.1 SANGUE E BPA

L'identificazione e la caratterizzazione delle tracce di sangue avvengono da più di 120 anni, da quando il sistema dei gruppi AB0 venne scoperto da Landsteiner nel 1901. Lo sviluppo delle tecniche di caratterizzazione degli isoenzimi dei globuli rossi e la scoperta di marcatori genetici nel siero, durante gli anni Settanta, hanno migliorato significativamente le possibilità di caratterizzazione delle tracce di sangue umano. Successivamente, lo sviluppo della PCR e lo studio dei marcatori STR hanno fornito strumenti fondamentali per l'identificazione genetica individuale (1).

Il sangue rappresenta una delle evidenze scientifiche maggiormente impiegate nelle indagini relative a reati violenti. L'analisi delle tracce di sangue è la Bloodstain Pattern Analysis (BPA), una disciplina che si occupa di studiare le tracce ed i diversi disegni di schizzi di sangue sulle varie superfici in una scena del crimine. Questo tipo di analisi è sfruttata per la ricostruzione degli eventi che includono: omicidi, aggressioni, incidenti stradali o scene del crimine in generale.

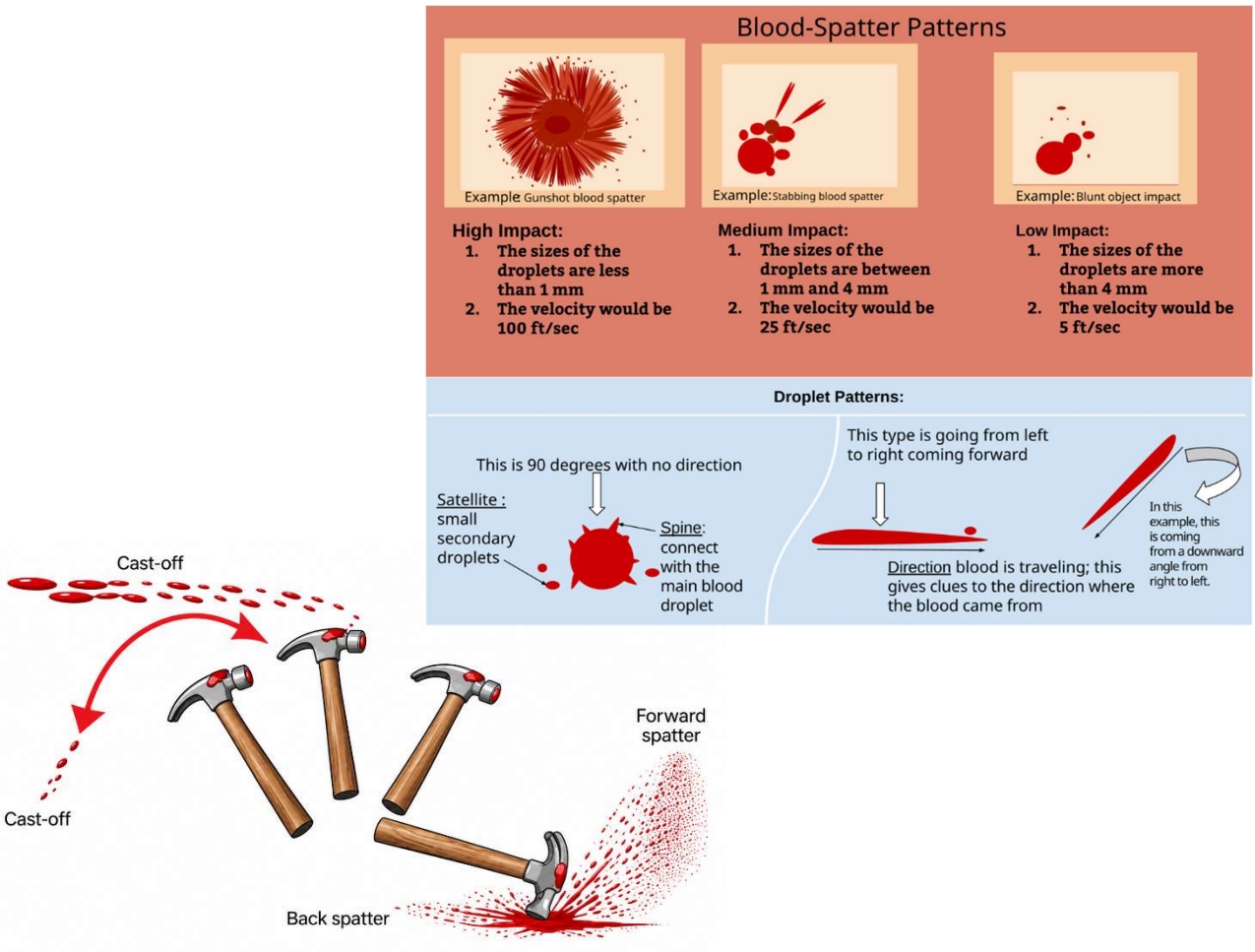
Figura 1: Operatori di Polizia Giudiziaria sulla scena del crimine



La BPA può essere utilizzata direttamente sulla scena del crimine o attentamente studiata su fotografie in unione al dettaglio dei vestiti, armi o altri oggetti di interesse investigativo. Oltre a contribuire alla ricostruzione della scena del crimine, la BPA può fornire diverse informazioni (2):

- Tipo di traccia: possono esserci tipologie diverse di tracce ematiche, come gocce, schizzi, spruzzi, tracce di trasferimento e altre. Tutte queste tipologie possono dare informazioni importanti sulla dinamica dell'evento.
- Forma e dimensione: queste ultime possono indicare la possibile direzione e l'angolo di impatto, nonché la velocità con cui il sangue è stato proiettato sulla superficie.
- Distribuzione: può indicare la posizione e il movimento delle persone o degli oggetti nella scena del crimine.
- Angolo d'impatto: quest'angolo è dato dall'impatto delle gocce di sangue con la superficie sulla quale sono state ritrovate. È utile per determinare da dove proviene e in che direzione si è mosso il sangue.
- Sequenza degli eventi: l'analisi dei modelli delle tracce ematiche può aiutare a stabilire la sequenza degli eventi in una scena del crimine, come ad esempio se un'aggressione è accaduta prima o dopo una seconda attività.

Figura 2: Blood-Spatter Patterns



Vengono esaminate diverse caratteristiche delle tracce di sangue:

- L'area di convergenza ed origine della traccia di sangue;
- Tipo di direzione dell'impatto che ha prodotto la traccia di sangue o gli schizzi;
- Meccanismi attraverso i quali si è formato il disegno degli schizzi;
- La possibilità di capire come una traccia ematica sia riuscita a depositarsi sulla superficie di un oggetto;
- La posizione della vittima, dell'aggressore e degli oggetti nella scena durante il sanguinamento;
- Il movimento della vittima e dell'assalitore, ed oggetti dopo il meccanismo che ha prodotto lo spargimento di sangue;
- Il supporto o le contraddizioni alle dichiarazioni fornite da indagato o testimoni;
- La correlazione con i risultati ricavati da altri laboratori su indizi rilevanti per le investigazioni scientifiche;

Gli esperti di BPA sfruttano metodi scientifici e strumenti specifici per analizzare e descrivere precisamente queste tracce di sangue. Le loro conclusioni possono essere utilizzate in tribunale come prove per stabilire i dettagli di un crimine o per escludere determinate teorie sugli eventi.

Nel contesto del presente lavoro, lo studio delle tracce ematiche assume particolare rilevanza non tanto per la ricostruzione della dinamica degli eventi, quanto per l'individuazione, la documentazione e il successivo campionamento del materiale biologico. Sebbene la *Bloodstain Pattern Analysis* (BPA) sia principalmente finalizzata all'interpretazione della morfologia e della distribuzione delle tracce di sangue, la loro corretta caratterizzazione costituisce un elemento utile per orientare le successive analisi di laboratorio. In questa prospettiva, il presente studio si concentra sulle impronte papillari contaminate da materiale ematico, valutando gli effetti dei trattamenti di esaltazione sulla loro leggibilità e sulla possibilità di recuperare DNA utile all'identificazione genetica.

2.2 SALIVA

La saliva è una fonte biologica spesso associata a reperti quali mozziconi di sigaretta, bicchieri, bottiglie, francobolli e mascherine. Essa contiene cellule epiteliali provenienti dal cavo orale, dalle quali è possibile estrarre DNA nucleare. Dal punto di vista forense assume particolare importanza nei casi di aggressione sessuale, morsi o manipolazione di oggetti. Tuttavia, la quantità di DNA recuperabile può variare considerevolmente in funzione dell'individuo donatore, della superficie interessata e delle condizioni ambientali. L'identificazione preliminare della saliva può essere effettuata tramite l'ausilio di metodiche enzimatiche che si basano sull'analisi dell'amilasi salivare, sebbene tali metodiche non siano sempre completamente specifiche (3).

2.3 LIQUIDO SEMINALE

Il liquido seminale rappresenta una delle matrici biologiche più rilevanti nelle indagini relative ai reati sessuali. Gli spermatozoi contengono elevate quantità di DNA nucleare maschile e consentono generalmente l'ottenimento di profili genetici completi. L'analisi forense del liquido seminale può risultare complessa nei campioni misti soprattutto in presenza di DNA femminile predominante. Per tale motivo vengono frequentemente utilizzate tecniche di estrazione differenziale, finalizzate alla separazione della componente spermatica da quella epiteliale femminile. Anche in questo caso, fattori quali lavaggi, degradazione ambientale e tempo trascorso dall'evento possono influenzare significativamente la qualità del materiale genetico recuperato (4).

2.4 CELLULE EPITELIALI E TOUCH DNA

Negli ultimi anni ha assunto crescente rilevanza il cosiddetto *touch DNA*, ovvero il DNA rilasciato mediante il semplice contatto cutaneo con una superficie. Questo tipo di traccia biologica è ricavata principalmente da cellule epiteliali desquamate che vengono trasferite durante la manipolazione di oggetti. Le analisi del *touch DNA* hanno ampliato notevolmente le capacità investigative della genetica forense, consentendo il recupero di profili genetici da diversi oggetti e superfici, tra cui armi, telefoni cellulari, tastiere, volanti, maniglie, bossoli e indumenti.

Nonostante tutto questo, l'analisi del *touch DNA* presenta diverse criticità dal punto di vista analitico. Le quantità di DNA recuperabili risultano spesso estremamente ridotte e soggette a fenomeni di:

- allele drop-out[1]
- drop-in[2]
- contaminazione
- trasferimento secondario[3]
- profili genetici misti

Inoltre, la quantità di DNA rilasciata varia significativamente da individuo a individuo. Alcuni soggetti vengono definiti *"good shedders"* in quanto rilasciano elevate quantità di cellule epiteliali, al contrario di altri che hanno una minore tendenza al rilascio cellulare. Il bisogno di migliorare l'efficienza del recupero di tracce minime ha favorito lo sviluppo di nuove metodologie di campionamento, tra cui i tamponi microFLOQ *Direct Swabs,* progettati appunto per recuperare selettivamente ridotte quantità di materiale biologico (5).

---

[1] Fenomeno per cui uno o più alleli effettivamente presenti nel campione non vengono rilevati nel profilo genetico ottenuto, generalmente a causa della scarsa quantità o della degradazione del DNA e degli effetti stocastici durante l'amplificazione mediante PCR.

[2] Fenomeno caratterizzato dalla comparsa, nel profilo genetico, di un segnale allelico non attribuibile al DNA del campione analizzato. Può derivare dall'introduzione accidentale di DNA estraneo durante le procedure analitiche e risulta particolarmente problematico nell'interpretazione di profili ottenuti da quantità molto ridotte di materiale genetico.

[3] Trasferimento indiretto di materiale biologico da un individuo a una superficie o a un oggetto attraverso un intermediario, come un'altra persona o un altro oggetto, senza che si verifichi necessariamente un contatto diretto tra il donatore del DNA e la superficie analizzata.

2.5 LE IMPRONTE DIGITALI

Nel 1895 Galton pose le linee guida per i successivi sistemi di classificazione delle impronte digitali (compresa la classifica Gasti adottata in Italia), definendo che le impronte potevano essere classificate in quattro modelli fondamentali (adelta, mono-delta, bi-delta e composta; Figura 3) ed enunciando i tre principi fondamentali della dattiloscopia (6):

- Immutabilità: le impronte papillari non subiscono modificazioni morfologiche dalla vita intrauterina fino ai fenomeni degenerativi post-mortem;
- Variabilità: le impronte digitali sono sempre diverse l'una dall'altra, sia che provengano da due soggetti diversi, sia che provengano da dita diverse della medesima persona;
- Classificabilità: le impronte digitali sono classificabili perché sono costituite da tre fasci di linee riconducibili a quattro tipi di figure.

Sull'epidermide delle parti terminali degli arti si formano delle sporgenze che formano le creste papillari dai disegni caratteristici ed irripetibili. I dermatoglifi sono separati dai solchi e disegnano varie figure sulle superfici digitali (falangi delle dita), palmari (palmi delle mani) e plantari (piedi). Le creste sono formate dalle papille che sono delle prominenze di forma conica poste sullo strato superficiale del derma (7).

Le dita delle mani, i palmi e le piante dei piedi, quando entrano in contatto con una superficie lasciano l'impronta delle creste papillari che sono sempre umide per la presenza di sudore e sebo, oppure per via dello sporco proveniente da altri materiali. L'impronta deposta dalle creste papillari è costituita da un complesso insieme di secrezioni naturali e materiale estraneo derivante dall'ambiente esterno.

Le impronte digitali sono "disegni" costituiti dall'alternanza di solchi e creste sui nostri polpastrelli. Ogni individuo presenta delle impronte digitali uniche, ed è proprio per questa unicità che queste risultano essere una seconda carta d'identità. Possono essere alterate definitivamente attraverso operazioni chirurgiche o dopo lesioni profonde. Oggi, attraverso la comparazione tra le tracce papillari rilevate sulla scena del crimine e le impronte di riferimento acquisite da indagati o sospettati, l'analisi dattiloscopica può contribuire all'identificazione del soggetto che ha depositato una determinata impronta (8).

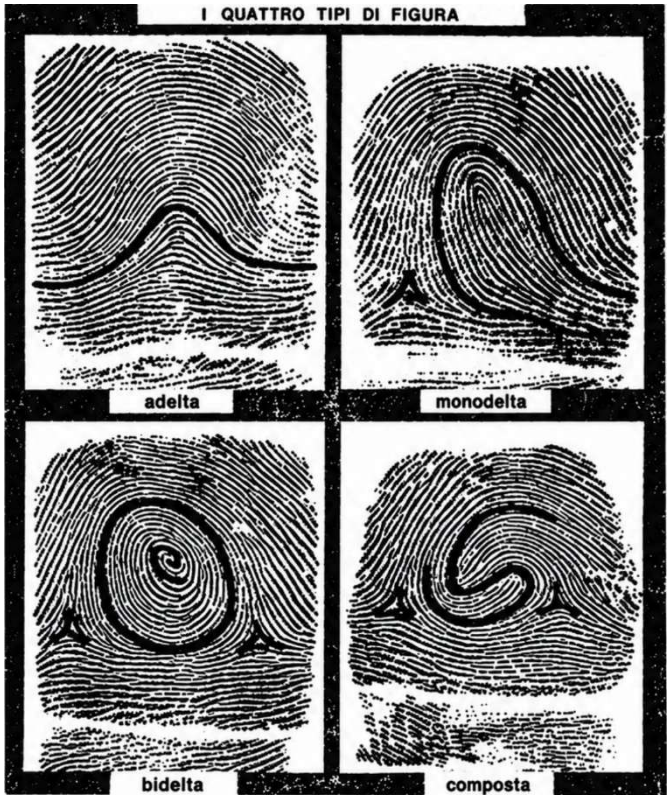
A seconda delle modalità tattili o di pressione con le quali sono state lasciate e a seconda del substrato su cui sono state deposte, le impronte possono essere (9):

- Bidimensionali o tridimensionali (calco): le impronte sono dette tridimensionali quando vengono generate per contatto con una sostanza malleabile (mastice, cera, pittura fresca, cemento fresco, fango ecc..). Questo tipo di impronte vanno a riprodurre con molta precisione l'oggetto che le ha impresse a differenza di quelle bidimensionali per le quali c'è uno schiacciamento della zona centrale.
- Latenti: quando non risultano visibili a occhio nudo, e richiedono l'esaltazione tramite l'utilizzo di trattamento chimico o fisico.
- Negative o positive: vengono definite negative o per asportazione quando durante la loro deposizione vanno ad asportare del materiale dalla superficie (polvere, cenere, sangue)

risultando solitamente con le creste invertite. Sono definite positive o per sovrapposizione le impronte che presentano le creste contaminate da sangue, inchiostro, vernice o altre sostanze.

Figura 3: Disegni papillari e impronte digitali





3. LE IMPRONTE DI SANGUE

Il sangue è un tessuto fluido che svolge le funzioni di trasporto di sostanze utili attraverso la rete dei vasi sanguigni e di mantenimento della temperatura corporea. I prodotti che vengono trasportati sono: ossigeno, ormoni e nutrienti necessari ai vari tessuti corporei, nonché prodotti di scarto (10).

Il sangue è costituito da plasma, che è la parte acquosa che contiene una mistura di proteine, amminoacidi, sali ed altri componenti chimici. Una delle proteine del sangue è l'emoglobina, responsabile del trasporto di ossigeno ed anidride carbonica, nonché del tipico colore rosso del sangue. In ogni microlitro di sangue si trovano circa cinque milioni di globuli rossi (eritrociti), 6000 globuli bianchi (leucociti) e 250.000 piastrine (trombociti) (11).

Il trasporto dell'ossigeno e dell'anidride carbonica è effettuato grazie agli eritrociti, i quali rendono possibili gli scambi gassosi. I leucociti sono deputati alla difesa da possibili agenti *non self*, mentre le piastrine sono importanti per la coagulazione del sangue e la formazione del tappo piastrinico nei casi di ferite con sanguinamento.

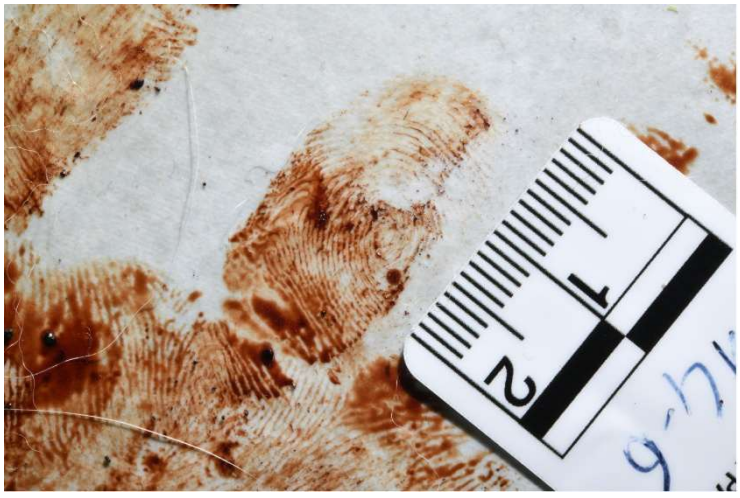
Quando il sangue si secca, una buona parte delle componenti cellulari in esso contenute si degrada completamente causando il riversamento del contenuto cellulare al di fuori delle membrane cellulari; amminoacidi e proteine come l'emoglobina che sono presenti nel sangue, possono essere i bersagli dei coloranti per il sangue usati in ambito forense per rendere visibili eventuali tracce latenti

Le superfici su cui possono essere impresse sono classificate come: porose, semi-porose e non porose. Le superfici porose possono assorbire il sangue mentre sulle superfici non porose il deposito di sangue rimane sulla superficie.

È di fondamentale importanza riconoscere il tipo di superficie sulla quale è presente l'impronta di sangue prima di valutare quale sia il trattamento più idoneo per la corretta esaltazione chimica. Le impronte di sangue possono essere suddivise in diverse categorie (11):

1) Vera impronta di sangue: un'impronta che risulta visibile quando i polpastrelli delle dita, precedentemente contaminati da materiale ematico, entrano in contatto con un supporto pulito

Figura 4: Una vera impronta di sangue



2) Impronta di sangue latente: una vera impronta di sangue che non è visibile a occhio nudo che può divenire visibile solamente a seguito di trattamento chimico.

Figura 5: Impronte trattate con reagenti chimici



3) Falsa impronta di sangue: un'impronta visibile derivata dall'interazione tra sangue e impronta latente precedentemente depositata.

Figura 6: Falsa impronta di sangue



4) Impronta di sangue negativa: un'impronta che, solitamente, si forma quando durante la sua deposizione asporta il sangue presente sulla superficie di supporto. Questo tipo di impronta presenta le creste invertite.

Figura 7: Impronta negativa



La procedura della rilevazione delle impronte sulla scena del crimine si basa inizialmente sull'utilizzo di tecniche ottiche di esaltazione seguite eventualmente dall'utilizzo di polveri dattiloscopiche o tecniche di esaltazione chimica/fisica.

Le impronte digitali latenti possono essere evidenziate mediante diverse tecniche chimiche, tra cui il trattamento con cianoacrilato, DFO e ninidrina. Per la rilevazione e l'esaltazione delle impronte digitali contenenti materiale ematico possono invece essere impiegati reagenti specifici, come il Leuco Crystal Violet (LCV) e l'Amido Black (AB).

La fumigazione con cianoacrilato è una tecnica comunemente impiegata per l'esaltazione delle impronte digitali latenti su superfici non porose. Tuttavia, nel caso di impronte digitali contenenti sangue, tale trattamento potrebbe compromettere la qualità dei dettagli dattiloscopici, poiché la polimerizzazione del cianoacrilato può determinare la formazione di uno strato di polimero sul deposito ematico (12).

Alcuni reagenti chimici impiegati per l'esaltazione delle impronte digitali possono influenzare negativamente il successivo recupero e l'analisi del DNA. Per questo motivo, quando possibile, è consigliabile effettuare un campionamento preventivo del materiale biologico prima di procedere con

i trattamenti chimici (13). È importante sottolineare, però, che l'impiego di tali reagenti non preclude necessariamente la possibilità di ottenere profili genetici, come dimostrato da studi che hanno consentito il recupero di DNA da impronte ematiche sottoposte a trattamenti di esaltazione chimica (14).

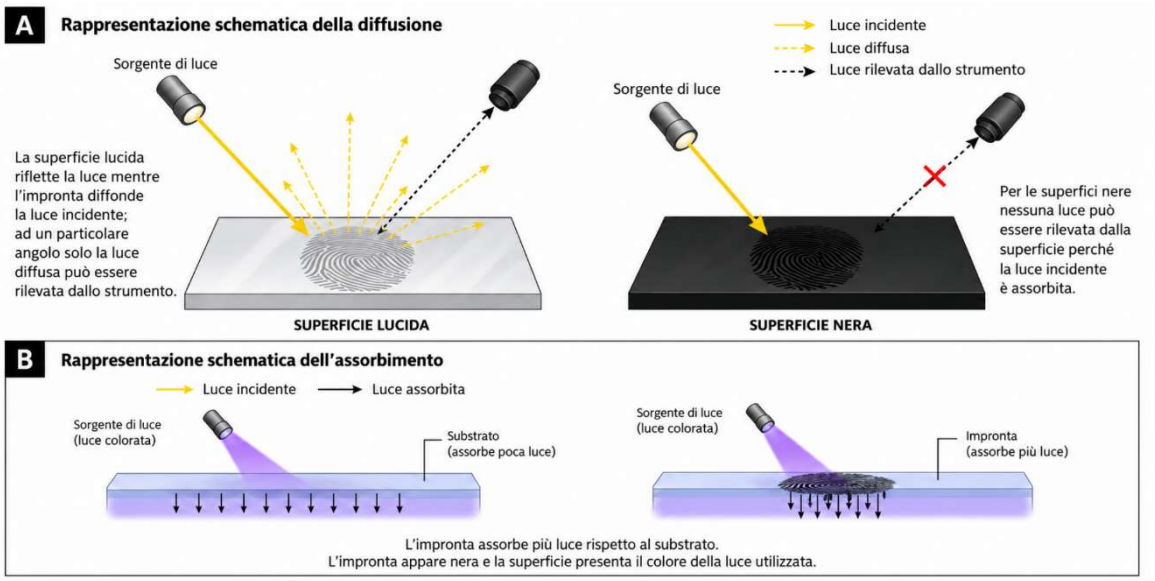
3.1 TECNICHE OTTICHE DI RIVELAZIONE

Le impronte di sangue scarsamente visibili e le impronte ottenute da sangue diluito nella maggior parte dei casi richiedono dei miglioramenti per essere rese visibili.

Sulle superfici non porose, scure o lucide, si possono sfruttare tecniche ottiche di riflessione diffusa sfruttando l'angolo incidente della luce, che permette di evidenziare il contrasto tra l'impronta e la superficie.

Per questa tecnica, la superficie del reperto viene illuminata con radiazione ultravioletta a 254 nm. La radiazione UV riflessa dalla superficie e dal deposito papillare viene rilevata mediante un sistema ottico dotato di filtri appropriati e resa visualizzabile attraverso un dispositivo di acquisizione delle immagini. Questo principio è alla base della tecnica RUVIS (Reflected Ultraviolet Imaging System) (15).

Figura 8: Schema della diffusione



Si può utilizzare anche una lunghezza d'onda di 415 nm perché ben assorbita dal sangue e la tecnica di riflessione diffusa cattura la luce riflessa dall'impronta. La riflessione dal substrato viene evitata dallo strumento di cattura dell'immagine in quanto la luce incidente all'angolo selezionato, su superfici lucide dovrebbe riflettere la luce via dalla fotocamera o una superficie scura potrebbe assorbire la luce anziché rifletterla.

Uno strumento in grado di sfruttare questo diverso fenomeno di riflessione è l'episcopio coassiale, una fonte di luce largamente utilizzata nelle investigazioni scientifiche. La luce emessa dalla lampada

"polilight" è riflessa da uno specchio semitrasparente così la luce viene deviata su un piano perpendicolare alla superficie. Il deposito delle creste papillari diffonde la luce incidente mentre la superficie dello sfondo riflette la luce in una direzione che è trasmessa allo specchio nella fotocamera, in questo modo le creste si presentano in nero e lo sfondo illuminato (16).

3.2 TRATTAMENTI CHIMICI DI ESALTAZIONE

Quando le tecniche di ispezione ottica non sono sufficienti per la visualizzazione delle impronte di sangue vengono sfruttati i trattamenti di esaltazione chimica, con lo scopo di migliorare la definizione delle impronte.

Questo tipo di trattamenti nello specifico non evidenziano le "impronte latenti" bensì le componenti proteiche che si riscontrano nel sangue (17).

Il sangue prima del trattamento deve essere adeguatamente "fissato" attraverso il procedimento di denaturazione delle proteine in esso contenute; la struttura delle proteine viene alterata e diventano insolubili, e di conseguenza riescono ad aderire alla superficie su cui si trovano. In questo modo le proteine solubili contenute nel sangue non vengono disciolte nella soluzione colorante durante il processo di colorazione. Quando si utilizza una soluzione acquosa di colorante con acqua/etanolo/acido acetico (WEAA)[4] è inizialmente applicata una soluzione acquosa al 2% di acido 5-solfosalicilico (SSA) (18); se viene utilizzata una soluzione contenente metanolo, quest'ultimo può svolgere il ruolo di fissativo. La denaturazione del sangue si verifica anche tramite il calore o con il passare del tempo. Successivamente all'azione del fissativo SSA, la traccia deve subire il processo di risciacquo con H2O per rimuovere la soluzione di fissaggio, al contrario quando viene utilizzato il metanolo la fase di risciacquo non viene effettuata in quanto quest'ultimo evapora con il passare del tempo. Il metanolo può causare delle interferenze con la raccolta dei campioni di DNA per via della sua evaporazione che determina un sottile strato sull'impronta o in alcuni casi anche la completa distruzione dell'impronta. Qualora lo Swab del DNA non sia efficace si può procedere a effettuare uno scraping sulla traccia ma può essere dannoso per la salute dell'operatore[5]. Nonostante questa serie di problematiche legate all'utilizzo del metanolo, le impronte di sangue trattate con esso hanno una colorazione più intensa, dei margini più definiti e uno sviluppo migliore rispetto ai trattamenti con formulazione WEAA (19).

Dopo il fissaggio, bisogna applicare la soluzione colorante per cercare di aumentare il contrasto tra la traccia di sangue ed il substrato. L'eccesso di colorante nello sfondo può essere lavato via nella successiva fase di lavaggio, alcuni coloranti non hanno bisogno della procedura di lavaggio in quanto non colorano eccessivamente lo sfondo (Leuco malachite verde), mentre altri possono richiedere anche passaggi multipli di lavaggio (Amido Black) (20).

[4] WEAA (Water, Ethanol, e Acetic Acid) è un sistema solvente raccomandato dai manuali forensi per sciogliere e applicare i coloranti proteici; è solitamente preparato con un rapporto 14:5:1 tra Acqua, Etanolo, e Acido Acetico

[5] Lo scraping può essere dannoso per la salute dell'operatore principalmente per tre motivi: rischio di inalazione di aerosol tossici, tossicità da contatto o assorbimento cutaneo e il rischio di esposizione ad agenti biologici patogeni se si lavora su impronte ematiche o biologiche

Le fasi di fissaggio, di colorazione e del lavaggio possono essere effettuate attraverso immersione, versando direttamente il prodotto o attraverso l'utilizzo di uno spray. Quando si tratta di una traccia riscontrata su un pavimento, spruzzare il prodotto risulta il metodo più indicato.

I composti chimici utilizzati per evidenziare ed esaltare le impronte di sangue possono essere suddivisi in tre classi di reagenti:

1) Composti amino-reattivi

2) Coloranti per le proteine

3) Composti eme-reattivi

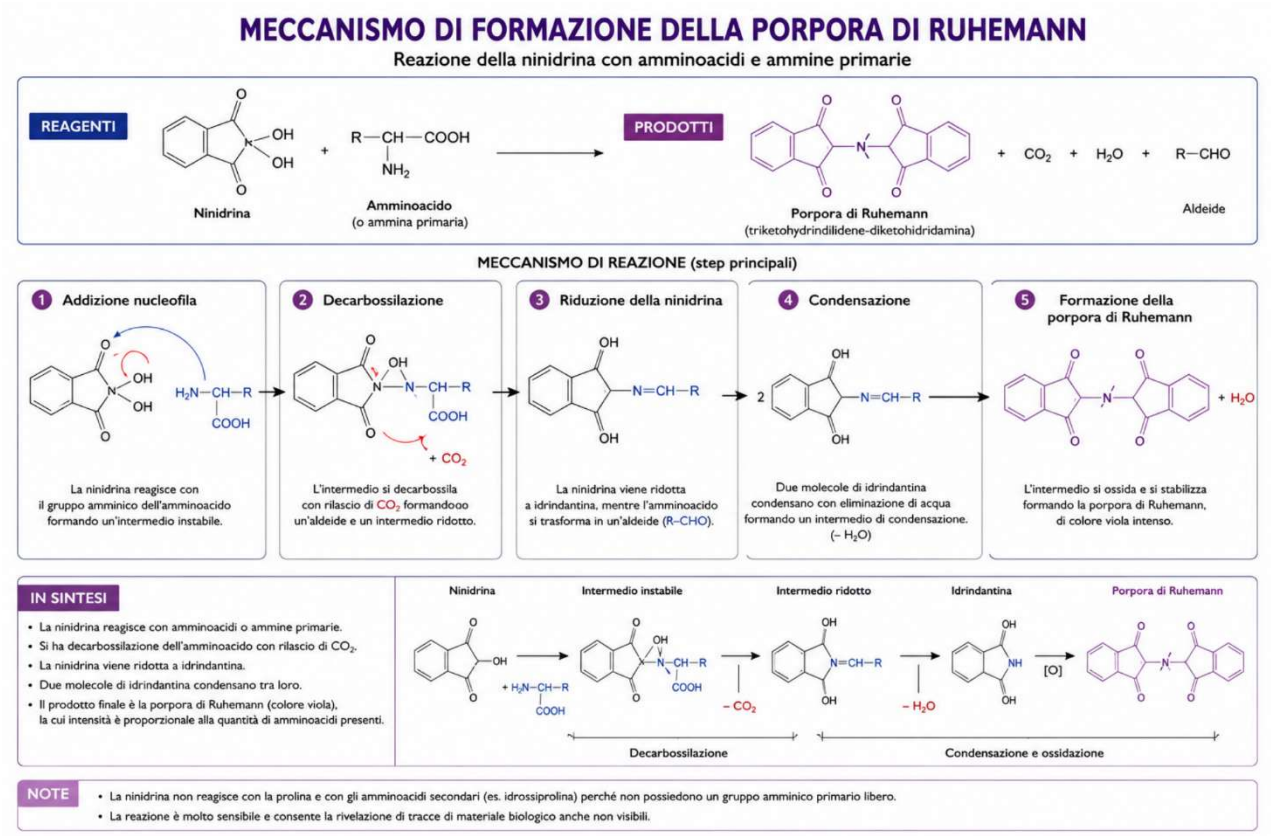
I composti eme-reattivi rappresentano il composto chimico più specifico per l'indicazione della presenza di sangue anche quando questo non è visibile a occhio nudo e non presenta eccesso di colorante sullo sfondo sia quando si tratta di superfici porose e substrati proteinici. I coloranti per le proteine hanno una maggiore sensibilità rispetto ai composti eme-reattivi in quanto sfruttano una quantità maggiore di materiale per la loro reazione (21). Per tracce di sangue molto datate l'emoglobina è più stabile rispetto alle altre proteine (22). Infine, i composti amino-reattivi possono rilevare sia le impronte latenti sia le impronte contaminate da sangue.

3.2.1 COMPOSTI AMINO-REATTIVI

Gli amminoacidi rappresentano la classe maggioritaria tra i composti chimici che possono essere trovati nelle impronte latenti non di sangue. Sono ampiamente sfruttati per la rilevazione di impronte latenti sulle superfici porose. Si sfruttano composti chimici che dopo la reazione con gli amminoacidi formano delle molecole visibili ad occhio nudo o attraverso fluorescenza. Uno dei reagenti più utilizzati è la ninidrina.

La ninidrina (1,2,3-Indantrione mono idratato o 2,2-Diidrossi- 1,3-indandione) è un composto che reagisce con gli amminoacidi primari formando un prodotto di colore rosso-porpora, quello in cui si evidenziano le impronte su carta proprio perché uniforme è la presenza degli amminoacidi in un deposito papillare. Il reperto è immerso in una soluzione organica (metanolo o etanolo, acetato di etile, acido acetico glaciale e HFE-7100) di ninidrina e poi riscaldato in una camera climatica (23).

Figura 9: Porpora di Ruhemann

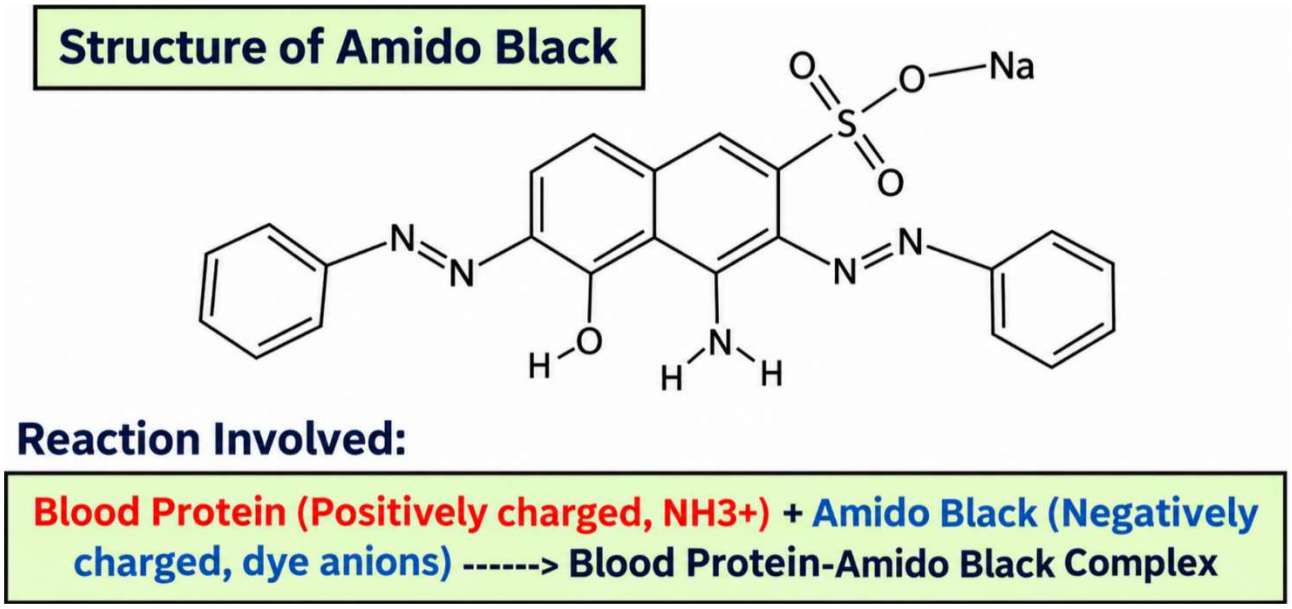


A causa della grande quantità di proteine all'interno del sangue, i reagenti per gli amminoacidi possono esaltare le impronte nel sangue. Questi composti reagiscono sia con gli aminoacidi che si trovano liberi nel sangue, sia con i gruppi amino terminali delle proteine (23).

3.2.2 COLORANTI PER LE PROTEINE

La maggior parte dei coloranti proteici contengono dei gruppi solfonati che sono anionici (carichi negativamente) e vengono attratti dai gruppi cationici delle proteine nel sangue in moderate condizioni acide (24). Questo tipo di condizione determina la comparsa di gruppi cationici nelle proteine mentre un elevato numero di gruppi solfonati resta deprotonato. Le formulazioni chimiche utilizzate contengono spesso acidi (SSA, acido acetico o acido citrico).

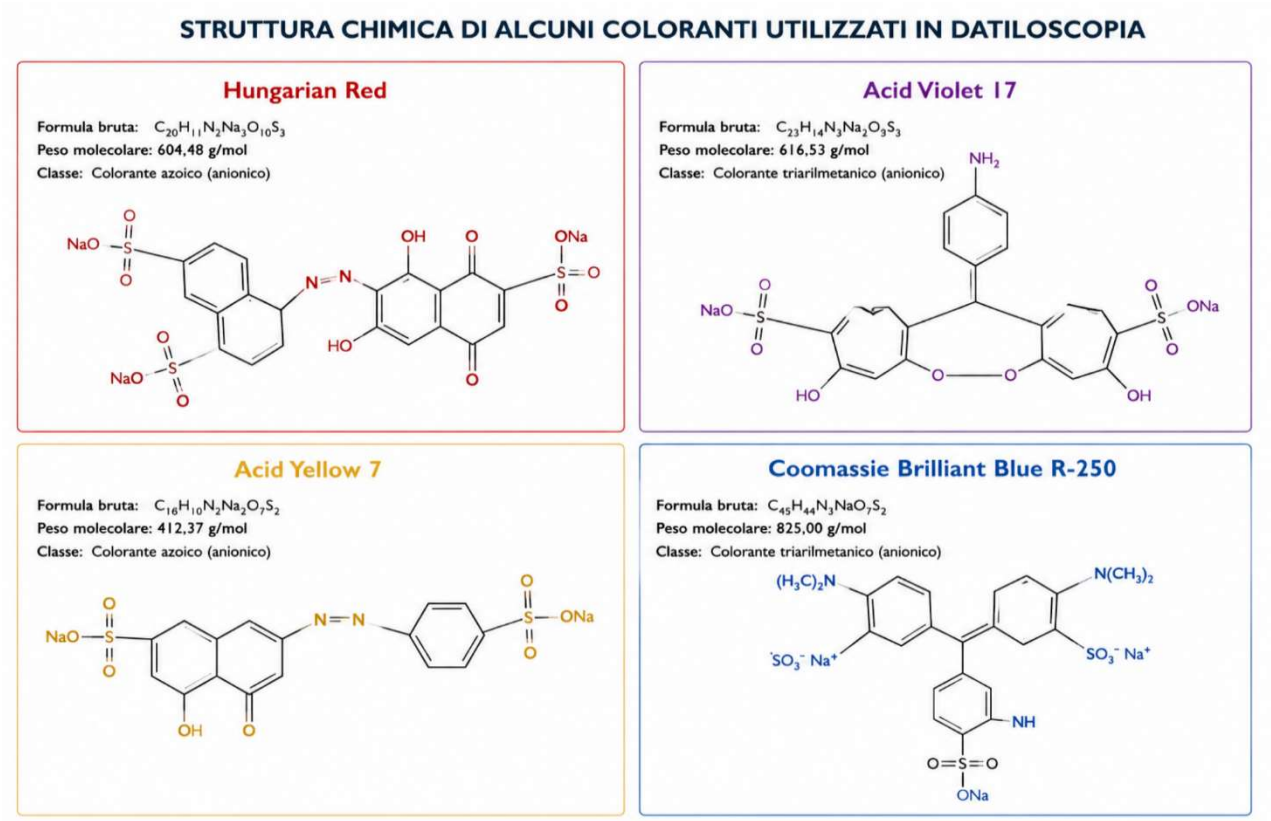
Figura 10: Struttura dell'Amido Black



Tra i coloranti appartenenti a queste classi vi sono: L'Amido Black, l'Acid Violet 17, l'Acid Yellow 7, il Blu di Coomassiee l'Hungarian Red.

Hungarian Red ed Acid Yellow sono dei coloranti fluorescenti mentre gli altri sono visibili senza fluorescenza. La scelta del colorante dipende dal substrato preso in esame, in modo da fornire il miglior contrasto possibile per la visualizzazione della traccia. L'Amido Black, ad esempio, esalta al meglio le impronte quando è utilizzato su substrati chiari. Al contrario su substrati scuri l'Acid Yellow ha una resa qualitativa maggiore. Ognuno di questi coloranti è idoneo per il trattamento di superfici non porose; al contrario per substrati porosi l'utilizzo dei coloranti a base WEAA è sconsigliabile in quanto si forma una macchia ed il disegno papillare non è apprezzabile (25).

Figura 11: Alcuni reagenti dattiloscopici



L'Amido Black ha una buona resa sulla maggior parte delle superfici per via del suo colore scuro, ma non è indicato per le superfici a sfondo nero. Il Blue di Coomassie può essere applicato dopo l'uso dell'Amido Black ma il contrario non è possibile (17).

L'Acid Yellow 7 è sfruttato su substrati più scuri e può essere visualizzato in fluorescenza. Ha un'eccitazione massima a 460 nm ed emette a 535 nm (26); con eccitazione tra 400 nm e 500 nm in accoppiamento ad un filtro si può visualizzare l'impronta colorata in fluorescenza.

3.2.3 COMPOSTI EME-REATTIVI

Il gruppo eme fa parte dell'emoglobina, proteina contenuta all'interno dei globuli rossi, nella quale il sito attivo contiene un atomo di ferro, coordinato in un macro-ciclo della porfirina.

Figura 12: Struttura dell'eme

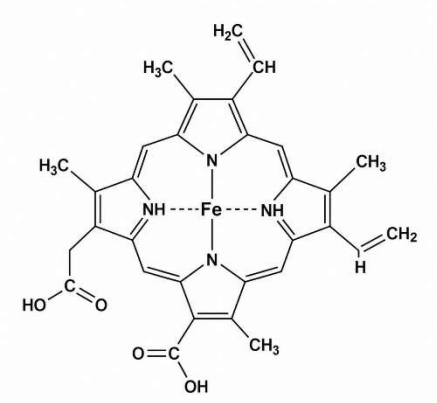
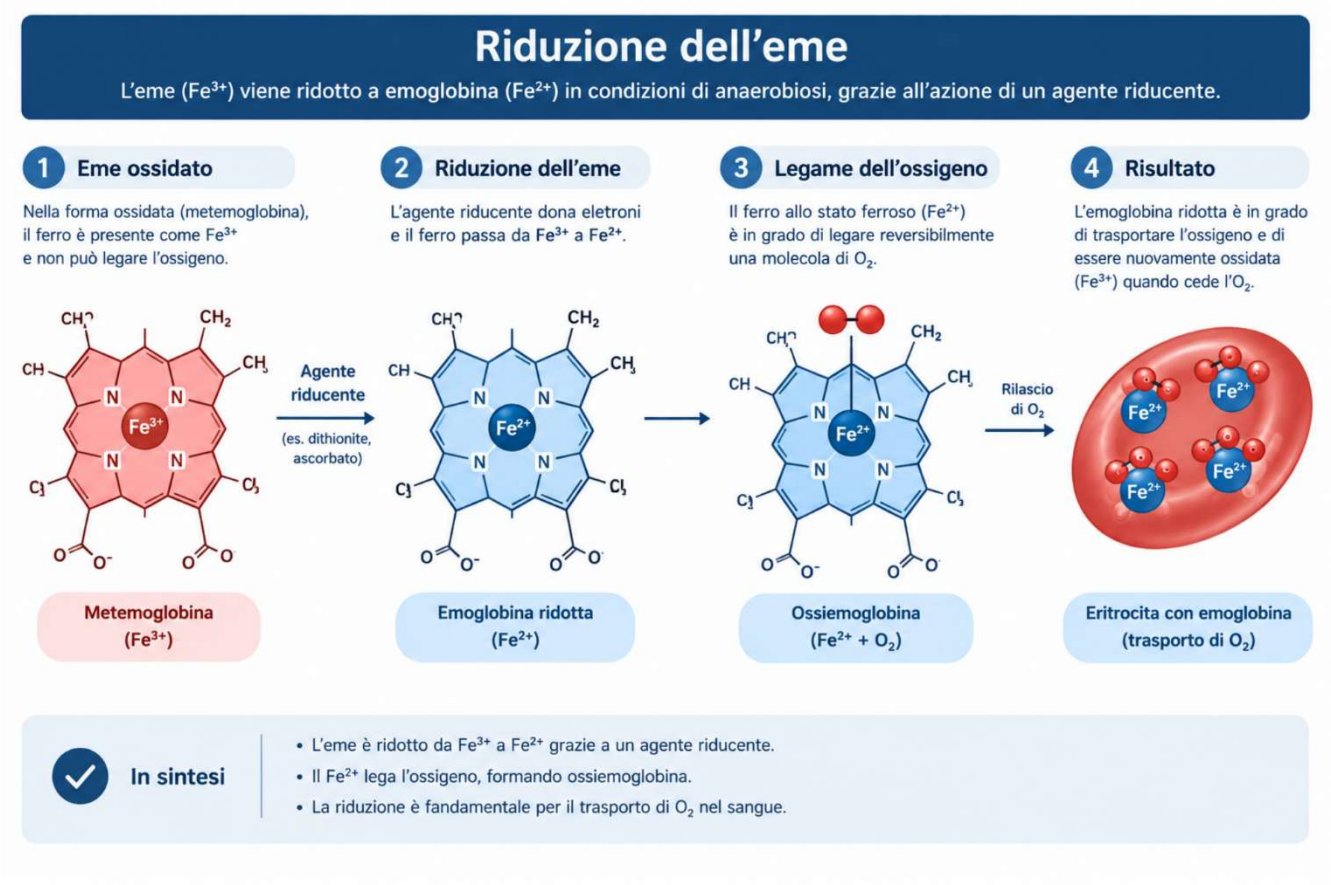


Figura 13: Ciclo di riduzione catalitica in cui è coinvolto il gruppo eme



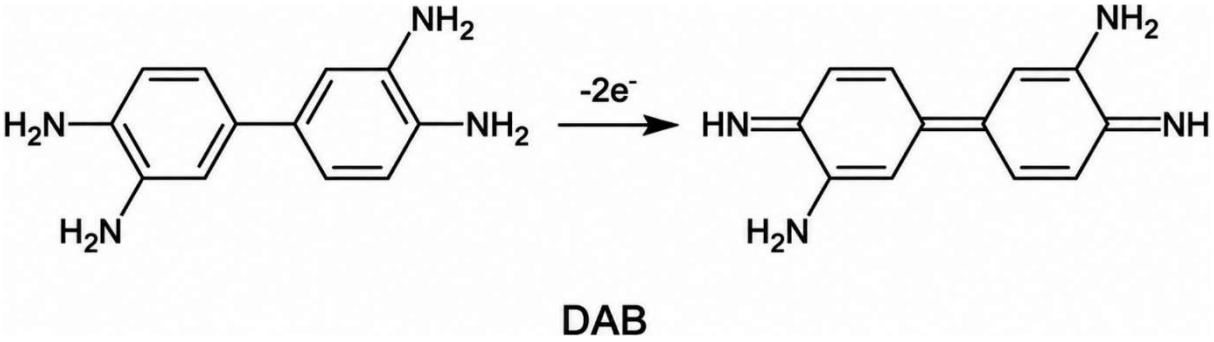
Grazie alla capacità dell'eme di catalizzare le reazioni di ossidazione è possibile convertire i reagenti incolori in composti colorati o permettere una reazione che determini il fenomeno della luminescenza (27). Il perossido di idrogeno è frequentemente sfruttato per catalizzare questo tipo di reazione.

La reazione chimica ha lo scopo di essere utilizzata come test presuntivo per il sangue, in seguito è comunque necessario confermare la presenza di sangue umano. Questi metodi rilevano anche l'eme nel sangue animale, nelle piante e nelle cellule microbiche (28). L'esaltazione del sangue ed i test presuntivi coinvolgono entrambi un cambio di colore in presenza del gruppo eme ed alcuni reagenti possono essere sfruttati per entrambi gli scopi. La variazione di colore, l'intensità, la compatibilità in base alla superficie e la capacità di rilevare i minimi dettagli sono dei punti fondamentali per l'esaltazione delle impronte di sangue. I reagenti maggiormente utilizzati sono le diaminobenzidine (DAB) ed il Leuco Crystal Violet (LCV).

DIAMINOBENZIDINA: La 3,3'- diaminobenzidina nella sua forma iniziale si presenta incolore e solamente quando entra in contatto con il sangue e il perossido di idrogeno (H2O2), l'attività

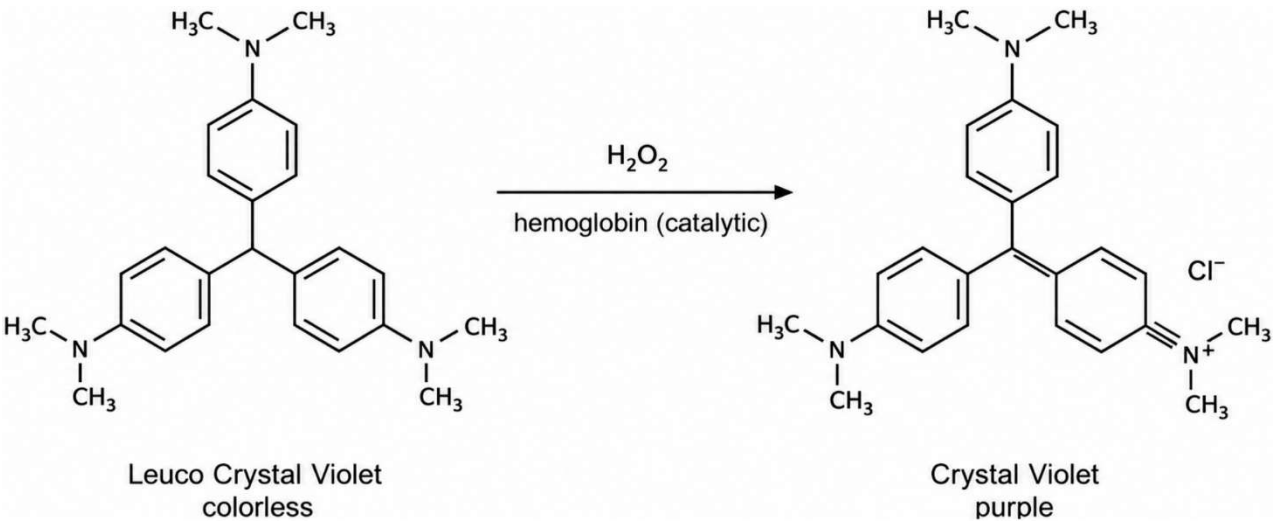
perossidasica dell'emoglobina catalizza l'ossidazione della DAB, formando un prodotto insolubile di colore bruno che precipita in corrispondenza delle aree contenenti sangue. Questo permette una migliore visualizzazione delle creste papillari dell'impronta. Questo tipo di colorante è carcerogeno, di conseguenza è sconsigliato utilizzarlo tramite spray; a causa della sua tossicità è consigliabile rimuovere l'eccesso dopo lo sviluppo del prodotto colorato (29).

Figura 14: In presenza di sangue il DAB incolore si ossida e precipita come particolato marrone



LEUCO CRYSTAL VIOLET: Il Leuco Crystal Violet (LCV) è la forma ridotta e incolore del Crystal Violet, un colorante appartenente alla classe dei triarilmetani. Il principio di funzionamento del LCV è basato su una reazione di ossidazione che coinvolge il sangue e il perossido di idrogeno. LCV viene ossidato e convertito nella forma colorata di Crystal Violet, caratterizzato da una colorazione viola/violacea nelle aree contenenti sangue. La reazione è strettamente correlata all'attività perossidasica dell'emoglobina e in particolare del gruppo eme. Mostra una debole fluorescenza a 695 nm quando illuminato con lunghezza tra 400 e 600 nm. LCV può essere sfruttato sia su substrati porosi che non porosi. Può essere conservato dopo la sua preparazione per circa tre mesi in congelatore, rispetto al DAB la sua fase di preparazione è molto più semplice ed è meno rischioso per la salute dell'operatore (30).

Figura 15: Reazione di ossidazione del LCV in presenza di sangue



3.3 MIGLIORAMENTI POST TRATTAMENTO CHIMICO

Dopo i trattamenti chimici, alcuni metodi posso venire utilizzati per aumentare il contrasto o migliorare la qualità dell'impronta come, ad esempio, l'abbassamento della fluorescenza dello sfondo o la nitidezza dell'immagine fotografica (31).

Ovviamente l'aggiunta di ulteriori trattamenti chimici con lo stesso o con un altro prodotto possono esaltare ulteriormente il contrasto o in alcuni casi rilevare altre impronte; questo però può incrementare il rischio di sovra esposizione della traccia.

Quando si riscontra uno sfondo multicolorato o ha dei disegni che interferiscono con la visualizzazione dell'impronta, si può utilizzare una luce con una lunghezza d'onda vicina e alla stessa banda di assorbimento o emissione del colore dello sfondo (32).

Una tecnica "correttiva a due lunghezze d'onda" può essere sfruttata e due immagini saranno ottenute: una ad una lunghezza d'onda dove il colorante ha il massimo dell'assorbimento e un'altra in cui non ha assorbito. Lo sfondo sarà quindi digitalmente sottratto. Una metodica simile può essere sfruttata per i marcatori fluorescenti in cui la prima immagine è ottenuta alla lunghezza d'onda di emissione del colorante usando un filtro idoneo allo scopo.

Un ulteriore metodo approfitta di un adesivo dattiloscopico in gomma pura che permette di asportare l'impronta e quindi rimuovere il rumore di fondo del substrato. L'adesivo dattiloscopico consente di rimuovere l'impronta dalla maggior parte delle superfici e per via della loro elasticità impediscono la formazione di possibili bolle d'aria. Possono essere di diversi colori in modo da garantire un buon contrasto dell'impronta asportata.

3.4 IMPRONTE EMATICHE DIRETTE E INDIRETTE

La discriminazione tra un'impronta latente che viene successivamente contaminata dal sangue o una vera impronta di sangue rappresenta una delle problematiche maggiormente rilevanti per l'indagine e la ricostruzione della sequenza degli eventi. Alcuni esperti, che hanno cercato di rispondere a questa problematica, sostengono che un'impronta latente non possa essere esaltata da reagenti chimici per il sangue come l'Amido Black mentre altri dichiarano che un'impronta latente possa assumere l'aspetto di una vera impronta di sangue dopo la successiva contaminazione con quest'ultimo (33).

Un'impronta sebacea (ricca di grasso) se esposta a una colatura di sangue può assumere l'aspetto di una vera impronta di sangue ma con le creste che risultano invertite (le creste in bianco e i solchi colorati) per via delle componenti oleose presenti sull'impronta che determinano un allontanamento del sangue e la sua deposizione nei solchi (34).

Alcuni autori hanno condotto degli esperimenti nei confronti delle impronte sebacee, in cui sono state analizzate 216 impronte ematiche prendendo in considerazione quattro donatori e sei meccanismi di deposizione ovvero: *drip, blood pool, swipe, spatter, flow, immersion*. Le impronte latenti sono state contaminate dal sangue 24 ore dopo la loro deposizione e fotografate mediante fotocamera Canon EOS 6D Mark II DSLR con l'utilizzo di un obiettivo macro Canon EF 100mm.

Ogni impronta è stata valutata utilizzando il sistema CAST[6] (Centre for Applied Science and Technology)

I risultati del maccanismo di deposizione *Drip e Blood Pool* hanno dato risultati molto simili tra loro in quanto, soltanto due delle 36 impronte analizzate hanno dato un risultato visibilmente utile da un punto di vista dattiloscopico. L'analisi di quest'esperimento suggerisce che quando il sangue rimane immobile sul substrato è poco probabile che si venga a formare una falsa impronta di sangue ben definita. Il volume in eccesso rimane sotto forma di goccia o pozza grazie alle proprietà di coesione interna del sangue, nascondendo il dettaglio delle creste una volta che si è essiccato.

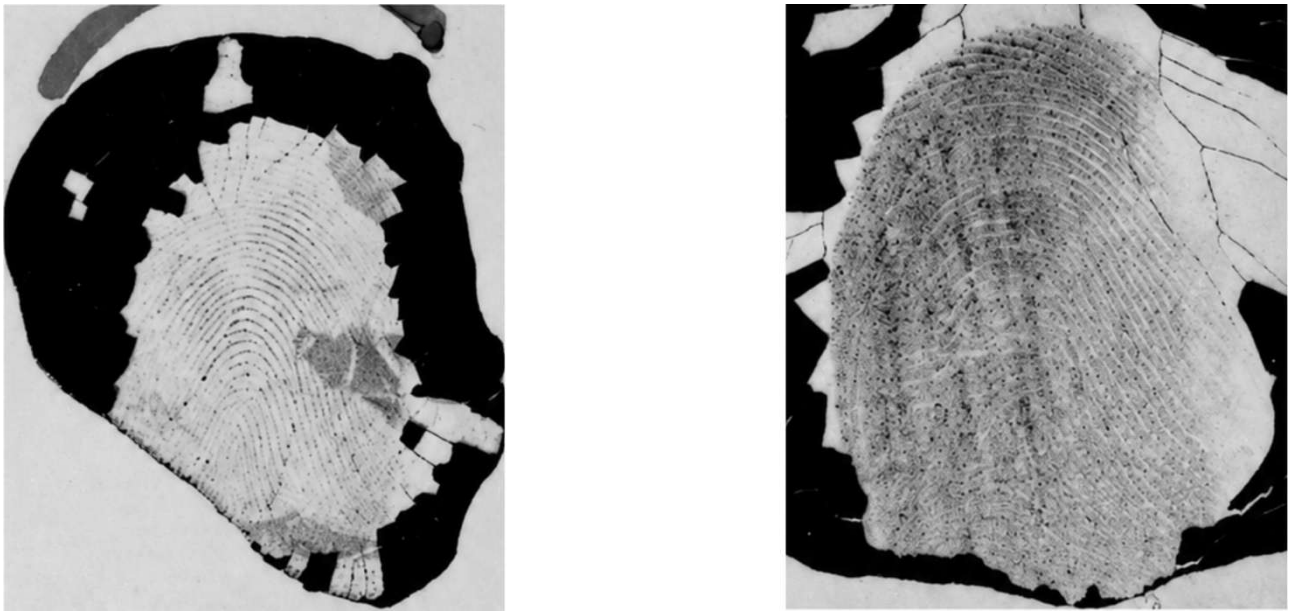
Figura 16: Blood pool



La situazione cambia quando il sangue che si era essiccato sopra l'impronta veniva successivamente rimosso dando come risultato delle false impronte di sangue. Questo risultato suggerisce che il sangue ha la capacità di interagire con il residuo dell'impronta sotto lo strato superficiale essiccato.

[6] Il CAST (Centre for Applied Science and Technology) è un sistema di classificazione delle qualità delle impronte papillari articolato su una scala da 0 a 4. I punteggi indicano la quantità di dettagli papillari nitidi osservabili: 0 = nessun dettaglio visibile; 1 = dettagli limitati o scarsamente definiti; 2 = dettagli nitidi inferiori a un terzo dell'impronta; 3 = dettagli nitidi compresi tra un terzo e due terzi dell'impronta; 4 = dettagli nitidi superiori a due terzi dell'impronta.

Figura 17: Blood pool altered



Quando il sangue veniva fatto scorrere sopra le impronte preesistenti, quest'ultimo rimaneva intrappolato a livello dei solchi a causa della repulsione che si era generata dalle componenti oleose presenti sul residuo dell'impronta

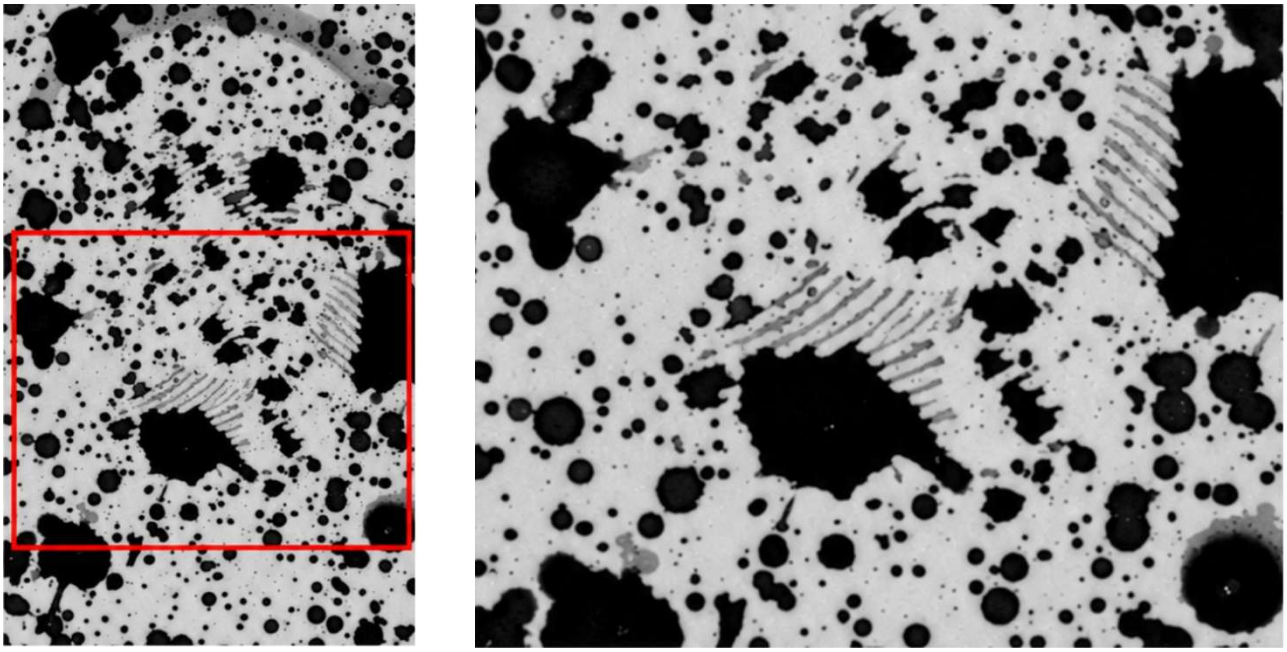
Figura 18: Swipe



Nel caso dello Spatter vi è stata un elevata frequenza di impronte equivalenti a CAST= 0. Il risultato è spiegabile se si considera la distribuzione casuale delle gocce oppure che il volume di sangue effettivamente entrato in contatto con l'impronta non fosse sufficiente per poterla rendere visibile.

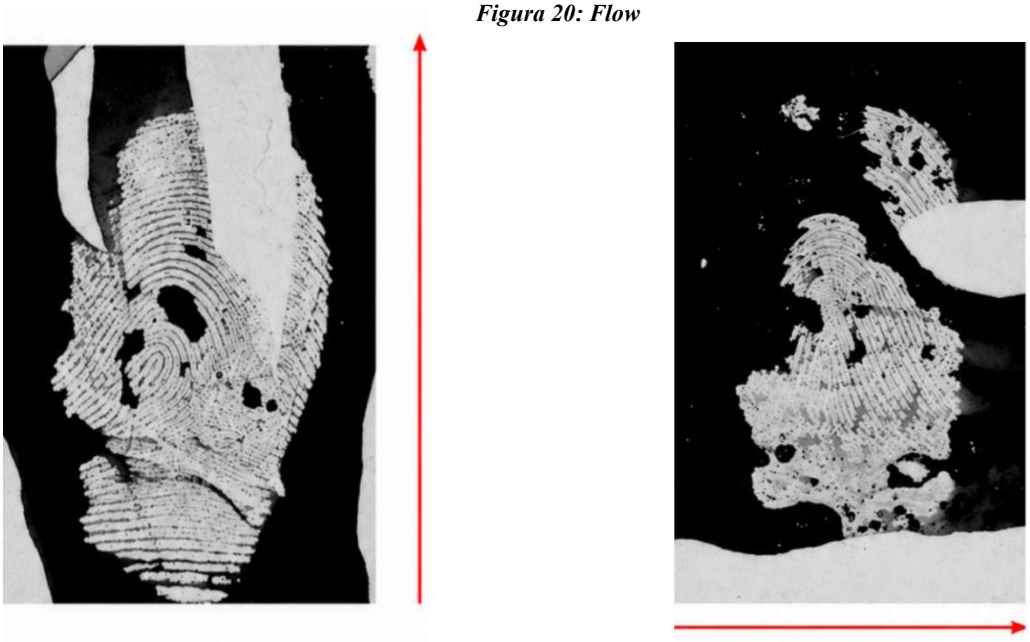
Solamente le gocce di grandi dimensioni tendevano ad accumularsi nei solchi producendo qualche dettaglio papillare.

Figura 19: Spatter



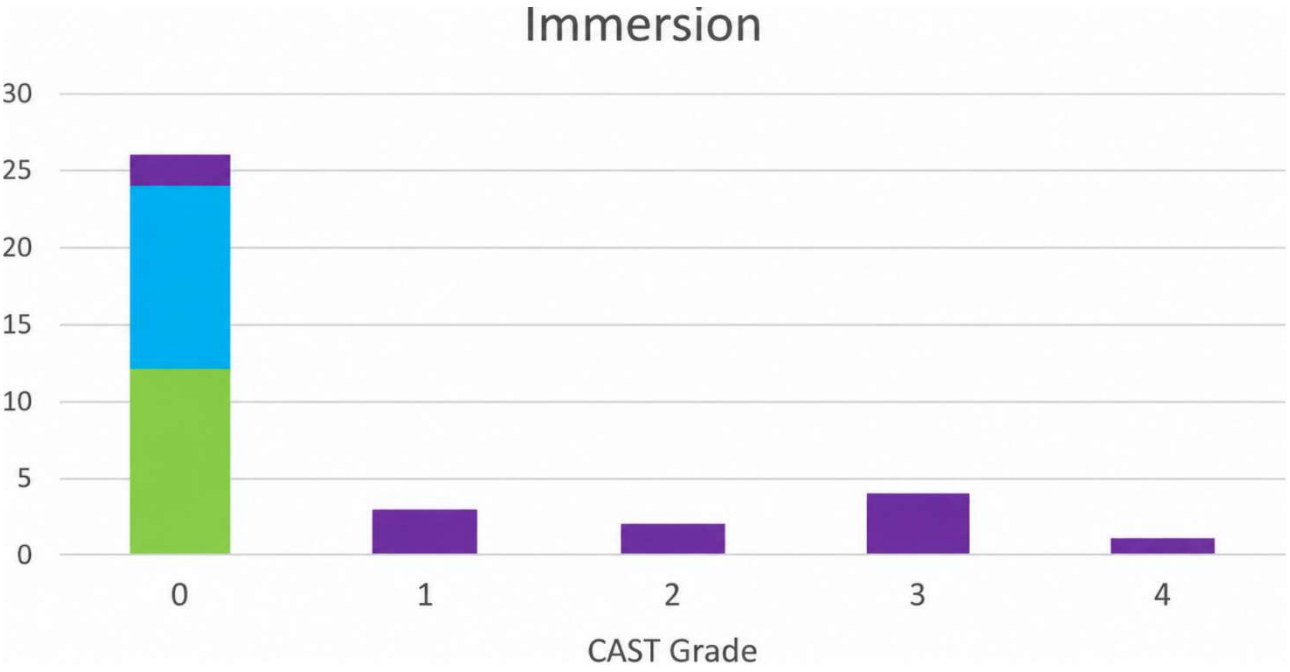
I risultati del Flow mostravano che il sangue si accumulava nei solchi dell'impronta dando dei buoni risultati dal punto di vista papillare. Gli autori concludono che la presenza di una componente sebacea sembra essere importante per la formazione delle false impronte di sangue

Figura 20: Flow



Delle 36 impronte immerse nel sangue soltanto dieci hanno dato riscontro a qualche dettaglio papillare. Questo risultato mette nuovamente in evidenza come le impronte ricche di componente sebacea producevano regolarmente alcuni dettagli delle creste.

Figura 21: Immersion



L'esito finale di questa serie di esperimenti suggerisce come le impronte sebacee, una volta contaminate dal sangue, possano dare origine a delle false impronte di sangue a causa delle componenti presenti sul residuo dell'impronta.

I meccanismi caratterizzati dal movimento del sangue Flow producono con una maggiore frequenza false impronte di sangue rispetto ai meccanismi in cui il sangue rimane fermo sulla superficie, dove va a ricoprire completamente creste e solchi nascondendo il dettaglio papillare.

Anche nello Spatter le gocce più grandi sembravano produrre un maggior numero di dettagli papillari rispetto alle gocce più piccole, dimostrando come anche il volume del sangue influenzi il processo di formazione delle false impronte di sangue (35).

4. VARIABILITÀ GENETICA, POLIMORFISMI E MARCATORI MOLECOLARI

Due individui presi a caso dalla popolazione, per il solo fatto di appartenere alla specie umana, condividono il 99,9% del loro DNA. Paradossalmente la variabilità che rende ogni individuo unico su miliardi di persone risiede nel solo 0,1% del genoma, ed è quindi all'interno di questa minuscola parte che vanno localizzati i marcatori d'elezione per l'identificazione personale (36).

La variabilità in genetica forense viene meglio definita dal concetto di polimorfismo: una porzione di DNA risulta polimorfica quando nella popolazione esistono almeno due forme alleliche, della quale la più rara è presente almeno nell'1% dei casi, differentemente si parla di variante allelica (37).

I polimorfismi vengono convenzionalmente suddivisi in due categorie:

- VNTRs: polimorfismi a eterogeneità di lunghezza, la variabilità risiede nel numero di volte in cui si ripete in tandem la sequenza oligonucleotidica. Si suddividono, sulla base del numero di nucleotidi che compongono l'unità ripetuta (UR), in minisatelliti, con UR compresa tra 8 e 100 bp, e Microsatelliti, con UR compresa tra 2 e 7 bp.
- SNPs: polimorfismi a singolo nucleotide, la variabilità risulta puntualmente limitata a una posizione (38).

Figura 22: Short tandem repeat

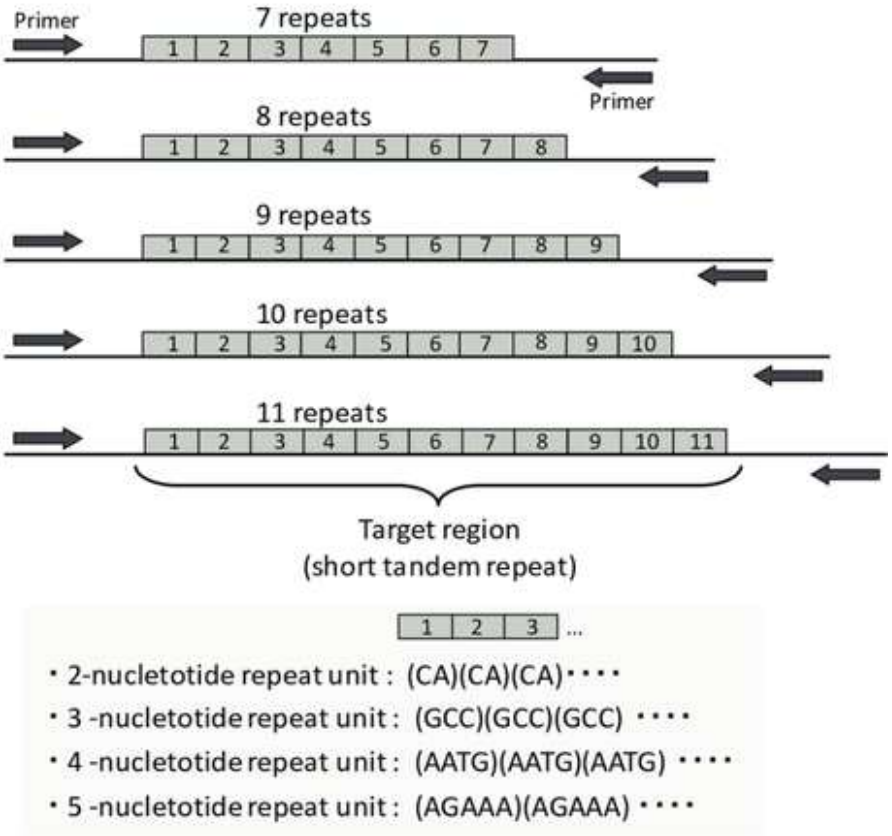
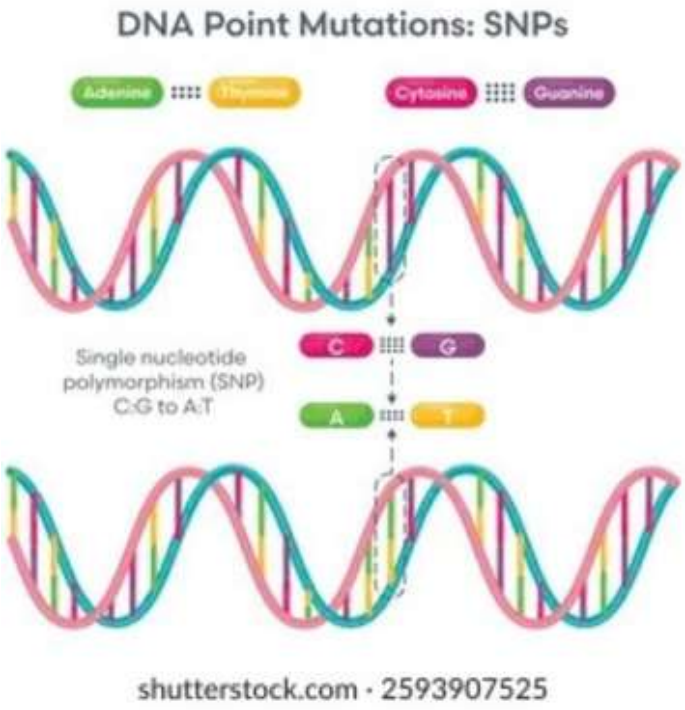


Figura 23: SNPs



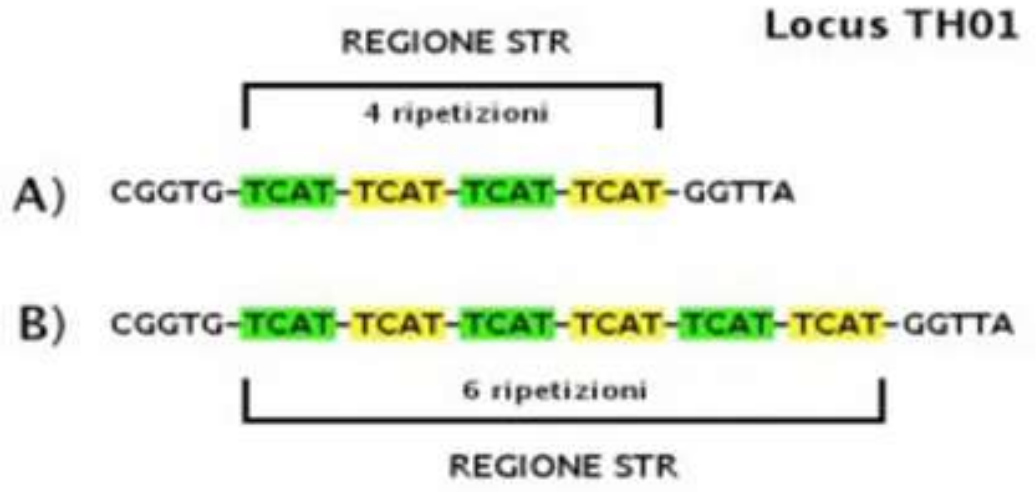
4.1 I POLIMORFISMI DI LUNGHEZZA STRs

Gli *Short Tandem Repeats* (STRs) appartengono al gruppo dei microsatelliti, sono cioè polimorfismi di lunghezza costituiti da piccole unità (da 2 a 7 paia di basi) ripetute in tandem un numero di volte variabile per ciascun allele (39).

La loro nomenclatura è costruita indicando, in modulo, le informazioni per la localizzazione sul DNA: il marcatore D16S539, ad esempio, si trova in una regione inter-genica del cromosoma 16, la "S" indica che il locus è in copia singola nel genoma e "539" è un progressivo codice identificativo che indica il 539° locus descritto sul cromosoma in oggetto (40).

Se il locus si trova in una regione genica gli viene assegnato il nome del gene, ad esempio quanto accade per il marcatore TH01, situato all'interno del gene tirosina idrossilasi, nell'introne 1. Nella figura 24 è riportato l'esempio di un marcatore STR schematizzato. È possibile osservare come la sequenza tetra nucleotidica "TCAT" sia ripetuta quattro volte nell'allele in alto e sei volte nell'allele in basso. Quest'individuo avrà quindi per il marcatore TH01 la sequenza allelica 4-6. Le sequenze "CGGTG" e "GGTTA" rappresentano le regioni fiancheggianti, identiche per i due alleli, utilizzate in questo caso come target per l'appaiamento dei primer di amplificazione.

Figura 24: Struttura STR



La scelta dei marcatori impiegati nell'analisi genetica forense è guidata principalmente da specifici requisiti di carattere analitico, ai quali si aggiunge la necessità di garantire che tali marcatori non consentano di ottenere informazioni sensibili relative all'individuo, come la predisposizione a determinate patologie o la presenza di condizioni ereditarie (41).

In questo contesto, i principali requisiti che rendono un marcatore particolarmente utile ai fini dell'identificazione individuale possono essere così sintetizzati:

- Elevato potere discriminativo, maggiore di 0,9, con eterozigosità osservata maggiore del 70%
- Diversa localizzazione cromosomica, per evitare qualsiasi possibilità di linkage
- Riproducibilità dei risultati in reazioni multiplex
- Ridotti fenomeni di stutter
- Lunghezza degli alleli compresa tra 90 e 500 bp
- Basso tasso di mutazione, circa 10^{-3} - 10^{-4} per locus per generazione

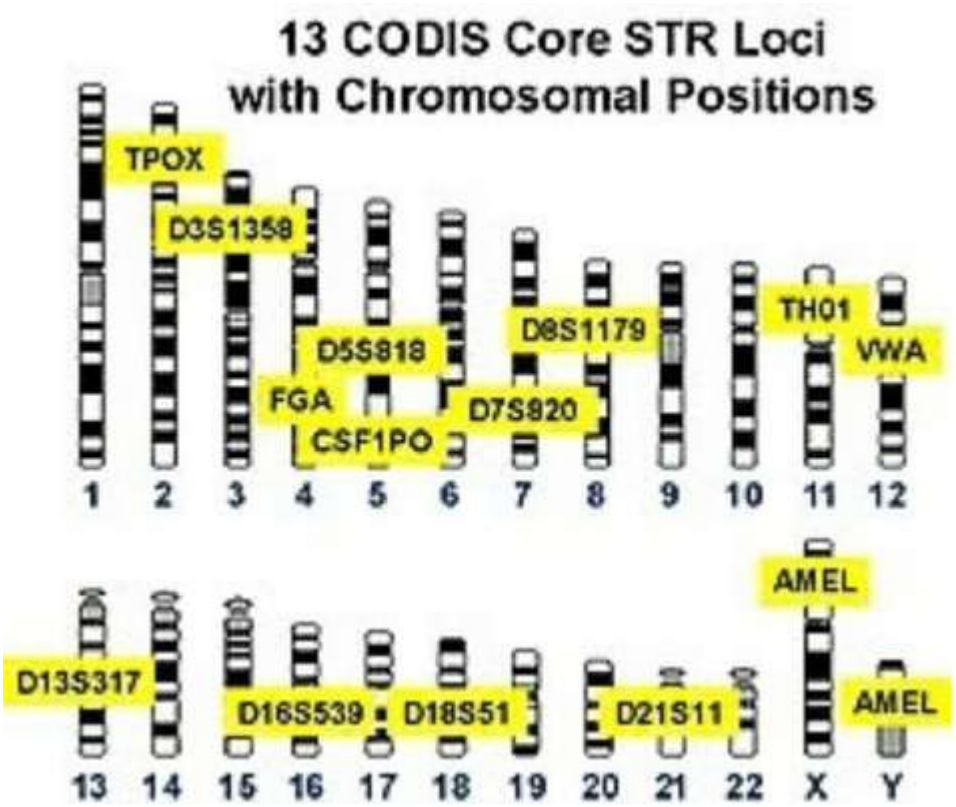
Considerata la capacità discriminante limitata di ciascun marcatore preso singolarmente, nessun singolo locus è generalmente in grado di garantire l'identificazione univoca di un individuo. Per incrementare il potere discriminatorio dell'analisi, vengono pertanto esaminati simultaneamente più loci mediante tecniche di PCR multiplex. La valutazione congiunta dei profili ottenuti dai diversi marcatori permette di raggiungere un livello di discriminazione tale da rendere altamente improbabile la corrispondenza casuale tra due individui appartenenti alla popolazione. L'univocità del profilo viene inoltre supportata da un'apposita valutazione statistico-probabilistica.

A partire dal 1996, il *Federal Bureau of Investigation* (FBI) promosse un progetto finalizzato all'individuazione di un insieme di marcatori STR idonei alla realizzazione del database genetico nazionale statunitense, noto come CODIS (*Combined DNA Index System*). Al termine del progetto

furono individuati 13 loci[7], successivamente adottati come sistema di riferimento: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 e D21S11 (42).

Al pannello dei marcatori STR viene inoltre associato il locus dell'Amelogenina, relativo al gene che codifica per l'omonima proteina, coinvolta nei processi di formazione dello smalto dentale. In ambito forense, questo locus è impiegato come indicatore del sesso biologico sulla base della differenza di lunghezza dei frammenti presenti sui cromosomi sessuali: il frammento associato al cromosoma X presenta una lunghezza di circa 106 bp, mentre quello associato al cromosoma Y è di circa 112 bp (43). L'amplificazione mediante primer specifici consente quindi di distinguere due prodotti: nei soggetti di sesso maschile, caratterizzati dalla presenza dei cromosomi X e Y, si osservano due segnali distinti, mentre nei soggetti di sesso femminile, dotati di due cromosomi X, viene generalmente rilevato un unico segnale.

Figura 25: Marcatori costituenti il Combined DNA Index System (CODIS)



[7] Si precisa che il numero di 13 loci STR si riferisce alla configurazione originaria del sistema CODIS. A partire dal 2017, il nucleo di loci STR di riferimento (CODIS Core Loci) è stato ampliato a 20 marcatori, al fine di incrementare il potere discriminante dei profili genetici e migliorare le possibilità di confronto tra i profili inseriti nel database.

Attualmente sono disponibili sul mercato sistemi commerciali in grado di analizzare simultaneamente un numero elevato di loci, arrivando, nel caso di alcuni kit prodotti da Promega, fino a 27 marcatori. L'incremento del numero di loci analizzati permette di aumentare il potere discriminatorio complessivo del profilo genetico e, al contempo, di disporre di un maggior numero di informazioni utili nell'interpretazione di campioni caratterizzati dalla presenza di miscele genetiche o da un marcato grado di degradazione.

All'interno di questi sistemi è generalmente incluso anche il locus dell'Amelogenina, presente sui cromosomi sessuali e utilizzato per l'attribuzione del sesso genetico, insieme a un numero variabile di marcatori specifici del cromosoma Y.

Poiché il polimorfismo degli STR è determinato principalmente dalla diversa numerosità delle unità ripetute presenti in ciascun locus, gli alleli appartenenti allo stesso marcatore possono differire tra loro anche per pochi nucleotidi. L'analisi genetica deve pertanto consentire una separazione sufficientemente risolutiva dei prodotti di amplificazione, così da permetterne l'accurata distinzione e successiva assegnazione alle rispettive varianti alleliche.

A tale scopo, i frammenti di DNA amplificati vengono sottoposti a elettroforesi capillare, una tecnica che consente di separare i prodotti in funzione della loro mobilità elettroforetica e, conseguentemente, della loro lunghezza. Poiché i diversi loci analizzati possono produrre frammenti caratterizzati da intervalli dimensionali parzialmente sovrapposti, la semplice separazione in base alla dimensione potrebbe non essere sufficiente a distinguere tutti i prodotti presenti nella stessa reazione, per ovviare a tale problematica, i diversi marcatori vengono contrassegnati mediante fluorocromi differenti. Nello specifico, loci caratterizzati da intervalli di dimensioni analoghe possono essere associati a fluorocromi diversi, consentendo di distinguerne i segnali durante la successiva analisi elettroforetica (41).

Figura 26: Profilo elettroforetico



La genetica forense si configura essenzialmente come una disciplina di tipo comparativo. Sebbene la caratterizzazione di un profilo genetico a partire da una traccia biologica o da un campione di riferimento rappresenti una fase fondamentale dell'indagine, è attraverso il confronto tra differenti profili che l'analisi assume il suo principale significato identificativo. Un esempio tipico è rappresentato dalla comparazione tra il profilo genetico ricavato da una traccia rinvenuta sulla scena e quello ottenuto da un soggetto sottoposto ad accertamento.

Il confronto tra i profili può evidenziare una condizione di incompatibilità, qualora vengano riscontrate differenze genetiche, oppure una compatibilità quando i marcatori analizzati risultano concordanti. La presenza di una compatibilità, tuttavia, non costituisce di per sé una prova dell'unicità dell'associazione tra il profilo della traccia e quello del soggetto esaminato. È pertanto necessario affiancare al dato genetico una valutazione statistica, finalizzata a determinare quanto sia probabile osservare la medesima configurazione genetica in un individuo scelto casualmente dalla popolazione.

Uno dei parametri utilizzati a questo scopo è la *Random Match Probability* (RMP), definita come la probabilità che un individuo non correlato geneticamente al soggetto di riferimento, selezionato casualmente dalla popolazione, presenti un profilo genetico coincidente con quello analizzato. Secondo Butler, un profilo ottenuto mediante l'analisi di 13 marcatori può raggiungere una RMP dell'ordine di uno su mille miliardi, evidenziando l'elevata capacità discriminatoria derivante dalla valutazione simultanea di più loci.

Il calcolo della RMP può essere effettuato considerando sia il singolo locus sia l'intero profilo genetico. Per procedere alla stima è necessario disporre delle frequenze alleliche relative ai marcatori analizzati nella specifica popolazione di riferimento. Le frequenze genotipiche dei singoli loci possono essere stimate sulla base dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, mentre il calcolo della probabilità complessiva del profilo mediante il principio del prodotto presuppone l'indipendenza statistica tra i loci considerati. Tuttavia, la presenza di una sottostruttura di popolazione può determinare differenze nelle frequenze alleliche tra sottopopolazioni e influenzare le probabilità genotipiche attese. Per tenere conto di tale fenomeno, nella genetica forense vengono adottati modelli correttivi basati sul coefficiente di coancestria θ (theta), che consente di considerare la differenziazione genetica tra sottopopolazioni. L'applicazione di questa correzione contribuisce a ottenere stime della RMP più appropriate rispetto alle caratteristiche della popolazione di riferimento (40).

5. MATERIALI E METODI

Il presente capitolo descrive i materiali, le metodologie e le procedure analitiche impiegate nella sperimentazione. Le attività sperimentali hanno previsto la deposizione di impronte papillari su differenti substrati, l'applicazione di trattamenti chimici per la loro esaltazione, il campionamento delle tracce biologiche mediante tamponi floccati Copan e microFLOQ e le successive analisi genetico-forensi.

La sperimentazione è stata suddivisa nelle seguenti fasi di seguito descritte:

A) Deposizione in deplezione di impronte papillari trattate con sangue diluito

B) Trattamento chimico delle impronte di sangue

C) Esecuzione dei test presuntivi e confermativi per il sangue

D) Campionamento della traccia tramite tampone floccato Copan e microFLOQ

E) Ricerca del profilo genotipico di un donatore delle impronte contaminate dal sangue diluito di un donatore differente

F) Visualizzazione delle impronte a seguito di contaminazione per: asportazione, colatura e deposito di sangue.

5.1 MATERIALI UTILIZZATI

I materiali utilizzati per la seguente sperimentazione sono stati:

1) Vetro

2) Mattonella da bagno in gres porcellanato

3) Specchio

4) Acciaio

5) Cartongesso

6) Rubinetteria

Per gli esperimenti è stato utilizzato sia sangue animale (di maiale) sia sangue umano. La sperimentazione ha coinvolto complessivamente tre donatori umani, di cui due di sesso maschile e uno di sesso femminile. Per ciascun donatore erano disponibili i rispettivi profili genetici STR di riferimento, utilizzati per il confronto con i profili ottenuti dalle tracce biologiche campionate durante le diverse fasi sperimentali. (Appendici 9)

Il sangue non utilizzato è stato conservato in congelatore a -20 °C per procedere in seguito ad altre sperimentazioni. Per l'acquisizione fotografica dei risultati degli esperimenti è stata adoperata una macchina NIKON D810 con obiettivi da 120 e 105 mm di distanza focale.

5.2 TRATTAMENTI CHIMICI

Per l'esaltazione chimica delle impronte sono stati selezionati come reagenti il Leuco Crystal Violet, L'Amido Black e la Ninidrina.

Per le procedure sperimentali sono state utilizzate soluzioni di Leuco Crystal Violet (LCV), Amido Black (AB) e ninidrina già preparate e disponibili presso il laboratorio, delle quali non erano note le concentrazioni esatte. I reagenti sono stati applicati mediante nebulizzazione spray, senza un numero prestabilito di erogazioni, poiché la quantità applicata veniva determinata dall'operatore in funzione delle caratteristiche della superficie e dell'effetto di esaltazione osservato. Di conseguenza, il volume complessivo di soluzione utilizzato per ciascun campione non è stato quantificato. Nei trattamenti con Amido Black e Leuco Crystal Violet, la comparsa della colorazione delle impronte è stata osservata generalmente dopo circa 15 minuti dall'applicazione. Le riprese fotografiche venivano tuttavia effettuate non prima del giorno successivo, generalmente dopo almeno 24 ore, per consentire la completa asciugatura delle superfici trattate. Nel caso della ninidrina, le riprese fotografiche sono state effettuate a distanza di circa 12 giorni dall'applicazione del reagente, senza una registrazione precisa del momento di comparsa della colorazione.

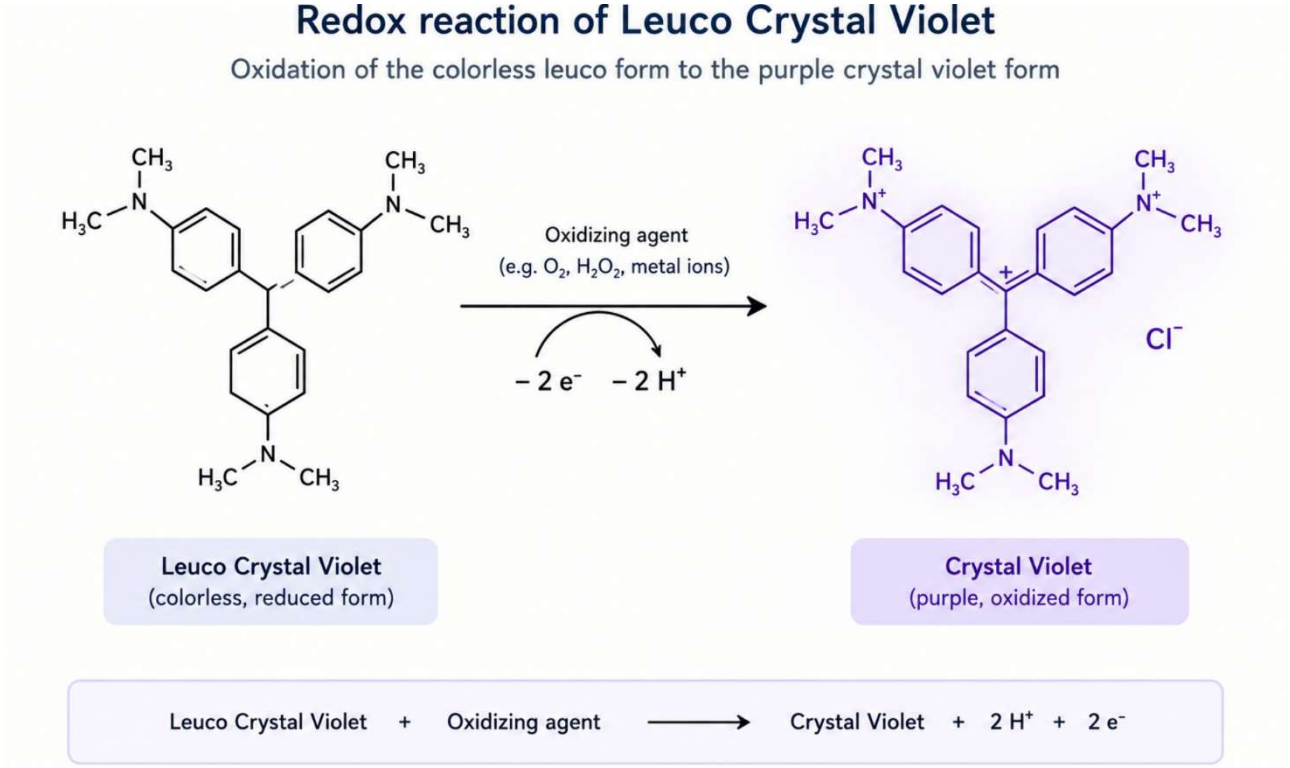
LEUCO CRYSTAL VIOLET (LCV):

Il Leuco Crystal Violet è un reagente chimico utilizzato per l'esaltazione di impronte latenti contaminate dal sangue, su substrati porosi e non porosi. L'utilizzo di una soluzione acquosa di Leuco Crystal Violet è un metodo veloce e sicuro per l'evidenziazione di questo tipo di tracce. La reazione è un processo di ossidazione che avviene per via del ferro presente nell'emoglobina.

Per la corretta applicazione è previsto l'impiego di un fissativo delle tracce di sangue, l'acido 5-solfo-salicilico, che non reagisce con le componenti eccrine e sebacee della traccia papillare, ma è particolarmente affine alle proteine e le sostanze cellulosiche.

LCV e perossido di idrogeno nella formula originale, in presenza di catalizzatori come ferro e rame, determinano la formazione di un prodotto di colore viola/porpora, identificato nel Crystal Violet (meglio noto come Basic Violet 3 o esametil-pararosanilina cloruro) (44).

Figura 27: Reazione di ossido riduzione di LCV

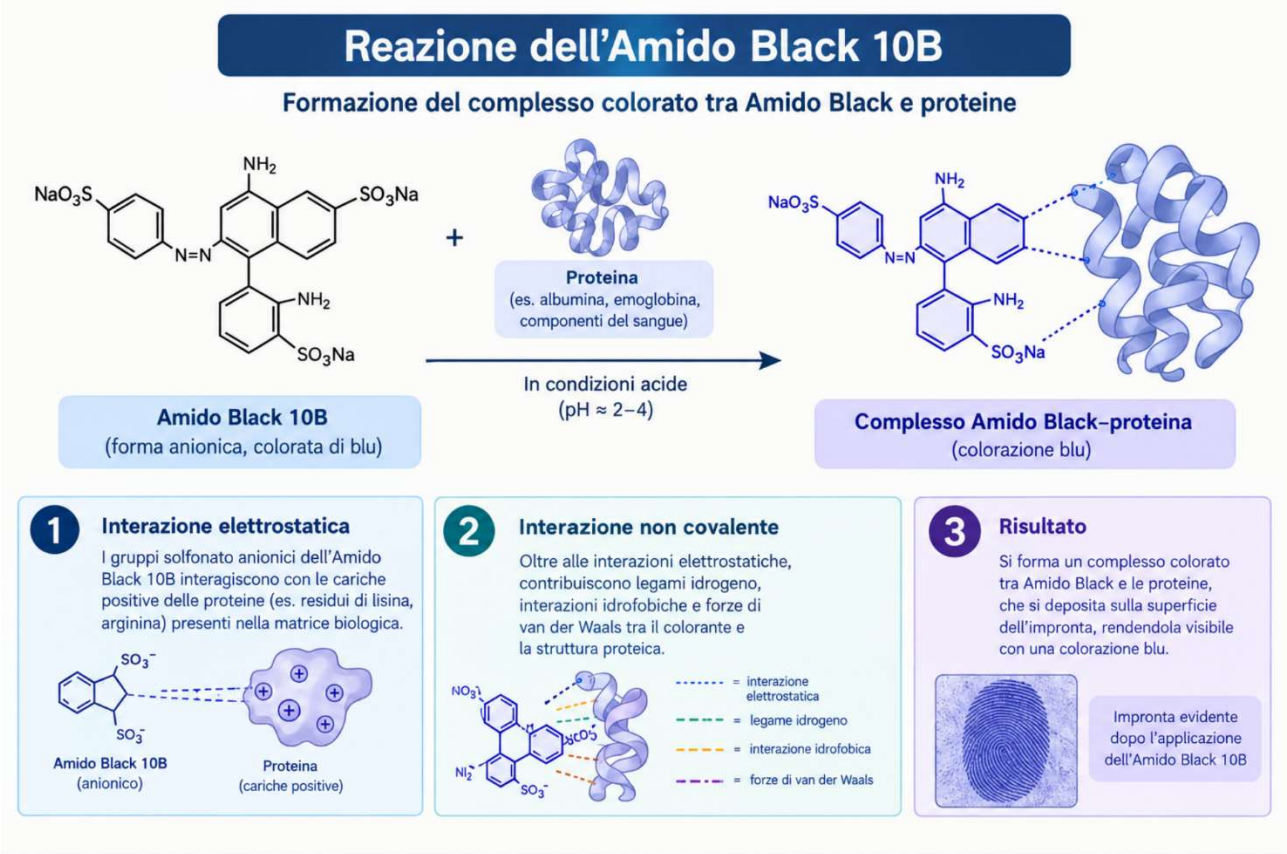


AMIDO BLACK:

L'Amido Black (Acid Black 01) è una sostanza che viene adoperata per esaltare le impronte latenti contaminate dal sangue, su substrati lisci e non porosi. La peculiarità di questo reagente chimico è la sua affinità alle proteine, non solo quelle del sangue.

Per la corretta applicazione del trattamento, inizialmente viene applicata una soluzione che agisce come fissativo, acido 5-solfosalicilico in acqua distillata. La soluzione del reattivo è amido black in etanolo, acido acetico ed acqua distillata. Successivamente all'applicazione del reagente sulle tracce papillari, viene attuata una fase di lavaggio per eliminare l'eccesso di colorante. La soluzione di lavaggio è costituita da etanolo, acido acetico ed acqua distillata in miscela (250/50/700). Le impronte diventano di colore blu/nero e possono essere acquisite fotograficamente con luce bianca (45).

Figura 28: Reazione Amido black



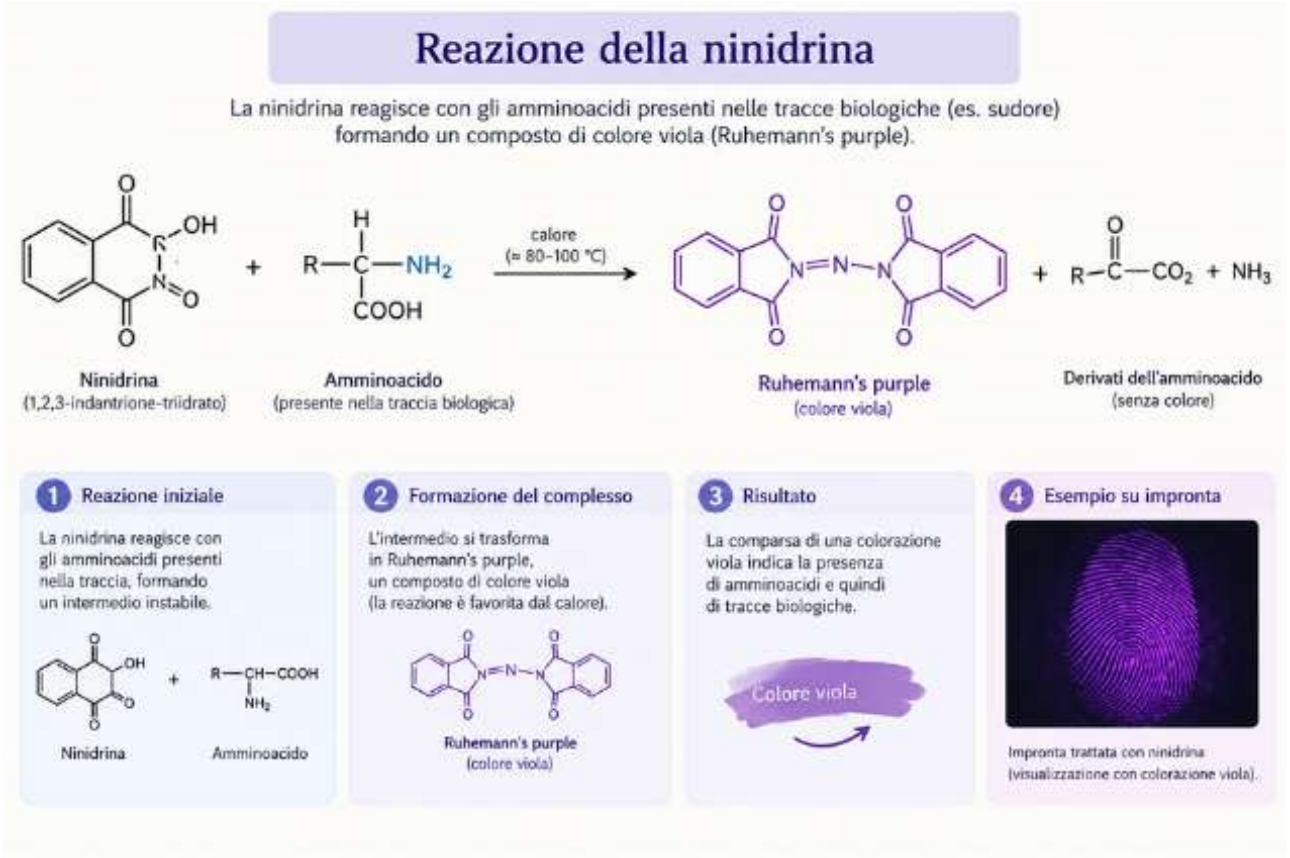
NINIDRINA:

La Ninidrina è uno dei reagenti chimici maggiormente impiegati per la visualizzazione delle impronte digitali latenti depositate su superfici porose. A differenza delle metodiche destinate prevalentemente all'evidenziazione delle componenti lipidiche dell'impronta, la Ninidrina sfrutta principalmente le componenti amminoacidiche contenute nel residuo papillare.

La reazione che avviene con gli amminoacidi porta alla formazione della cosiddetta porpora di Ruhemann, un prodotto di colore viola intenso. La formazione di questo composto consente di esaltare le creste papillari precedentemente non osservabili a occhio nudo.

Nella pratica forense la ninidrina può essere adoperata tramite spray o immersione del substrato nella soluzione, quando il materiale lo consente. Successivamente all'applicazione il substrato viene lasciato asciugare attraverso condizioni controllate di temperatura e umidità. Il tempo necessario per la comparsa e lo sviluppo della colorazione violacea può variare in funzione delle condizioni di temperatura e umidità, delle caratteristiche del substrato e della quantità di residuo papillare presente. Lo sviluppo della colorazione può essere accelerato mediante riscaldamento controllato (46).

Figura 29: Reazione della ninidrina



5.3 TEST BIOLOGICI PRESUNTIVI E CONFERMATIVI

Per definire la natura biologica delle tracce rinvenute sulla scena del crimine, si approfitta dell'utilizzo di test generici o "presuntivi" e test specifici o "confermativi".

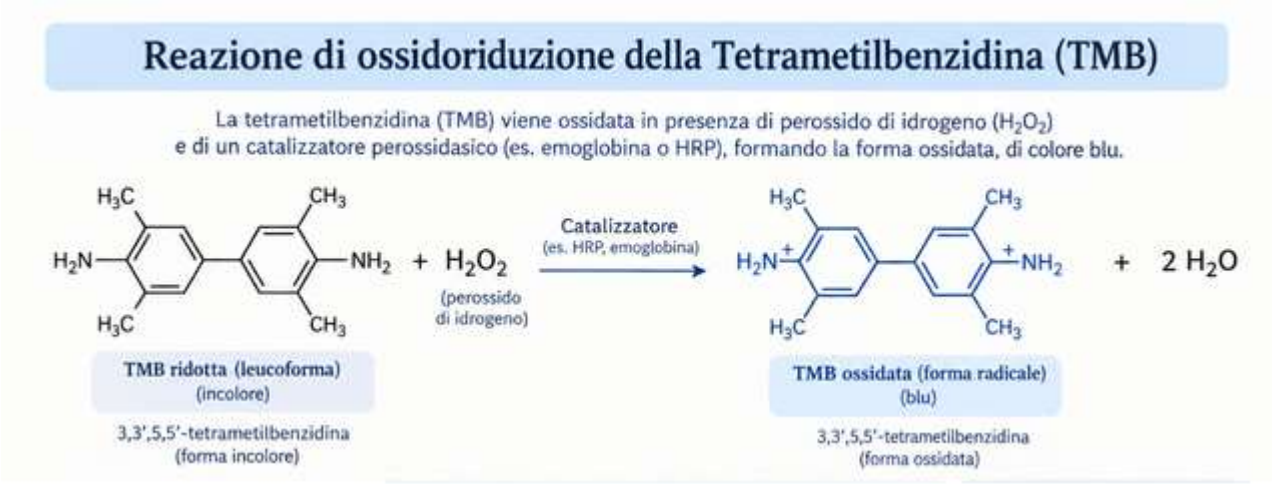
A) TEST PRESUNTIVI: la presenza di uno specifico marcatore biologico, nella traccia in esame, potrà essere solamente indicativa e mai certo. Sono dei test chimico-enzimatici che si basano sulla capacità di un substrato di cambiare colore o emettere luminescenza in presenza di un enzima nel tessuto bersaglio. I test presuntivi hanno un'elevata sensibilità e sono in grado di rintracciare anche piccole quantità di materiale, ma sono poco specifici. Questa bassa specificità può fornire dei "falsi positivi", in quanto la reazione può avvenire anche con sostanze diverse dal marcatore di interesse.

1) Test della Tetrametilbenzidina (Combur Test): Adoperato sia per le analisi delle urine che per il sangue. Viene adoperato per valutare "inizialmente" la presenza di sangue, sfruttando la reazione colorimetrica che avviene tra emoglobina e tetrametilbenzidina. Il test è costituito da uno stick con tre tamponi gialli reattivi multi-parametrici, di cui quello specifico per il sangue è il primo tampone, che a contatto con questo cambia colore rapidamente, diventando verde brillante. Non è un test specie-specifico per cui non è esclusa la presenza di falsi positivi, per esempio in presenza di perossidasi vegetali, metalli (ferro, rame), ruggine e alcuni detergenti che contengono ipocloriti (es. varechina). Il Combur Test sfrutta l'attività pseudoperossidasica del gruppo eme dell'emoglobina, il cui atomo centrale di ferro partecipa a reazioni di ossidoriduzione. In presenza di un perossido, il gruppo eme catalizza l'ossidazione della tetrametilbenzidina (TMB), determinando una variazione cromatica della zona reattiva dello stick dal giallo al verde. Tale reazione costituisce un'indicazione presuntiva della presenza di sangue, ma non permette di determinarne con certezza l'origine biologica o la specie di appartenenza (47).

Figura 30: Combur test

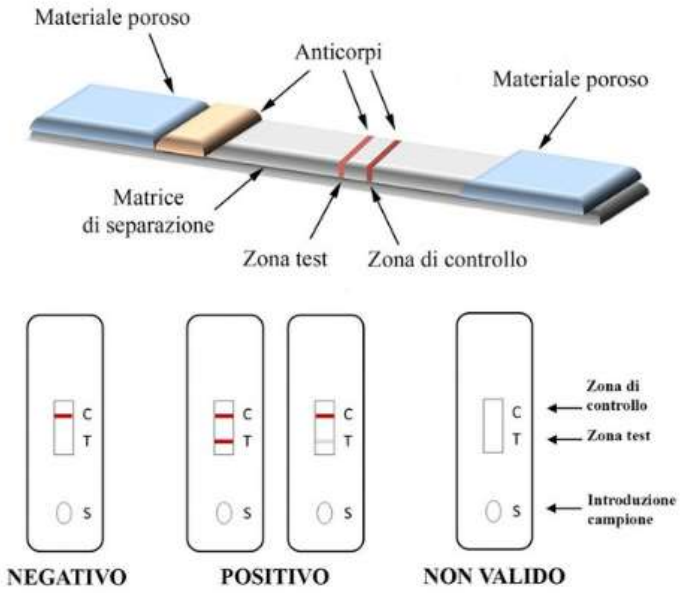


Figura 31: Reazione di ossidoriduzione della Tetrametilbenzidina



B) TEST CONFERMATIVI: sono caratterizzati da un'elevata specificità analitica e consentono di rilevare determinati marcatori biologici mediante il riconoscimento selettivo tra antigeni e anticorpi. Sebbene presentino generalmente una specificità superiore rispetto ai test chimici presuntivi, un risultato positivo non costituisce necessariamente una conferma definitiva della natura e dell'origine della traccia biologica, poiché possono verificarsi reazioni crociate o interferenze analitiche. L'interpretazione del risultato deve pertanto tenere conto delle caratteristiche e dei limiti del test utilizzato. Il test è costituito da un dispositivo in plastica, in cui è presente un pozzetto, adibito all'introduzione del campione disciolto in una soluzione tampone di estrazione, ed una finestra per la lettura del risultato.

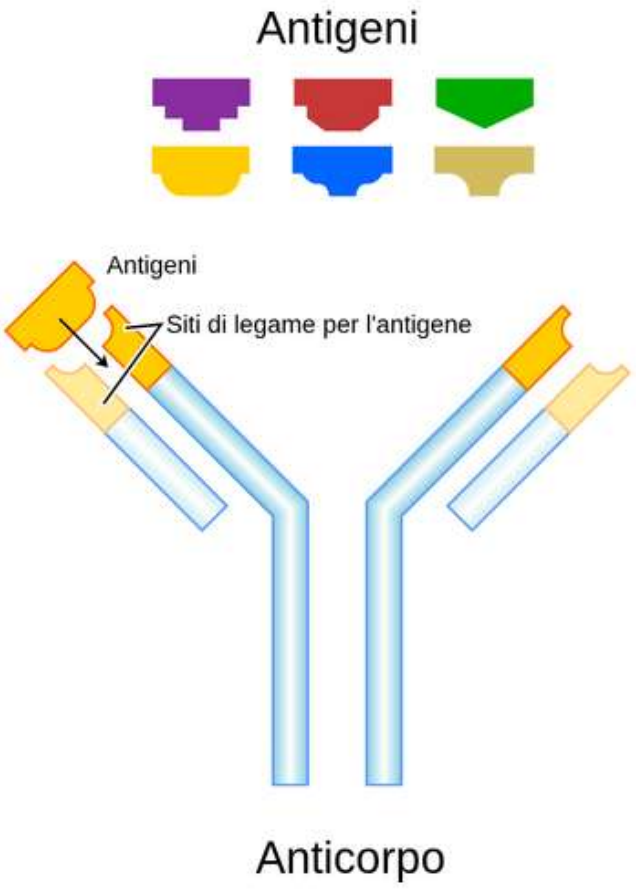
Figura 32: Rappresentazione schematica di un test immunocromatografico



All’interno del dispositivo è presente una lamella in plastica sulla cui parte centrale è stratificata la matrice di separazione (gel di silice) mentre, vicino alle due estremità, sono presenti due supporti formati da materiale poroso. Gli anticorpi monoclonali mobili, marcati con delle molecole cromogene (rosse), si ritrovano sparsi per il primo supporto, mentre gli anticorpi policlonali sono sparsi sulla matrice di separazione. Il secondo supporto serve per semplificare la corsa cromatografica del campione, dalla zona di introduzione alla matrice di separazione. L’antigene cercato interagisce con gli anticorpi monoclonali mobili specifici formando un complesso antigene-anticorpo mobile. L’immunocomplesso viaggia sul supporto poroso dove interagisce con un secondo anticorpo immobilizzato, che sarà diretto contro un differente epitopo dell’antigene formando un complesso che precipiterà e sarà visibile in quel punto come una banda, che corrisponde alla linea della “zona test”.

Gli anticorpi monoclonali marcati che sono rimasti liberi migrano oltre la “zona test” e interagiscono in corrispondenza della “zona controllo”, con anticorpi IgG diretti contro gli anticorpi monoclonali. La banda della zona di controllo deve essere sempre visibile affinché il test risulti valido (48).

Figura 33: Legame antigene - anticorpo



Esistono molti sistemi commerciali di questo tipo, alcuni adattati alla pratica clinica, (test per la ricerca di sangue nelle feci) in parte creati espressamente per l'attività forense sono disponibili sul mercato per tessuti come:

SANGUE: Il BLUESTAR OBTI (Occult Blood Test Immunochromatographic) è un test immunocromatografico rapido utilizzato in ambito forense per la rilevazione qualitativa dell'emoglobina umana delle tracce di sangue. Il test rappresenta un'evoluzione dell'Hexagon OBTI e si basa sull'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro l'emoglobina umana. Il suo impiego consente di verificare se una traccia precedentemente individuata come possibile sangue, presenti delle caratteristiche compatibili con un'origine umana. È importante sottolineare che il risultato positivo costituisce una presunzione di presenza di sangue umano e non una conferma definitiva, che deve essere eventualmente ottenuta mediante ulteriori analisi di laboratorio.

Il principio di questo tipo di test consiste nel trasferire la presunta traccia di sangue all'interno di una provetta contenente uno specifico mezzo di trasporto a base di tampone TRIS, a pH 7,8. Il bersaglio analitico è rappresentato dall'emoglobina umana (hHb) contenuta nei globuli rossi.

Il campione viene quindi miscelato con il tampone, favorendo il rilascio dell'emoglobina dalle cellule ematiche e permettendone successivamente la migrazione all'interno del dispositivo analitico. Quando l'emoglobina è presente nel campione, essa interagisce con gli anticorpi coniugati alle particelle colorate formando un complesso immunologico. Il complesso migra lungo la membrana del dispositivo per capillarità e raggiunge la zona di test in cui si trovano immobilizzati ulteriori anticorpi diretti contro l'emoglobina umana (49).

Il complesso antigene anticorpo viene quindi catturato in questa zona, determinando la comparsa di una linea di test (T) di colore rosso. Una seconda linea, denominata linea di controllo (C) permette di verificare il corretto svolgimento del test.

La comparsa di entrambe le linee C e T indica la presenza di emoglobina umana riconosciuta dal sistema immunologico.

Figura 34: OBTI TEST



5.4 microFLOQ

Negli ultimi anni, l'evoluzione delle metodiche di genetica forense ha portato allo sviluppo di sistemi di campionamento sempre più orientati alla riduzione della quantità di materiale biologico consumato e alla semplificazione delle procedure analitiche. In questo contesto si collocano i tamponi microFLOQ Direct, sviluppati da Copan in collaborazione con il French Gendarmerie Forensic Research Institute (IRCGN), come dispositivo miniaturizzato per il campionamento di tracce biologiche destinate all'analisi del DNA.

In questa tipologia di tampone le fibre di nylon sono posizionate sulla superficie del supporto anziché costituire un nucleo assorbente interno. La peculiare forma della testa del tampone permette di raccogliere una quantità molto ridotta di materiale biologico, limitando al contempo la ritenzione del campione all'interno del dispositivo. Il tampone presenta inoltre una testa di dimensioni estremamente ridotte, caratteristica che consente un campionamento localizzato e selettivo della traccia.

Una particolarità rilevante dei tamponi microFLOQ è il trattamento delle fibre con un agente litico, il quale favorisce la lisi cellulare del materiale biologico raccolto e rende possibile, in specifiche condizioni operative, l'impiego del tampone direttamente nel processo di amplificazione mediante PCR, senza la necessità di effettuare preventivamente una tradizionale estrazione del DNA.

Il principio alla base di questa tecnologia consiste quindi nella combinazione tra micro-campionamento, lisi cellulare e amplificazione diretta. Rispetto al comune iter lavorativo, nel quale il campione viene sottoposto alle procedure di estrazione, quantificazione, amplificazione degli STR e successiva elettroforesi capillare, il sistema microFLOQ consente di ridurre il numero di passaggi necessari per arrivare alla generazione del profilo genetico.

5.4.1 MICRO-CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DELLA TRACCIA

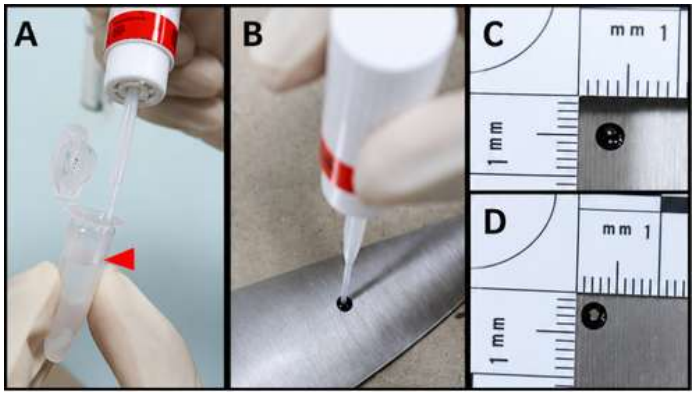
Uno degli aspetti caratteristici del microFLOQ è rappresentato dalla possibilità di effettuare un subsampling della traccia. La superficie estremamente ridotta della testa del tampone permette di prelevare una porzione minima del reperto, preservando una parte considerevole del materiale originale per eventuali analisi successive.

Questa caratteristica assume particolare interesse nell'analisi forense, nella quale la quantità di materiale biologico disponibile può essere limitata e non sempre riproducibile. Il campionamento di una piccola porzione della traccia permette, quando il risultato ottenuto è sufficiente, di conservare il materiale residuo per ulteriori accertamenti; qualora invece il primo approccio non produca un risultato interpretabile, il reperto può essere sottoposto a una procedura di estrazione convenzionale.

Il concetto di *subsampling* risulta particolarmente interessante nel caso delle impronte papillari, nelle quali la quantità di materiale biologico potenzialmente disponibile per l'analisi può essere estremamente ridotta. In questi casi la possibilità di effettuare un campionamento maggiormente puntuale può rappresentare un vantaggio rispetto all'impiego di dispositivi di raccolta maggiore.

Figura 35: Campionamento microFLOQ



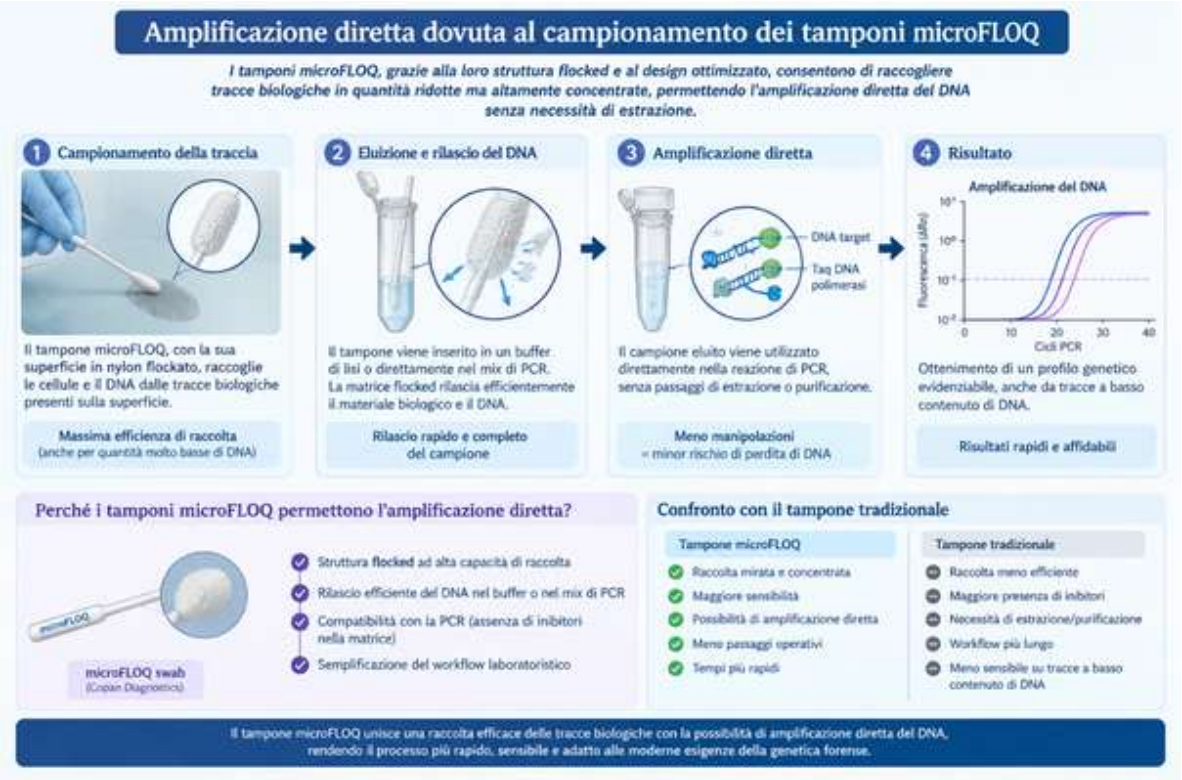


5.4.2 MICROFLOQ E AMPLIFICAZIONE DIRETTA DEL DNA

I microFLOQ consentono al campione di passare direttamente alla fase di amplificazione mediante PCR. Ambers et al. hanno valutato l'impiego dei microFLOQ per l'amplificazione diretta di DNA proveniente da macchie di sangue, saliva e campioni di *touch DNA*. Nel loro studio hanno dimostrato come il sistema possa ridurre la perdita di materiale associata ai passaggi di estrazione, rendendo disponibile una maggiore quantità di DNA templato durante l'amplificazione. Gli autori hanno inoltre evidenziato la possibilità di ottenere risultati in tempi inferiori rispetto alla procedura tradizionale, con profili generabili nell'arco di circa tre ore dall'invio del campione di laboratorio.

L'eliminazione della fase di estrazione, tuttavia, presenta una potenziale criticità: Il DNA viene trasferito direttamente nella fase di amplificazione insieme alle sostanze presenti nella traccia. In assenza della fase di purificazione, eventuali inibitori della PCR possono influenzare negativamente la procedura di amplificazione. Proprio per questo motivo, alcuni studi hanno valutato l'impiego di additivi PCR in grado di migliorare le prestazioni dell'amplificazione diretta. Chong et al. hanno osservato, ad esempio, un incremento delle altezze dei picchi STR in presenza di un additivo PCR, sottolineando l'importanza di considerare la possibile presenza di inibitori nei campioni forensi (50, 51).

Figura 36: Amplificazione diretta microFLOQ



5.4.3 VANTAGGI E CRITICITÀ DEL SISTEMA MICROFLOQ

L'utilizzo dei tamponi microFLOQ presenta diversi potenziali vantaggi rispetto al comune flusso lavorativo.

1) Riduzione della quantità di reperto consumata, grazie alla testa di dimensioni ridotte

2) Possibilità di effettuare un campionamento maggiormente puntuale

3) Riduzione delle manipolazioni del campione

4) Possibilità di amplificazione diretta, evitando la tradizionale fase di estrazione

5) Riduzione dei tempi di analisi

6) Possibilità di preservare la maggior parte del reperto per successive analisi

7) Potenziale utilità nell'analisi di campioni con scarse quantità di DNA

Insieme a questi vantaggi devono tuttavia essere considerate alcune limitazioni. La quantità estremamente ridotta di materiale raccolto può diventare un limite quando il campione contiene una quantità particolarmente bassa di DNA. Inoltre, l'assenza di una fase di purificazione può determinare il trasferimento di eventuali inibitori direttamente nella reazione di PCR. La resa del campionamento può inoltre dipendere dalle caratteristiche del substrato, dalla natura del materiale biologico, dalle modalità di deposizione e dalla tecnica utilizzata per il prelievo.

Di conseguenza, il microFLOQ non deve essere considerato un sostituto universale del tampone tradizionale, ma uno strumento da impiegare in specifici contesti forensi che richiedono un campionamento selettivo e mirato, finalizzato a ridurre al minimo il consumo del reperto e a consentire, quando possibile, l'analisi diretta del DNA (51-53).

5.5 ANALISI DEL DNA

Per la tipizzazione dei profili del DNA si sfrutta un classico flusso di lavoro da laboratorio forense che include: il prelievo della traccia, estrazione del DNA, quantificazione, amplificazione ed elettroforesi capillare.

5.5.1 ESTRAZIONE DEL DNA

Un campione su una scena del crimine contiene oltre al DNA altre sostanze che possono interferire o inibire il processo di analisi. I metodi di estrazione sono stati sviluppati per separare le proteine ed altro materiale cellulare dalle molecole di DNA. Idealmente, il processo di estrazione del DNA rimuove gli inibitori che riducono o prevengono la reazione di amplificazione a catena della Polimerasi (PCR). Il processo di estrazione dovrebbe produrre una soluzione stabile che contiene un'alta quantità di DNA che non degrada nel tempo di conservazione del campione. Le tappe del processo di estrazione del DNA sono tipicamente:

1) Lisi della cellula e rilascio del DNA

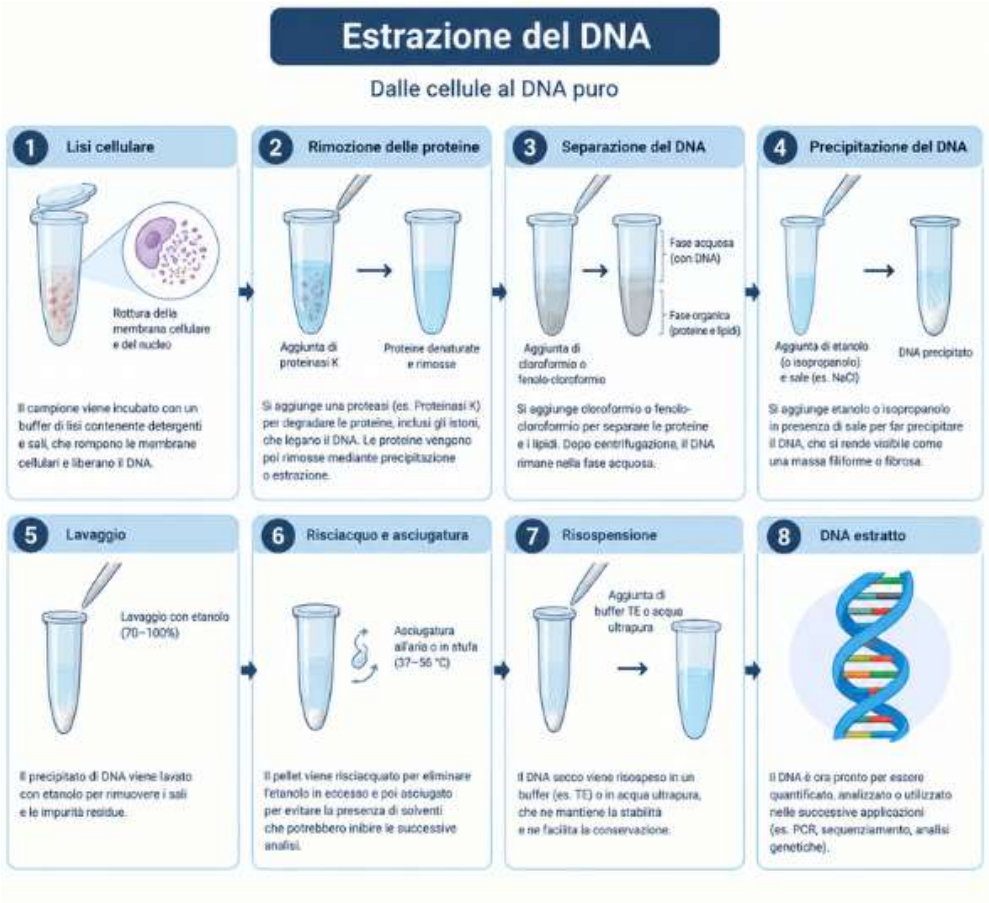
2) Separazione del DNA da altro materiale cellulare (purificazione)

3) Isolamento del DNA per formare un target idoneo all'amplificazione

La quantità e la qualità del DNA deve essere valutata per assicurare risultati ottimali. Tutti i campioni devono essere attentamente gestiti per evitare la contaminazione tra campioni o l'introduzione di DNA esogeno.

Per automatizzare al massimo il processo di estrazione molti laboratori adoperano tecniche di estrazione nelle quali il DNA è selettivamente legato a substrati come particelle di silice. Il DNA è trattenuto mentre le proteine e le altre componenti cellulari sono eluite; dunque, il DNA può essere rilasciato in forma pura (54).

Figura 37: Estrazione del DNA

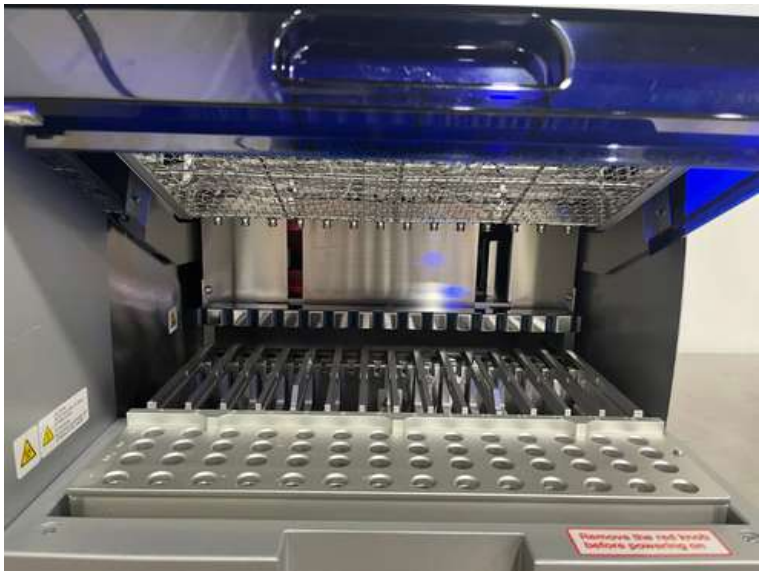


Per l'estrazione è stata utilizzata la piattaforma robotica EZ1 della QIAGEN che utilizza un sistema di estrazione basato sulle particelle di silice. In questa serie di operazioni gli acidi nucleici sono assorbiti su supporti di silice, come delle piccole sferette in vetro, in presenza di un'alta concentrazione di sali caotropici come la guanidina idrocloride o la guanidina isotiocinato, ioduro di sodio e il sodio perclorato. Questi sali caotropici distruggono i legami ad idrogeno e permettono la denaturazione di proteine ed acidi nucleici. Se la soluzione è più acida di un pH di 7,5 l'adsorbimento del DNA alla silice è di circa il 95% e le sostanze indesiderate possono essere rimosse mediante lavaggi. Con una bassa concentrazione di sale, in una condizione più alcalina, il DNA riesce a distaccarsi in maniera efficiente dalle biglie in silice.

Questa estrazione in fase solida può essere eseguita con centrifugazione o in vuoto spinto, in singolo pozzetto o in piastra da 96 pozzetti, e addirittura con l'utilizzo di microchip. Le piattaforme robotiche che sono state sviluppate per l'estrazione del DNA includono l'EZ1, M48 e QIAcube.

Figura 38: EZ1 della QIAGEN





5.5.2 QUANTIFICAZIONE DEL DNA

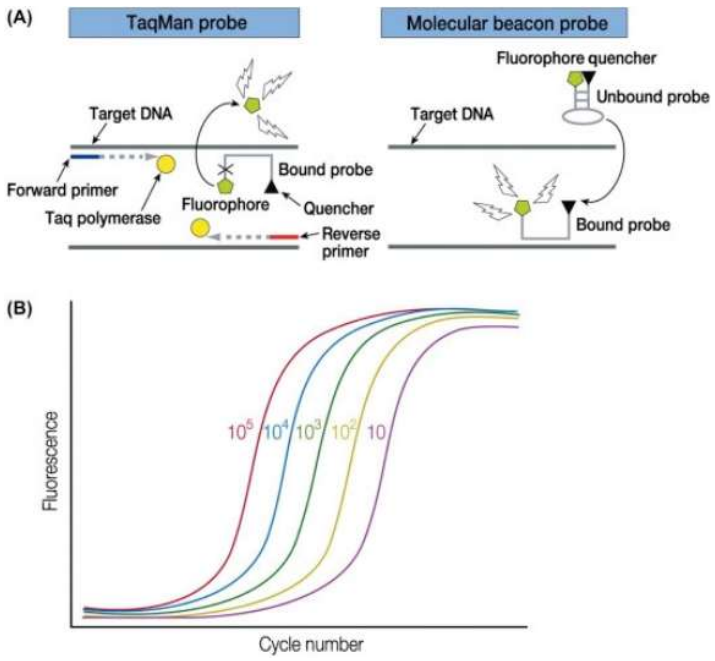
Successivamente all'estrazione del DNA si procede alla sua quantificazione, al fine di determinare la quantità di materiale genetico disponibile e di impostare le successive fasi analitiche.

Una quantità insufficiente di DNA può determinare profili genetici parziali o caratterizzati da una maggiore variabilità stocastica, mentre quantità eccessive possono favorire fenomeni quali la saturazione o l'aumento di artefatti durante la fase di amplificazione. Tra le metodiche utilizzate per la quantificazione del DNA umano, la PCR quantitativa in tempo reale (Real - Time quantitative PCR, qPCR) presenta il vantaggio di combinare l'amplificazione di una specifica sequenza di DNA con il monitoraggio della fluorescenza prodotta durante la reazione. Diversamente dalle metodiche che si basano sulla quantificazione spettrofotometrica o fluorimetrica, la qPCR permette di determinare in maniera specifica la quantità di DNA che può essere amplificata dal sistema utilizzato.

La quantità di fluorescenza viene registrata dall'apparecchiatura al termine o durante ciascun ciclo e aumenta progressivamente con l'accumulo del prodotto di amplificazione. Nel caso dei sistemi che si basano sull'utilizzo delle sonde TaqMan®, la rilevazione del prodotto avviene mediante una sonda oligonucleotidica specifica per la sequenza bersaglio. La sonda presenta generalmente un fluoroforo reporter a un'estremità e un quencher all'altra estremità. Quando la sonda è completa, la vicinanza tra reporter e quencher determina la riduzione del segnale fluorescente emesso dal reporter.

Durante la fase di annealing della PCR, la sonda si appaia alla propria sequenza bersaglio, compresa tra le regioni riconosciute dai due primer. Durante la successiva fase di estensione, l'attività 5' - 3' esonucleasica della DNA polimerasi provoca la degradazione della sonda ibridata al filamento bersaglio. La separazione fisica del reporter dal quencher comporta l'emissione di fluorescenza da parte del fluoroforo che viene rilevato dallo strumento. L'aumento progressivo della fluorescenza durante i cicli di amplificazione è quindi correlato alla formazione del prodotto PCR.

Figura 39: Real Time PCR

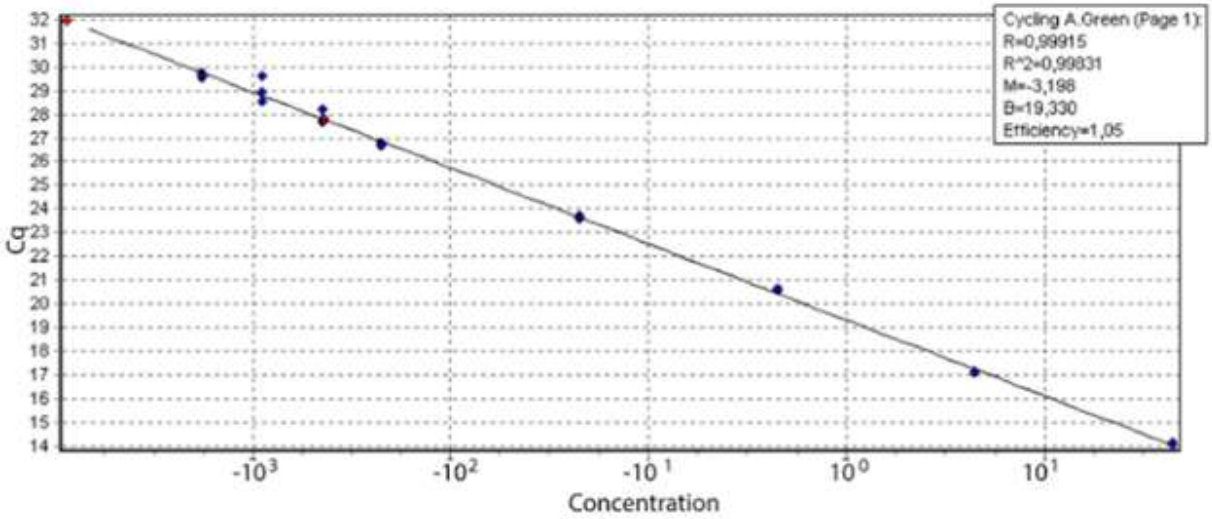


Il parametro fondamentale della qPCR è rappresentato dal Cq (quantification cycle), precedentemente indicato come Ct (threshold cycle). Il Cq corrisponde al ciclo di amplificazione nel quale il segnale fluorescente supera una determinata soglia analitica e diventa distinguibile dal segnale di fondo.

Il valore di Cq è inversamente proporzionale alla quantità iniziale di DNA presente nel campione: campioni contenenti una maggiore quantità di DNA bersaglio raggiungono la soglia di fluorescenza in un numero minore di cicli e sono distinti da valori di Cq minori. Viceversa, campioni contenenti una quantità iniziale inferiore di DNA richiedono un numero maggiore di cicli per raggiungere la soglia e presentano valori di Cq più elevati.

La relazione tra quantità iniziale di DNA e Cq viene determinata mediante una curva standard, realizzata attraverso l'analisi di campioni di quantità note di DNA. La curva permette di correlare il valore di Cq misurato nel campione ignoto alla quantità di DNA presente.

Figura 40: Curva standard correlata tra DNA e Cq



Nella nostra sperimentazione, il DNA dopo la fase di estrazione è stato quantificato mediante l'utilizzo del kit QuantifilerTM Trio DNA Quantification Kit, prodotto da Applied Biosystems, che

consente di valutare simultaneamente, la quantità di DNA umano amplificabile, il suo stato di degradazione e la quantità di DNA maschile attraverso specifiche sonde:

Small Autosomal Target: sonda per l'analisi quantitativa di regioni autosomiche corte (80 bp), in grado di appaiarsi a DNA degradato, più frammentato; Large Autosomal Target: sonda per l'analisi quantitativa di regioni autosomiche lunghe (214 bp).

Il rapporto tra la concentrazione di DNA rilevata mediante il target autosomico corto (Small Autosomal Target) e quella rilevata mediante il target autosomico lungo (Large Autosomal Target) consente di stimare l'indice di degradazione (Degradation Index, DI). Valori prossimi a 1 indicano una quantità comparabile di DNA amplificabile per entrambi i target, mentre valori progressivamente superiori a 1 suggeriscono un aumento della degradazione del campione. L'interpretazione del DI deve tuttavia tenere conto delle caratteristiche del sistema analitico e delle concentrazioni rilevate, poiché tale indice non permette, da solo, di prevedere con certezza il successo o il fallimento della successiva amplificazione STR.

Y-chromosome Target: sonda per l'analisi quantitativa di una regione Y-linked corta (75 bp);

Internal PCR Control (IPC): sonda capace di appaiarsi ad un campione di controllo presente nel kit per verificare la corretta riuscita della reazione. La sua mancata amplificazione indicherebbe la presenza di inibitori in soluzione.

La procedura di quantificazione Quantifiler Trio, per la costruzione della curva standard, prevede una doppia serie di diluizioni scalari del DNA standard (100 ng/µl stock), con concentrazioni comprese tra 50 ng/µl (Std.1) e 5 pg/ µl (Std.5). Come ulteriore controllo viene inserito un NTC ("no template control") da utilizzare come controllo negativo per verificare l'eventuale presenza di contaminazioni nei reagenti o durante la preparazione della reazione.

Per ogni campione/DNA standard, la reazione (Volume totale = 10 µl) è composta da:

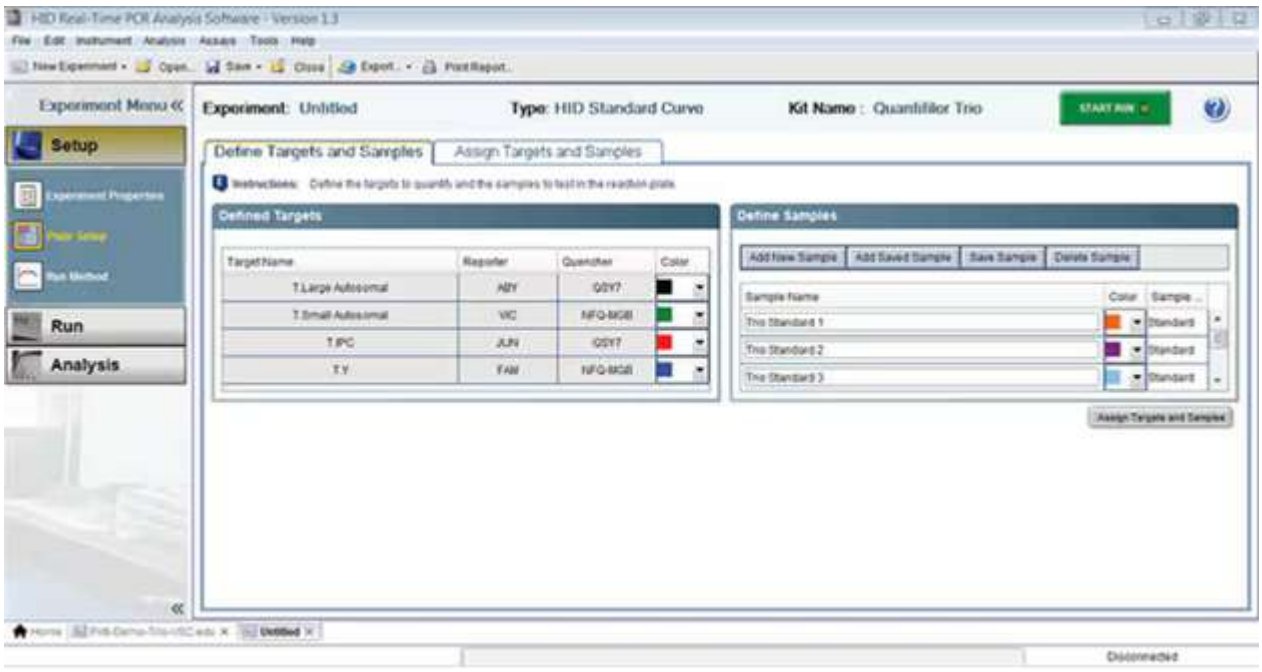
5 µl di Quantifiler ™ PCR Reaction Mix 47

4 µl Quantifiler ™ Trio Primer Mix

1 µl di DNA

La piastra viene caricata nel termociclatore Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System, gestito dal programma informatico HID Real Time PCR Analysis Software, in cui è inserito il layout della piastra da analizzare. Terminata l'amplificazione, i dati vengono analizzati dal software. La qualità della curva standard viene valutata attraverso il coefficiente di determinazione (R^2) e la pendenza della retta di regressione (slope). Secondo il manuale del kit Quantifiler Trio, un valore di $R^2 \geq 0,99$ indica una buona corrispondenza tra la retta di regressione e i valori di Ct ottenuti dagli standard di quantificazione. Lo slope fornisce invece un'indicazione dell'efficienza della reazione di amplificazione: un valore prossimo a −3,3 corrisponde a un'efficienza teorica del 100%. Gli intervalli tipici riportati dal produttore sono compresi tra −3,0 e −3,6 per i target Small Autosomal e Y, e tra −3,1 e −3,7 per il target Large Autosomal (55).

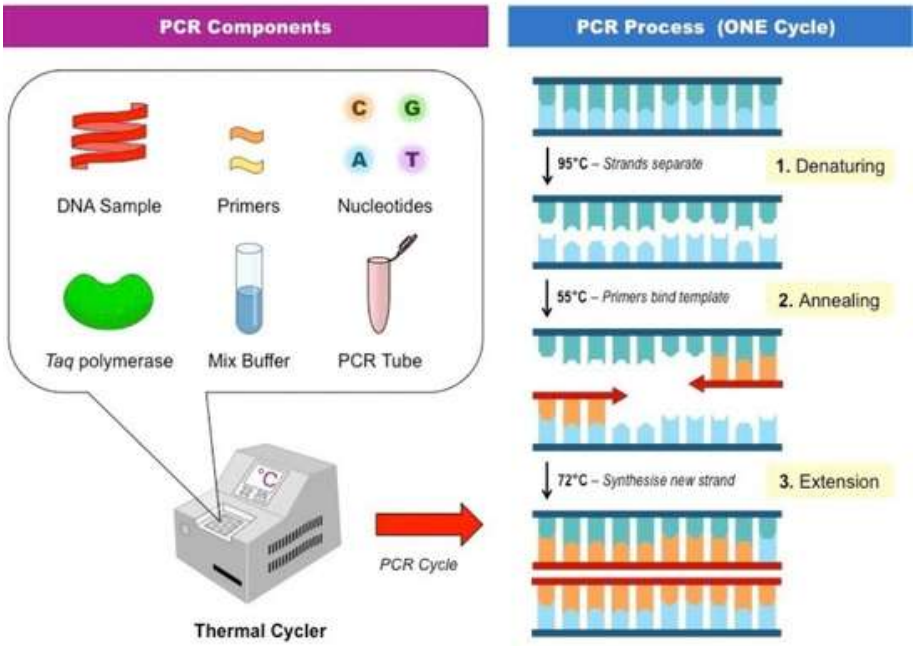
Figura 41: Interfaccia HID REAL TIME PCR analysis software



5.5.3 AMPLIFICAZIONE PCR

La reazione a catena della Polimerasi è un processo enzimatico durante il quale una specifica regione del DNA è replicata in maniera iterativa per ottenere numerose copie di una data sequenza. Questo processo di "replicazione" comprende fasi di riscaldamento e raffreddamento del campione in un'apposita strumentazione definita termociclatore per circa 30 cicli.

Figura 42: Componenti per l'amplificazione



Comunemente vi è l'alternanza di tre temperature, corrispondenti alle fasi di denaturazione del DNA, appaiamento dei primer al filamento stampo e sintesi del filamento complementare. In soluzione sono inseriti i reagenti necessari alla sintesi delle copie del DNA (DNA target, Taq polimerasi, coppie di primer, deossinucleotidi trifosfato, buffer salino e acqua).

Ogni ciclo di PCR è costituito principalmente da tre fasi: denaturazione, annealing ed estensione.

Denaturazione: durante la fase di denaturazione, la temperatura viene portata generalmente intorno a 94 – 98 °C, determinando la separazione dei filamenti della molecola di DNA a doppia elica mediante la rottura dei legami a idrogeno che rendono stabile l'appaiamento tra le basi complementari.

Annealing: Successivamente alla fase di denaturazione segue quella di annealing, in cui la temperatura si abbassa a un valore determinato in base alle caratteristiche dei primer utilizzati. In questa fase i primer si appaiano alle rispettive sequenze complementari presenti sui filamenti di DNA.

Estensione: Nella fase di estensione interviene la DNA polimerasi, che sintetizza il nuovo filamento di DNA a partire dall'estremità 3' del primer, incorporando progressivamente i dNTP complementari al filamento stampo. La temperatura di questa fase dipende dalla DNA polimerasi impiegata; nel caso della tradizionale Taq DNA polimerasi è generalmente prossima a 72 °C.

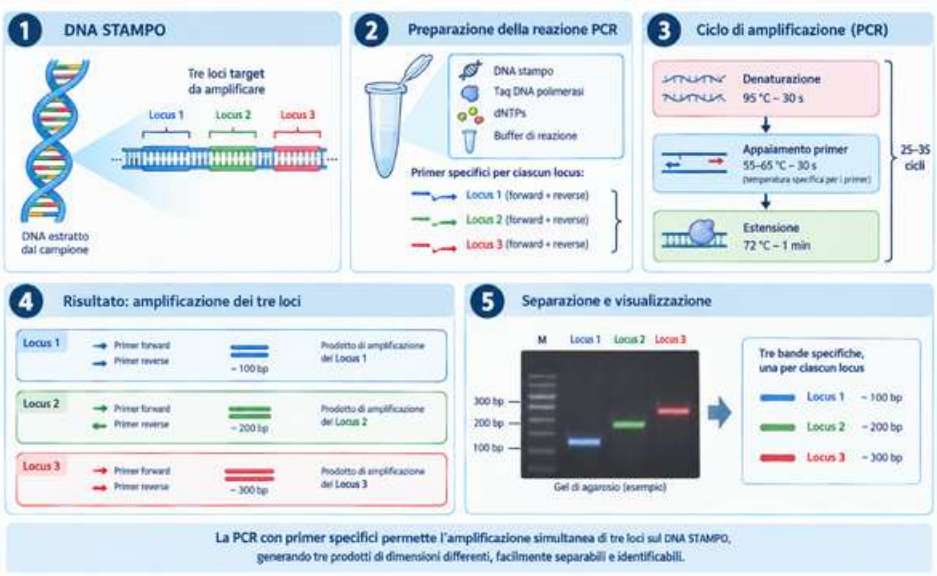
I fattori che influenzano maggiormente l'esito dell'amplificazione sono la quantità iniziale di DNA e l'indice di degradazione, caratteristiche che si riscontrano nella fase di quantificazione.
L'amplificazione è mirata alle regioni di DNA relative ai microsatelliti o STR (Short Tandem Repeats); in una PCR convenzionale, una coppia di primer specifici consente di amplificare una singola regione bersaglio del DNA; grazie alla Multiplex PCR si riesce ad amplificare in una singola corsa, molteplici copie di più sequenze bersaglio.

La co-amplificazione e la rilevazione di più loci è consentita dalla possibilità di distinguere i diversi ampliconi generati in base a due caratteristiche:

1) In base alla massa molecolare, difatti ampliconi con masse diverse sono distinti solamente in base alle loro masse e possono essere marcati con fluorocromi identici.

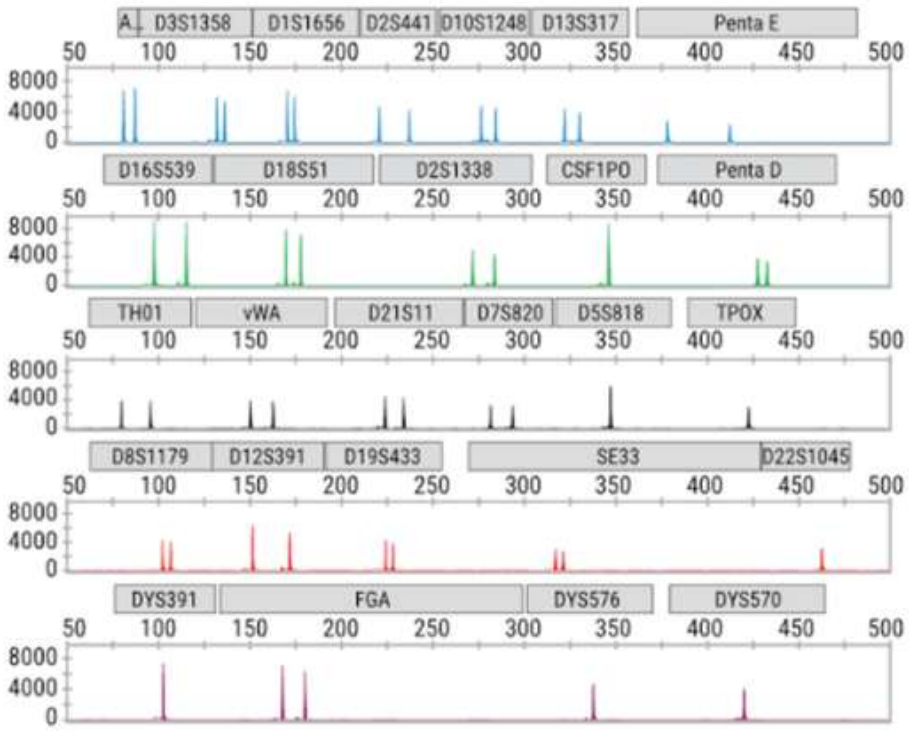
2) Sulla base di diversi marker, infatti ampliconi con masse molecolari simili sono marcati con diversi fluorocromi.

Figura 43: Amplificazione di tre loci sul DNA stampo



In questo modo è possibile amplificare simultaneamente microsatelliti di dimensioni sovrapponibili utilizzando marcatori diversi che poi saranno separati da opportuni filtri ottici. Dopo l'amplificazione avviene la separazione e la rilevazione degli ampliconi attraverso l'elettroforesi capillare. Nello studio delle tracce l'amplificazione e la tipizzazione dei marcatori STR autosomici sono state effettuate grazie al Kit Promega PowerPlex® Fusion 6C System che permette lo studio e l'analisi di 27 loci

Figura 44: i 27 loci della Promega Fusion 6c system



La preparazione della soluzione di amplificazione prevede:

- 2.5 µl di Master Mix
- 2.5 µl di Primer Pair Mix
- 7.5 µl di DNA (gli estratti vengono concentrati a 67 pg/µl/H2O per il controllo negativo/DNA a concentrazione nota fornito dal Kit per il controllo positivo.

In ciascun pozzetto di una piastra da PCR da 96 pozzetti sono stati depositati 5,0 µl di Mix preparata (2,5 µl di Master Mix + 2,5 µl di Primer Pair Mix), a cui sono stati aggiunti 7,5 µl di DNA (oppure H2O DNA-free per il controllo negativo o DNA a concentrazione nota per il controllo positivo, per un volume totale di 12,5 µl). Successivamente, la piastra è stata termo-sigillata e caricata all'interno del termociclatore Veriti Thermal Cycler (56).

Per i campioni repertati mediante tamponi microFLOQ è stata adottata una procedura di amplificazione diretta del DNA, senza effettuare le preventive fasi di estrazione e quantificazione. La testa campionante del tampone microFLOQ è stata introdotta direttamente nella miscela di amplificazione del kit Promega PowerPlex® Fusion 6C System, costituita da 2,5 µl di Master Mix, 2,5 µl di Primer Pair Mix e 7,5 µl di acqua DNA-free, per un volume finale di reazione pari a 12,5 µl.

Le reazioni sono state eseguite mediante il termociclatore Veriti Thermal Cycler, utilizzando lo stesso programma termico adottato per i campioni repertati mediante tamponi floccati Copan. Il programma prevedeva una fase iniziale a 96 °C per 1 minuto, seguita da 29 cicli costituiti da una fase a 96 °C per 5 secondi e una fase a 60 °C per 1 minuto. Al termine dei cicli era prevista una fase finale a 60 °C per 10 minuti, seguita dal mantenimento a 4 °C.

5.5.4 TIPIZZAZIONE: SEPARAZIONE E RILEVAZIONE

L'ultima fase si configura nella tipizzazione, cioè la separazione degli amplificati attraverso il meccanismo dell'elettroforesi capillare. Gli amplificati vengono separati in base alla loro dimensione e rilevati mediante marcatori fluorescenti legati ai primer, permettendo l'identificazione dei diversi alleli. Trattandosi di STRs, questi frammenti di DNA sono costituiti da un numero di unità ripetute: alleli diversi presentano diverse lunghezze degli ampliconi. L'elettroforesi capillare riesce a distinguere fra alleli che differiscono anche di una sola base, in un range che va da 90 a 500 bp.

I frammenti amplificati vengono trasportati da un campo elettrico attraverso un capillare in silice di circa 50 um di diametro e lunghezza variabile (36-50 cm), in cui i frammenti di dimensioni minori si muovono più velocemente dei frammenti di dimensione maggiore. I capillari contengono un polimero che funge da "setaccio molecolare" per le molecole di DNA e a livello delle due estremità del capillare si genera un potenziale elettrico che permette lo spostamento del DNA carico negativamente dal catodo all'anodo.

Lo spostamento del DNA è rilevato grazie ai fluorofori che quando vengono eccitati dal laser nei pressi della finestra di rilevazione, emettono fluorescenza. Una CCD camera gestita da computer rileva la luce fluorescente mentre i frammenti raggiungono l'estremità del capillare e la converte in un elettroferogramma, in cui i dati vengono visualizzati sotto forma di curve gaussiane, con area sottesa proporzionale all'intensità di segnale (RFU = Relative Fluorescence Units).

Un software in base al colore della luce e al tempo della migrazione attraverso il capillare determina quali alleli sono presenti in ciascun locus e l'intensità e la posizione di ciascuna emissione luminosa, visualizzata come picco sull'elettroferogramma, viene confrontata con misure standardizzate di dimensioni e quantità note che costituiscono un campione noto come scala che funge da riferimento (lo Standard interno).

In questa sperimentazione è stato utilizzato il tipizzatore 3500 XL Genetic Analyzer, un sistema a 24 capillari che consente di analizzare contemporaneamente 24 campioni. Ogni capillare è lungo 36 cm e contiene un polimero denaturante, detto "POP" (Performance Optimized Polymer), formato da dimetil-poliacrilammide e urea: questo permette di assicurare che tutti gli ampliconi corrano allo stesso modo tra le maglie del polimero durante la corsa elettroforetica. A ciascun campione viene inoltre aggiunta formammide deionizzata, un agente denaturante che favorisce il mantenimento degli ampliconi di DNA in forma a singolo filamento durante la preparazione per l'elettroforesi capillare. La determinazione delle dimensioni dei frammenti amplificati avviene invece mediante il confronto con uno standard interno di dimensionamento, costituito da frammenti di DNA di lunghezza nota.

Contemporaneamente ai campioni di interesse viene analizzato almeno un ladder allelico, costituito da una miscela di frammenti di DNA rappresentativi di alleli STR noti per ciascun locus incluso nel kit di amplificazione. Il ladder allelico viene utilizzato come riferimento per l'attribuzione degli alleli presenti nei campioni analizzati, mediante il confronto delle rispettive posizioni di migrazione elettroforetica.

Il protocollo per la preparazione dei campioni prevede la preparazione di una mix costituita da:

- 9,5 µl/campione di Hi-Di Formammide
- 0.5 µl/campione di DNA Size Standard WEN 500

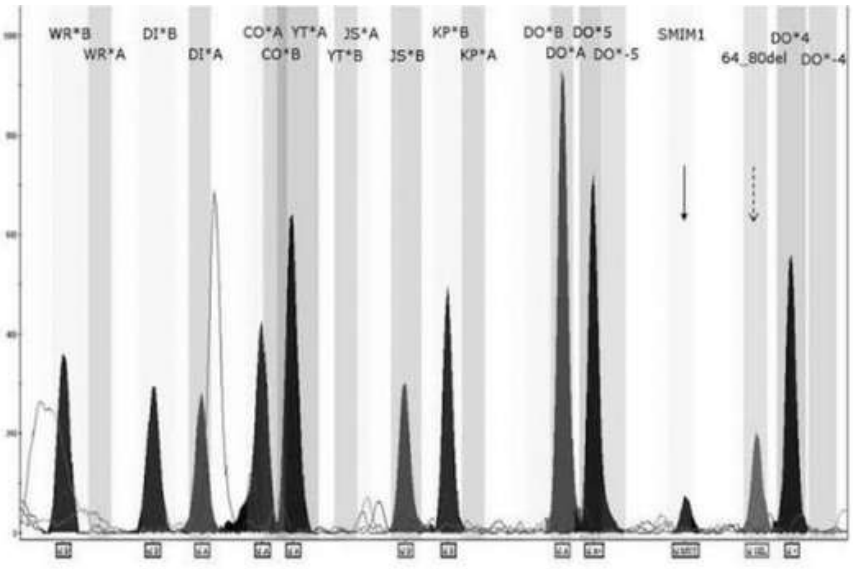
Dopo essere stata vortexata e centrifugata, la miscela viene dispensata in aliquote da 10 µl all'interno dei pozzetti di una piastra da 96 pozzetti, in numero corrispondente ai campioni da analizzare, inclusi i controlli di amplificazione e i due ladder allelici. A ciascun pozzetto viene successivamente aggiunto 1 µl di prodotto di amplificazione o di ladder allelico, ottenendo un volume finale di 11 µl, secondo il protocollo adottato per il kit Promega PowerPlex® Fusion 6C System.

Infine, la piastra è stata caricata all'interno del 3500XL Genetic Analyzer ed è stata avviata la corsa elettroforetica. I dati grezzi vengono confrontati con la scala di dimensionamento e i picchi (alleli) designati dal software GeneMapper ID-X v1,4 (57).

L'interpretazione degli elettroferogrammi è stata effettuata mediante il software GeneMapper ID-X v1,4, applicando una soglia analitica di 100 RFU (Relative Fluorescence Units) e una soglia stocastica di 210 RFU. La soglia analitica è stata utilizzata per distinguere i segnali allelici dal rumore di fondo, mentre la soglia stocastica è stata considerata nella valutazione dell'affidabilità dei profili genetici, in particolare per quanto riguarda il possibile fenomeno di allele drop-out. I profili ottenuti sono stati confrontati con i profili STR di riferimento dei rispettivi donatori, al fine di valutare la corrispondenza dei contributi genetici rilevati.

Gli elettroferogrammi possono essere visualizzati come grafico con un asse x e y. Le posizioni dei picchi sul grafico indicano quanto tempo ci mettono gli alleli a passare attraverso il capillare, e ciò inidca quindi la lunghezza dello specifico frammento di DNA

Figura 45: elettroferogramma tramite il software Gene mapper id X v1,4



6. SPERIMENTAZIONE

6.1 DEPOSITO SEBACEO DELL'IMPRONTA DI UNA MANO SU VETRO

In questa sperimentazione è stato utilizzato il vetro come substrato per il deposito palmare. In seguito, sono state scattate le foto con l'ausilio di una NIKON D810, utilizzando prima un obiettivo con distanza focale a 120 mm per evidenziare tutta la zona su cui poggia l'impronta e successivamente, in maniera più specifica, con l'ausilio di un obiettivo con distanza focale di 105 mm, le singole zone dell'impronta.

Una volta acquisite le riprese fotografiche (Foto 1), si è passati al campionamento dell'impronta attraverso l'utilizzo dei tamponi microFLOQ e tamponi floccati Copan. Nello specifico sono stati effettuati sei campionamenti, divisi in quattro microFLOQ e due tamponi floccati Copan.

Foto 1: Impronta palmare



Per la prima parte del campionamento sono stati utilizzati due tamponi microFLOQ per la zona tenare e due per quella ipotenare[8] della mano e successivamente anche il campionamento mediante due tamponi floccati Copan, uno per ogni zona, così da permettere successivamente il confronto delle risultanze a seguito dell'analisi della traccia biologica repertata.

I campionamenti effettuati tramite microFLOQ, a seguito delle procedure di analisi del DNA, hanno permesso di isolare il profilo del contributore nonostante la ridotta quantità della traccia biologica prelevata.

[8] La zona tenare e quella ipotenare sono due rilievi carnosi situati sul palmo della mano, che corrispondono rispettivamente alla base del pollice e alla base del mignolo.

I tamponi floccati Copan hanno permesso di estrapolare il profilo ma a differenza dei microFLOQ la quantità di materiale biologico prelevato è stata, come è ovvio supporre, decisamente maggiore perché questo tipo di campionamento ha reso possibile l'asportazione di buona parte dell'impronta (Appendice 1).

Tabella 1 – Risultati rappresentativi dell'esperimento 6.1

Confronto dei campionamenti effettuati su impronta palmare depositata su vetro. I dati sui loci si riferiscono esclusivamente ai due elettroferogrammi rappresentativi riportati nell'Appendice 1.

Tampone	N. campionamenti	Trattamento	Loci STR	Esito
microFLOQ	4	Nessun trattamento chimico	19	Profilo parziale riconducibile al donatore
floccato Copan	2	Nessun trattamento chimico	23	Profilo riconducibile al donatore

Soglia analitica: 100 RFU; soglia stocastica: 210 RFU.

Nota: i sei campionamenti effettuati non corrispondono ai sei elettroferogrammi riportati nella tesi; la tabella sintetizza i due esempi rappresentativi disponibili.

6.2 DEPOSITO DI IMPRONTE SEBACEE SU UNA PIASTRELLA IN CERAMICA

In questo esperimento è stata utilizzata come superficie target una piastrella in ceramica. Su quest'ultima sono state depositate delle impronte sebacee seguendo il seguente criterio: ogni 24 ore, per 3 giorni, sono state effettuate tre deplezioni[9] per ciascuna impronta. In seguito all'ultima deplezione al terzo giorno, sulla superficie interessata dalle impronte è stato depositato del sangue di maiale diluito con acqua al 50% effettuando un movimento (*swipe*)[10] tramite un tovagliolo intriso per l'appunto del predetto materiale ematico.

Dopo la completa essiccazione del sangue, le impronte sono state trattate con l'Amido Black[11]. Successivamente si è passati all'acquisizione fotografica (Foto 2) delle impronte utilizzando prima l'obiettivo da 120 mm e successivamente quello da 105mm.

Foto 2: Impronte di sangue dopo trattamento con AB



[9] Per deplezione si intende una sequenza di impronte ottenute mediante contatti successivi dello stesso dito con una superficie, senza ripristinare tra un contatto e l'altro il residuo papillare. Tale procedura determina una progressiva riduzione della quantità di materiale trasferito e consente di ottenere impronte caratterizzate da una diversa disponibilità di residuo biologico.

[10] Lo swipe in BPA è il trasferimento con contestuale movimento di una superficie imbrattata di sangue su una pulita, cosiddetto strofinio

[11] l'Amido Black è stato utilizzato dopo la normale procedura di fissazione per la componente eritrocitica e successivamente alla sua reazione è stato effettuato il lavaggio

L’esito dal punto di vista visivo è stato negativo in quanto non è stato possibile distinguere in maniera ottimale la presenza delle impronte e quelle leggermente visibili non esibivano dettagli sufficienti per l’analisi dattiloscopica.

Una possibile interpretazione di tale risultato è da ricondurre probabilmente alla diluizione del sangue che determina una riduzione della concentrazione delle componenti proteiche, rendendo meno efficace la reazione con l’Amido Black. Quest’ultimo in linea di principio può reagire anche con sangue diluito, legandosi alle proteine, in particolare all’albumina; tuttavia, una diluizione al 50% può ridurre notevolmente la quantità di proteine depositate nell’impronta, e questo può influire sulla qualità della visualizzazione.

Per quanto riguarda il campionamento, sono state selezionate soltanto alcune impronte, nello specifico la prima deplezione del primo e del terzo giorno. Per ogni impronta sono stati fatti i campionamenti nel seguente ordine: prima microFLOQ e successivamente tampone floccato Copan.

Per entrambe le tipologie di tampone, a seguito delle fasi di analisi del DNA, è stato possibile ricondurre gli elettroferogrammi al donatore, nonostante il trattamento delle deposizioni papillari con il reagente AB (Appendice 2).

Tabella 2 – Risultati rappresentativi dell’esperimento 6.2

Deposito di impronte sebacee su ceramica, sangue suino diluito al 50% e trattamento con Amido Black. Dati ricavati dagli elettroferogrammi rappresentativi dell’Appendice 2.

Tampone	Campione	Trattamento	Loci STR	Esito
microFLOQ	esperimento 2 C	Amido Black	25	Profilo riconducibile al donatore
microFLOQ	esperimento 2 D	Amido Black	25	Profilo riconducibile al donatore
floccato Copan	GP	Amido Black	24	Profilo riconducibile al donatore
floccato Copan	MP	Amido Black	10	Profilo parziale, con segnali deboli

Soglia analitica: 100 RFU; soglia stocastica: 210 RFU.

Nota: le sigle dei quattro profili sono quelle stampate sugli elettroferogrammi.

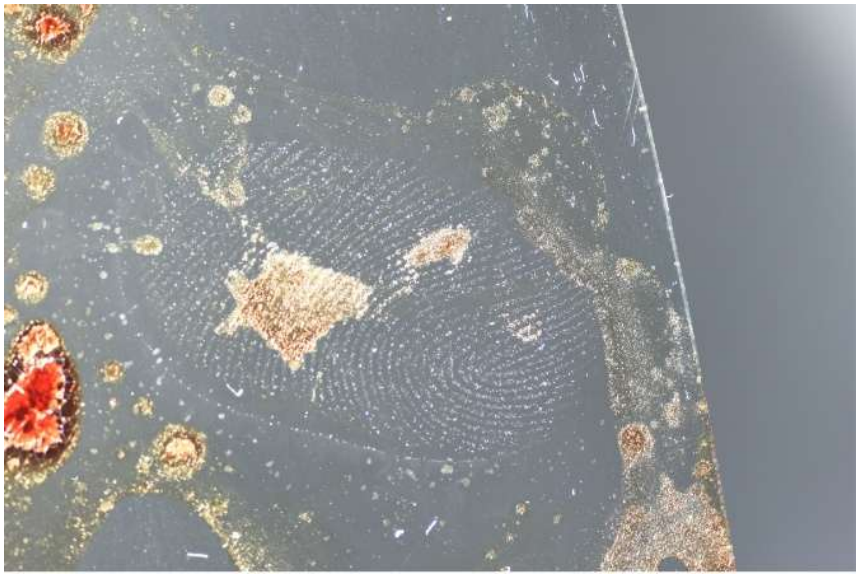
6.3 DEPOSITO PER ASPORTAZIONE DI IMPRONTE DI SANGUE SU VETRO

In questa sperimentazione è stato utilizzato il vetro come substrato per la deplezione delle impronte; queste ultime sono state depositate dopo aver fatto colare in una porzione laterale circa 3,5 ml di sangue di maiale diluito al 50% con acqua sterile, quindi su una superficie precedentemente interessata, almeno in parte, da sangue ancora allo stato fluido.

Sono state depositate cinque impronte di cinque diverse dita a distanza di 30 secondi l'una dall'altra.

Dopo 24 ore, una volta essiccato il sangue, sono state effettuate le riprese fotografiche (Foto 3) dei punti in cui è stata depositata ciascuna impronta.

Foto 3: impronte per asportazione di sangue











Successivamente all'acquisizione fotografica è stato effettuato il trattamento con Amido Black per verificare se i dettagli visibili precedentemente potessero essere ulteriormente esaltati (Foto 4).

Foto 4: impronte per asportazione di sangue, dopo il trattamento con Amido Black











L'utilizzo dell'Amido Black non ha permesso una migliore visibilità dei caratteri papillari delle impronte; la diluizione del sangue, anche in questo caso, non ne permette la completa reazione con la componente proteica[12].

Per quanto riguarda il campionamento è stata repertata soltanto la prima impronta, che era anche la migliore dal punto di vista dattiloscopico.

L'analisi genetica effettuata su entrambe le tipologie di tampone ha permesso di ottenere profili genetici parziali. Tale risultato potrebbe essere correlato alla limitata quantità di DNA recuperabile, alle caratteristiche della traccia e alle condizioni di campionamento (Appendice 3).

Tabella 3 – Risultati rappresentativi dell'esperimento 6.3

Deposito per asportazione di impronte di sangue su vetro, con sangue suino diluito al 50% e successivo trattamento con Amido Black. Risultati ricavati dagli elettroferogrammi dell'Appendice 3.

Tampone	Trattamento	Loci STR	Esito
floccato Copan	Amido Black (AB)	24 (preliminare)	Profilo riconducibile al donatore
microFLOQ	Amido Black (AB)	11 (preliminare)	Profilo genetico parziale

Soglia analitica: 100 RFU; soglia stocastica: 210 RFU.

[12] Stesso risultato dell'esperimento 6.2

6.4 DEPOSITO DI IMPRONTE SEBACEE E TRATTAMENTO CON SANGUE DILUITO SU UN RUBINETTO

La sperimentazione si è svolta sulla rubinetteria di un lavandino, reperto certamente non desueto nella scena di un possibile crimine, su cui sono state depositate quattro tipologie di impronte sebacee contaminate da sangue di maiale diluito al 50%.

1: l'impronta sebacea è stata depositata su una parte del rubinetto e successivamente è stato fatto colare il sangue diluito sull'impronta.

2: l'impronta è stata depositata sul rubinetto dopo aver fatto fluire il sangue diluito.

3: un'impronta di sangue (utilizzando sangue diluito al 50% con acqua) è stata depositata sulla superficie e poi è stato fatto colare del sangue diluito sulla stessa impronta.

4: due impronte di sangue diluito al 50% sono state depositate sulla superficie metallica del rubinetto senza ulteriore contaminazione.

Dopo 24 ore, prima del successivo trattamento, sono state effettuate le riprese fotografiche (Foto 5) sulle impronte usando in sequenza l'obiettivo da 120mm e quello da 105 mm:

Foto 5: impronte sebacee contaminate dal sangue



A seguire le risultanze facendo riferimento alla stessa numerazione sopra adottata:

1: L'impronta risultava visibile, e permetteva il riconoscimento di qualche dettaglio utile per un'analisi dattiloscopica (Foto 6). Il sangue diluito non ha colorato le creste a causa delle proprietà idrofobiche dell'impronta dovuta alle componenti lipidiche (grassi) e oleose che tendono a respingere i liquidi a base acquosa[13].

Foto 6: impronta sebacea contaminata da sangue



[13] Il sangue, anche se contiene cellule e proteine, è composto per la maggior parte da acqua; se è stato ulteriormente diluito al 50% la sua componente liquida è ancora più predominante. Di conseguenza, il liquido può non "bagnare" bene la zona coperta dal residuo grasso e può distribuirsi in modo diverso rispetto alla superficie circostante.

2: L’impronta risultava ben visibile, con le creste positive, e presentava ai margini una sorta di alone vuoto dovuto all’asportazione di materiale ematico durante la sua deposizione (Foto 7).

la spiegazione di questo fenomeno può essere attribuita a:

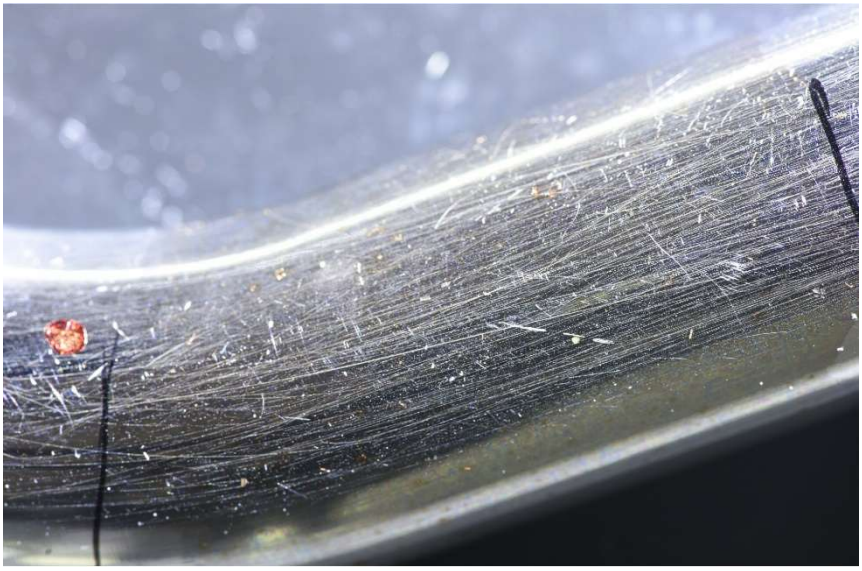
- l’effetto che scaturisce dalla pressione ovvero, quando l’oggetto che imprime la traccia entra in contatto con il sangue diluito, la pressione esercitata spinge il liquido lateralmente. Se la miscela è molto fluida (come nel caso di una diluizione del 50%), il sangue viene “espulso” dal punto di contatto e si accumula ai margini, lasciando una zona relativamente povera di materiale ematico immediatamente attorno all’area di pressione;
- presenza di contaminanti sull’impronta o sulla superficie impressa: se la superficie del dito era umida o contaminata da altre sostanze come acqua, polveri, grassi e detergenti, queste possono alterare l’adesione del sangue e creare una zona di repulsione o di diluizione ulteriore lungo il bordo dell’impronta.

Foto 7: impronta per asportazione di sangue



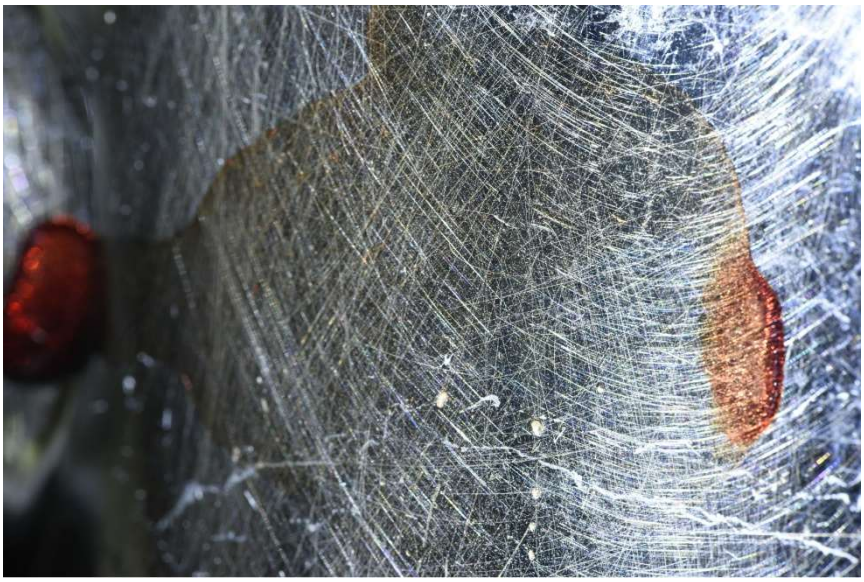
3: In questo caso l'impronta risultava completamente coperta dal sangue e non è stato possibile distinguere dettagli utili per un'analisi dattiloscopica (Foto 8). Molto probabilmente l'impronta contaminata con sangue diluito al 50% non risultava sufficientemente carica di materiale biologico anche perché non vi è sostanziale differenza tra materiale deposto con l'impronta e quello successivamente versato sulla stessa superficie.

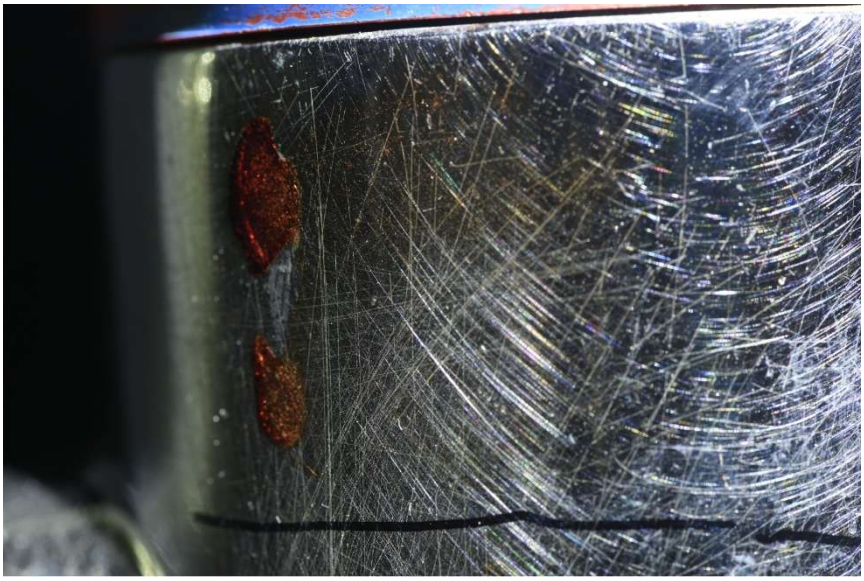
Foto 8: Impronta di sangue diluito contaminata da sangue diluito



4: La deposizione delle impronte di sangue diluito senza ulteriore contaminazione non ha permesso nessun dettaglio utile per una successiva analisi dattiloscopica (Foto 9).

Foto 9: impronta di sangue



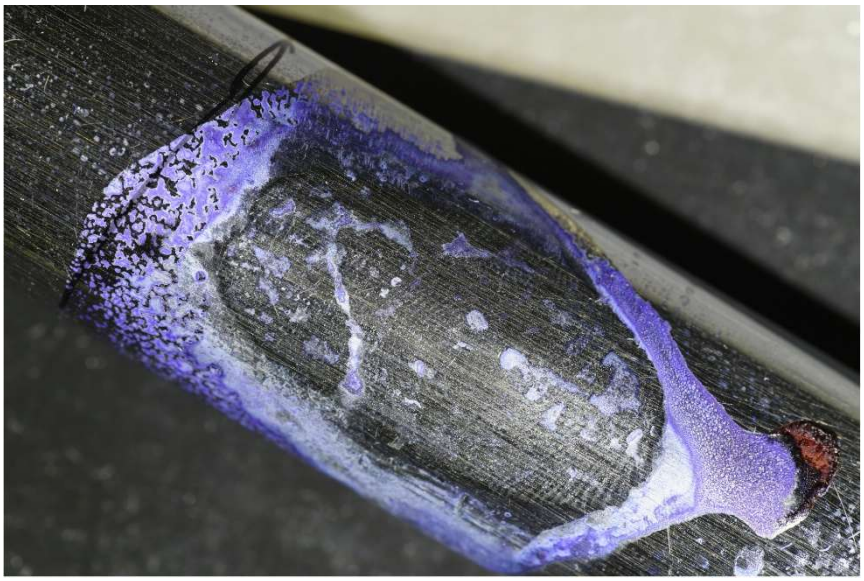


Una volta effettuate le riprese fotografiche è stato utilizzato, come reagente per il successivo trattamento, il Leuco Crystal Violet (LCV), in quanto possiede la capacità di reagire con il gruppo perossidasico dell'eme.

Come sempre faremo riferimento alle numerazioni utilizzate per chiarire le risultanze sul singolo esperimento.

1: in questo caso non ha portato cambiamenti significativi all'impronta, reagendo principalmente con il residuo di sangue all'esterno (Foto 10).

Foto 10: impronta sebacea contaminata dal sangue diluito, dopo trattamento con LCV



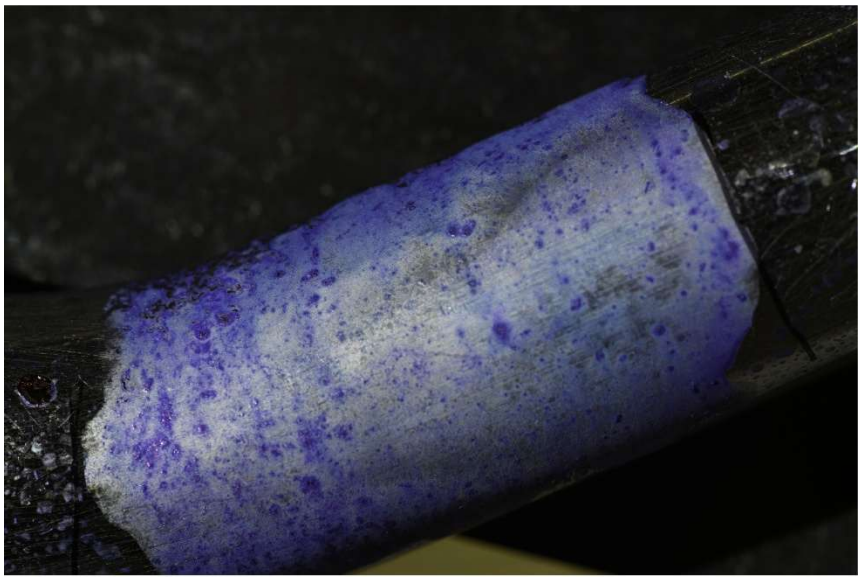
2: In questo caso il Leuco Crystal Violet ha colorato l'impronta di viola/blu; nello specifico ha reagito unicamente con le creste e il residuo di sangue all'esterno, evidenziando ulteriormente l'alone di vuoto che si era formato intorno ad essa (Foto 11).

Foto 11: impronta per asportazione di sangue dopo trattamento con LCV



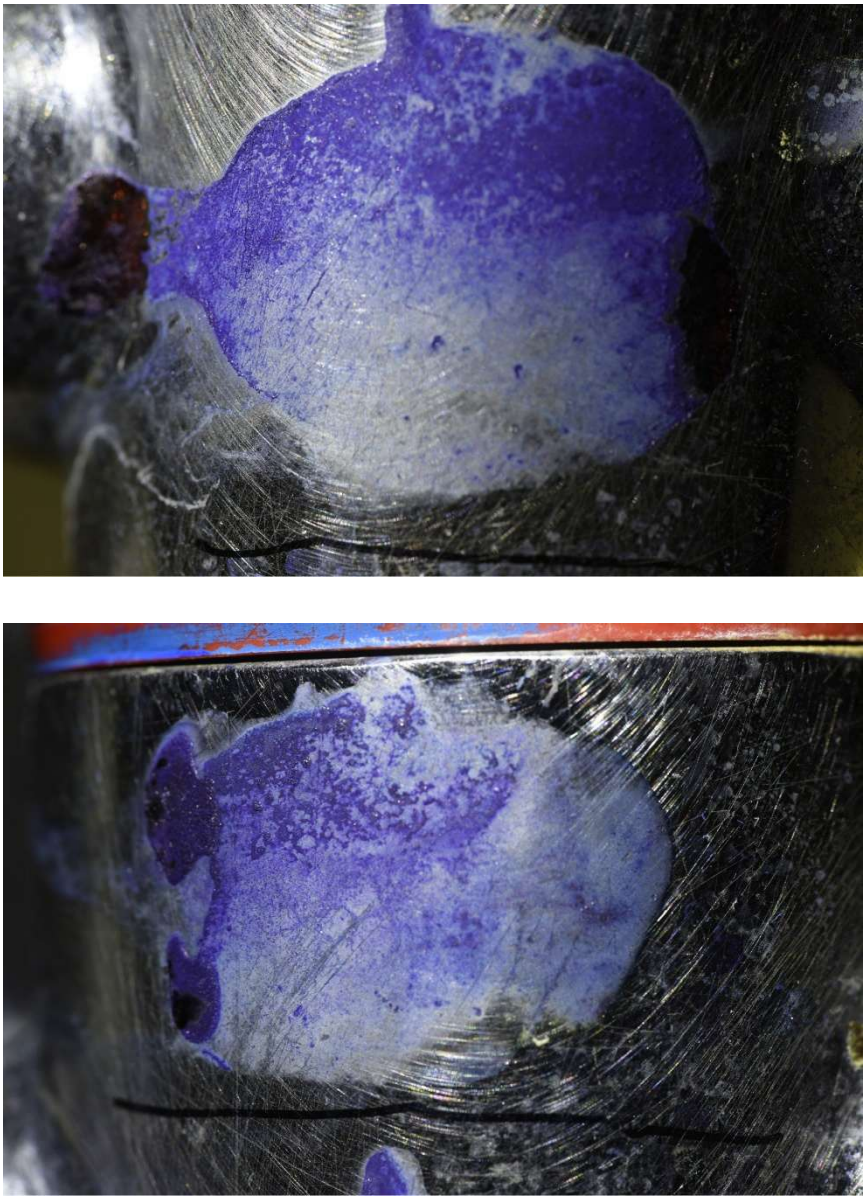
3: La reazione del Leuco Crystal Violet è risultata troppo marcata colorando pressoché uniformemente la superficie trattata sulla quale non erano comunque già state individuate creste papillari utili (Foto 12).

Foto 12: impronta di sangue contaminata da sangue diluito dopo trattamento con LCV



4: Analogamente alla terza impronta, anche in questo caso la reazione del Leuco Crystal Violet è stata troppo marcata (Foto 13).

Foto 13: impronta di sangue dopo trattamento con LCV



Per ogni impronta è stato fatto il campionamento tramite microFLOQ e tampone floccato Copan.

L'analisi del DNA a seguito dei campionamenti effettuati mediante i tamponi microFLOQ non ha permesso di ottenere profili genetici utili. Tale risultato potrebbe essere riconducibile alla ridotta quantità di DNA umano presente nelle impronte e alle difficoltà di recupero del materiale biologico dalla superficie, eventualmente influenzate dalla presenza della contaminazione ematica e dalle condizioni di campionamento.

I tamponi floccati Copan al contrario hanno consentito di raccogliere per le prime due tipologie di impronte materiale biologico sufficiente ad ottenere un profilo genetico utile, sebbene non qualitativamente pregevole. In questo caso è molto probabile che la maggior quantità di materiale biologico prelevato si sia rivelato più vantaggioso ai fini analitici (Appendice 4).

Tabella 4 – Risultati rappresentativi dell'esperimento 6.4

Deposizione di impronte su rubinetto metallico, contaminazione con sangue diluito al 50% e trattamento con Leuco Crystal Violet (LCV). Risultati ricavati dagli elettroferogrammi dell'Appendice 4

Tampone	Campione	Trattamento	Loci STR	Esito
floccato Copan	Impronta successivamente contaminata con sangue	LCV	18	Profilo parziale riconducibile al donatore
microFLOQ	Impronta successivamente contaminata con sangue	LCV	1	Profilo non utile
floccato Copan	Impronta per asportazione	LCV	13	Profilo parziale
microFLOQ	Impronta per asportazione	LCV	0	Profilo non utile
floccato Copan	Impronta di sangue ulteriormente contaminata	LCV	0	Profilo non utile
microFLOQ	Impronta di sangue ulteriormente contaminata	LCV	0	Profilo non utile
floccato Copan	Impronta di sangue senza ulteriore contaminazione	LCV	0	Profilo non utile
microFLOQ	Impronta di sangue senza ulteriore contaminazione	LCV	0	Profilo non utile

Soglia analitica:100 RFU; soglia stocastica: 210 RFU.

I risultati sono distinti in base alla modalità di deposizione e alla tipologia di tampone. Il conteggio dei loci si riferisce ai tracciati riportati nell'Appendice 4.

6.5 DEPOSITO DELL'IMPRONTA DI UNA MANO SU UNO SPECCHIO

La sperimentazione si è svolta su due specchi accostati su cui prima del deposito dell'impronta è stato fatto colare del sangue di maiale diluito al 40% con acqua, nell'intento di limitare la diluizione del sangue rispetto ai precedenti esperimenti e valutare eventuali discostamenti rispetto alle precedenti risultanze.

Dopo 24 ore, rispetto alla deposizione del sangue sulla superficie e prima del successivo trattamento con AB e LCV, le impronte sono state fotografate (Foto 14) usando l'obiettivo a 120mm e quello a 105 mm:

Foto 14: Impronta di una mano depositata per asportazione



Successivamente all'acquisizione fotografica, l'impronta è stata esaltata per metà con l'utilizzo del Leuco Crystal Violet e per metà con l'Amido Black (Foto 15).

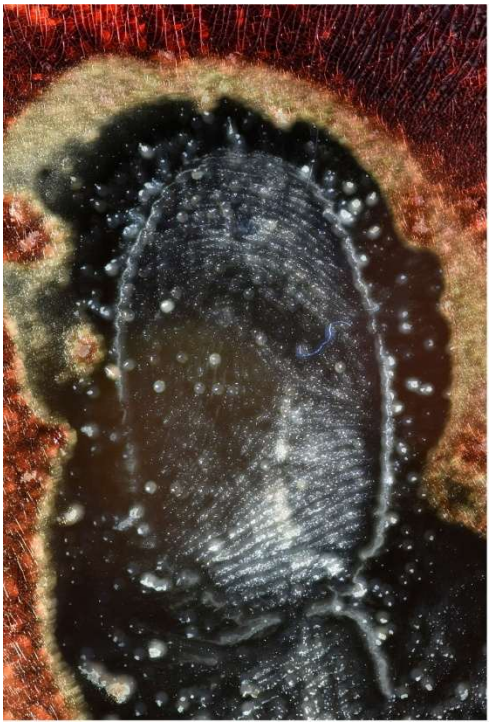
Foto 15: Impronta di una mano depositata per asportazione, trattata con LCV e AB



Foto 16: Impronta di una mano depositata per asportazione, trattata con LCV



Foto 17: Impronta di una mano depositata per asportazione



- L‘impronta non mostra le creste invertite nonostante il deposito per asportazione di sangue (Foto 17).
- Come negli esperimenti precedenti[14] si nota l’alone di vuoto intorno all’impronta (Foto 16, Foto 17).
- Il trattamento con LCV mette in risalto alcuni dettagli, ma ne peggiora alcuni che erano precedentemente visibili (Foto 16).



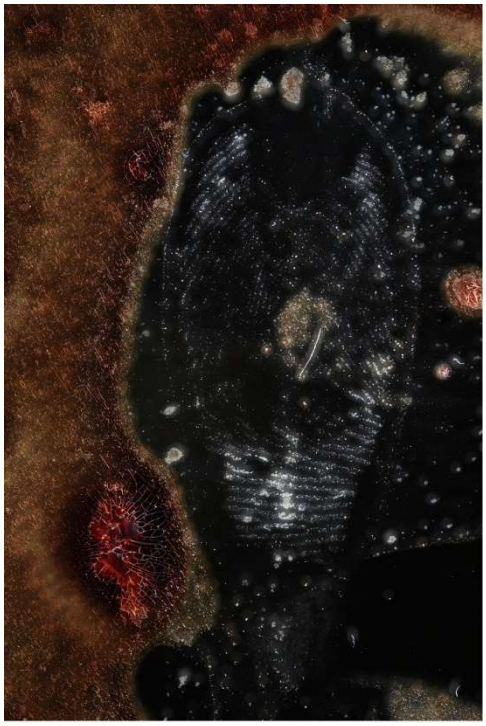


[14] 6.3 e 6.4

Foto 18: Impronta di una mano depositata per asportazione, trattata con AB



Foto 19: Impronta di una mano depositata per asportazione



- Differentemente dal Leuco Crystal Violet, L'Amido Black non è riuscito ad esaltare l'impronta (Foto 19).
- È probabile che a causa del fenomeno dell'emodiluizione, la reazione tra l'Amido Black e la componente proteica sia compromessa.





Per ogni impronta, mostrata precedentemente, è stato fatto il campionamento tramite microFLOQ e tampone floccato Copan, dopo il trattamento con il rispettivo reagente.

L'esito dei risultati sui campioni prelevati tramite microFLOQ non ha permesso di ottenere alcun profilo utile.

Risultato analogo anche per i campionamenti effettuati tramite tampone floccato Copan (Appendice 5).

Tabella 5 – Risultati rappresentativi dell'esperimento 6.5

Deposizione di un'impronta palmare su specchio, precedentemente interessato da sangue di maiale diluito al 40%, e trattamenti con Leuco Crystal Violet (LCV) e Amido Black (AB). Risultati ricavati dagli elettroferogrammi dell'Appendice 5.

Tampone	Campione	Trattamento	Loci STR	Esito
floccato Copan	Copan 2	LCV	1	Profilo non utile
floccato Copan	Copan 4	LCV	0	Profilo non utile
floccato Copan	Copan 3	AB	0	Profilo non utile
floccato Copan	Copan 6	AB	0	Profilo non utile
microFLOQ	microFLOQ 2.0 VS	LCV	0	Profilo non utile
microFLOQ	microFLOQ 2.1 VS	LCV	0	Profilo non utile
microFLOQ	microFLOQ 3	AB	0	Profilo non utile
microFLOQ	microFLOQ 3.1	AB	0	Profilo non utile

Soglia analitica: 100 RFU; soglia stocastica: 210 RFU.

Substrato: specchio. I risultati sono riportati separatamente per ciascun campione, secondo le denominazioni utilizzate negli elettroferogrammi.

6.6 DEPOSITO DI IMPRONTE SEBACEE SU ACCIAIO BIANCO

La sperimentazione si è svolta su una sbarra di acciaio bianco, sulla quale sono state realizzate sei impronte secondo tre differenti modalità di deposizione. Per ciascuna modalità sono state effettuate due prove, una utilizzando sangue umano intero e una utilizzando sangue umano diluito al 50%.

1. È stato fatto colare il sangue sulla sbarra e successivamente sono state depositate le impronte (asportazione).
2. Sono state depositate le impronte e successivamente sono state contaminate, mediante colatura, dal sangue.
3. Sono state depositate delle "vere impronte di sangue", intendendo con tale espressione impronte ottenute mediante il contatto diretto con la superficie di un dito precedentemente contaminato con sangue. Nello specifico, il dito del donatore A veniva contaminato con sangue umano proveniente dal donatore B, prima di procedere alla deposizione dell'impronta, avendo cura di effettuare una deplezione per le impronte con sangue intero e una per quelle con sangue diluito al 50%.

Dopo 24 ore dalla deposizione del sangue sul substrato le impronte sono state fotografate (Foto 20) usando l'obiettivo a 105 mm:

Foto 20: impronte trattate con sangue intero e sangue



Osservazioni sulle prime due impronte dell'esperimento

- Sono entrambe impronte depositate per asportazione di sangue.
- L'impronta con il sangue intero presenta "l'alone di vuoto" intorno ad essa meno marcato rispetto a quella con il sangue diluito.

- In entrambe le impronte le creste risultano invertite (Foto 21, Foto 22).

Foto 21: Impronta depositata per asportazione con sangue intero

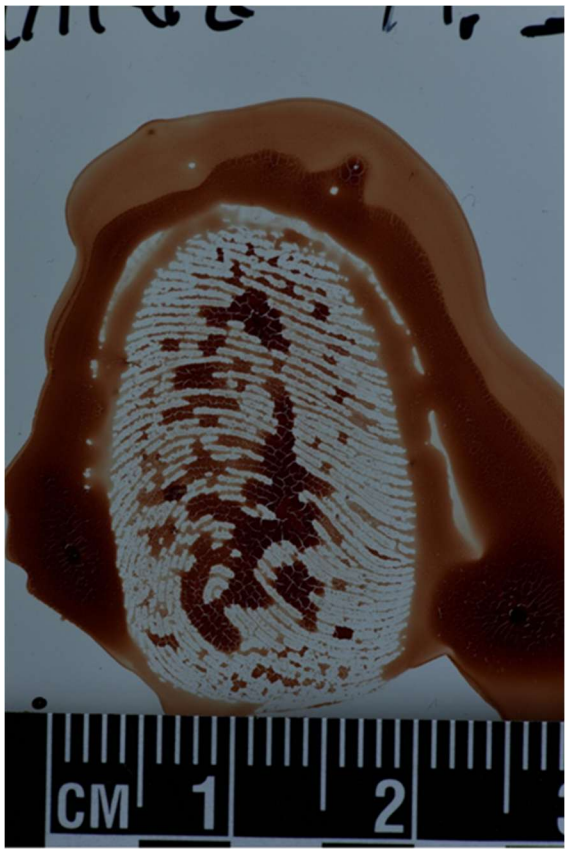
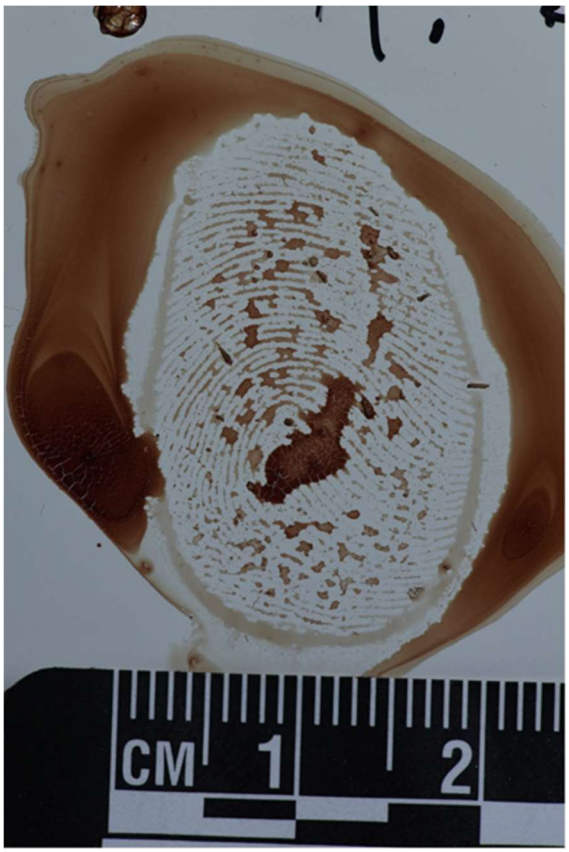


Foto 22: Impronta depositata per asportazione con sangue diluito



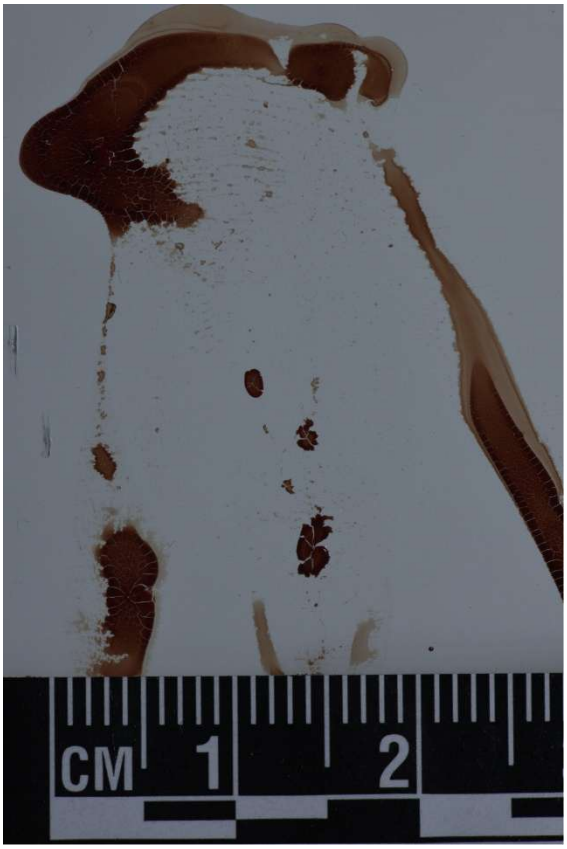
Osservazioni sulla terza e quarta impronta dell'esperimento

- Le impronte sono state prima depositate e successivamente contaminate, mediante colatura, con il sangue intero e diluito.
- Entrambe mostrano pochi dettagli dal punto di vista dattiloscopico, con l'impronta di sangue intero leggermente più colorata.
- In questo caso la scarsa quantità di sangue che è riuscita a colorare le impronte si è depositata in corrispondenza dei solchi (Foto 23, Foto 24).

Foto 23: Impronta sebacea depositata e successivamente contaminata da sangue intero



Foto 24: Impronta sebacea depositata e successivamente contaminata da sangue diluito



Osservazioni sulle ultime impronte

- Sono “vere” impronte di sangue.
- L’ impronta di sangue intero (Foto 25) mostra più chiaramente i dettagli delle creste rispetto all’impronta di sangue diluito (Foto 26), poiché non è soggetta alla riduzione della concentrazione delle componenti ematiche dovuta alla diluizione.
- Le creste dell’impronta di sangue intero risultano in alcuni punti invertite; l’inversione delle creste può essere attribuibile all’eccessiva pressione applicata durante il deposito o alla scarsa quantità di sangue presente sull’impronta che rimane “intrappolato” unicamente nei solchi.

Foto 25: Seconda deplezione di una “vera” impronta di sangue intero

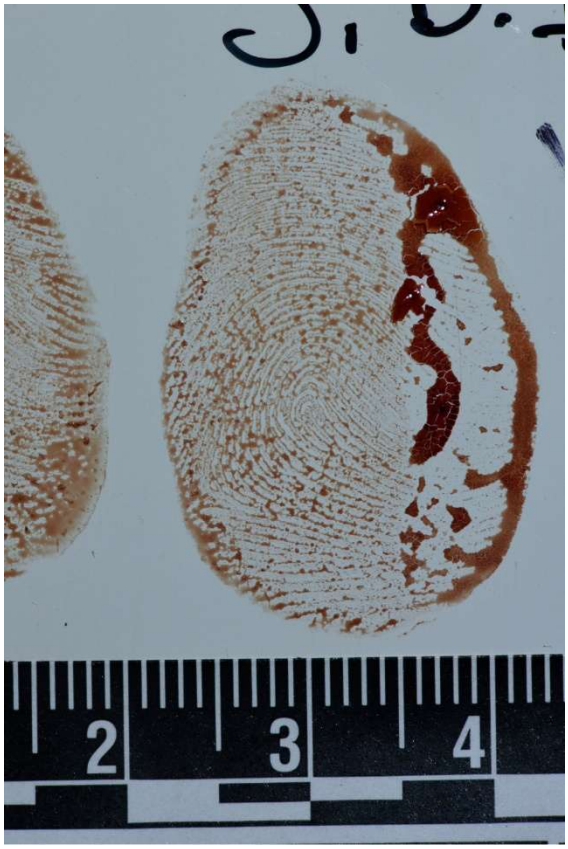


Foto 26: Seconda deplezione di una “vera” impronta di sangue diluito

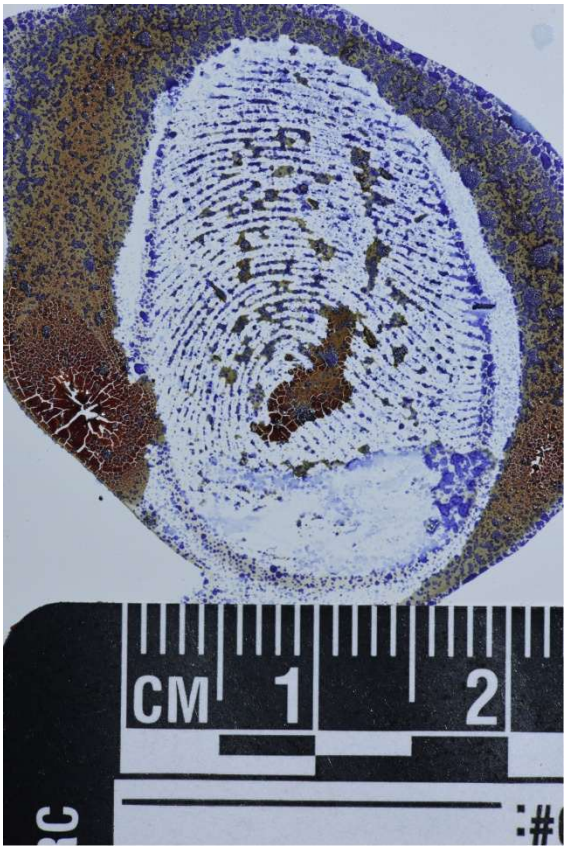


Proseguendo l'esperimento è stato utilizzato come reagente per il successivo trattamento il Leuco Crystal Violet (Foto 27, Foto 28, Foto 29, Foto 30, Foto 31, Foto 32).

Foto 27: Impronta depositata per asportazione con sangue intero, dopo LCV



Foto 28: Impronta depositata per asportazione con sangue diluito, dopo LCV



- Le impronte trattate con il Leuco Crystal Violet mostrano un buon risultato dal punto di vista dattiloscopico. Tuttavia, quando vi è un'eccessiva quantità di sangue, la reazione del Leuco Crystal Violet tende a coprire alcuni dettagli papillari utili all'analisi dattiloscopica.

Foto 29: Impronta sebacea depositata e successivamente contaminata da sangue intero, dopo LCV



Foto 30: Impronta sebacea depositata e successivamente contaminata da sangue diluito, dopo LCV

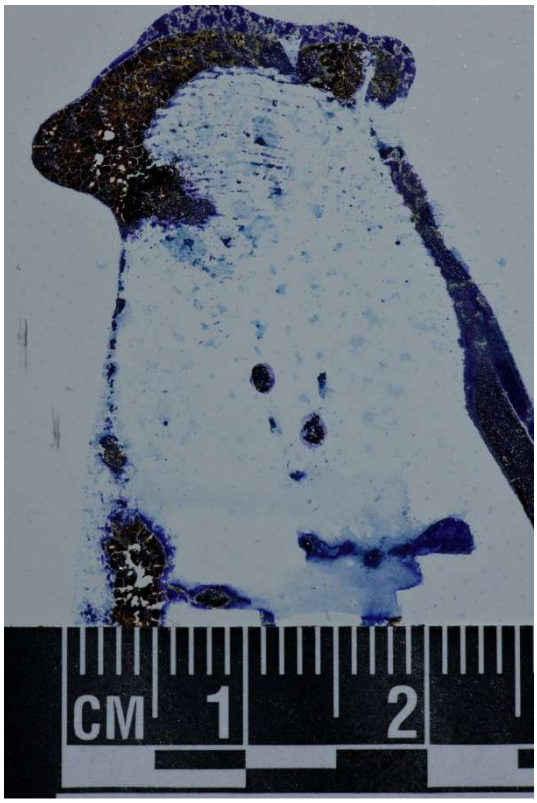


Foto 31: Seconda deplezione di una "vera" impronta di sangue, dopo LCV

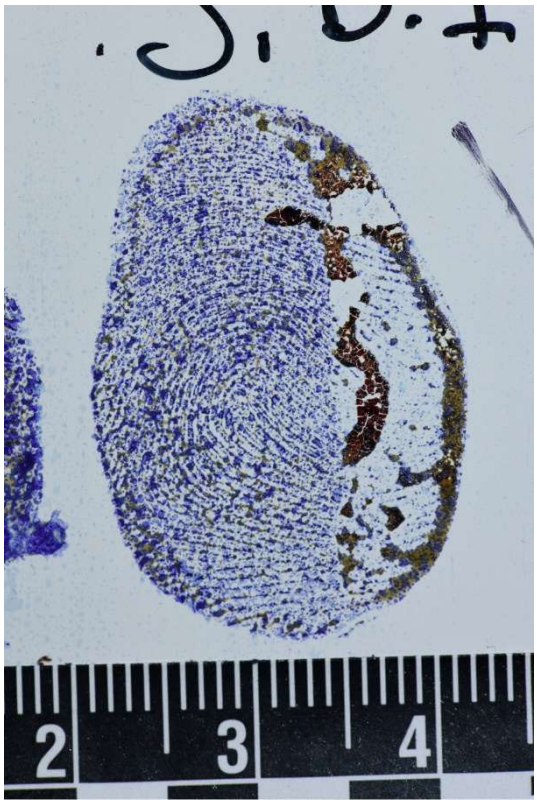
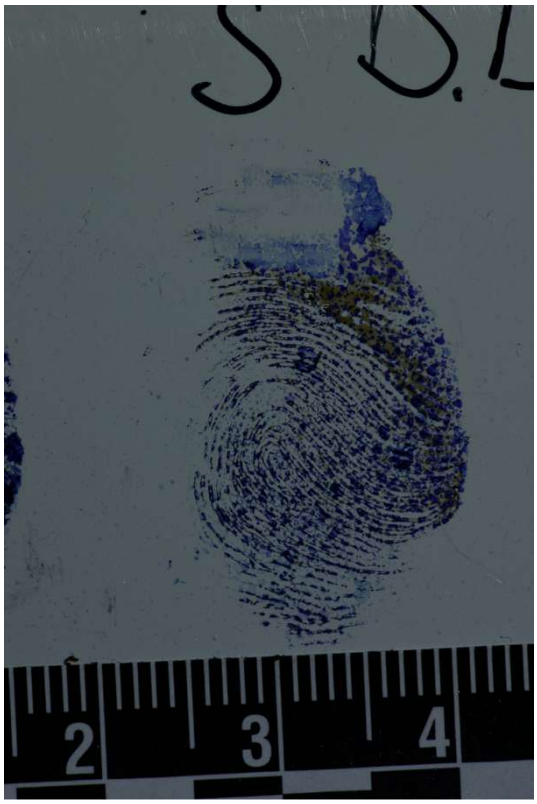


Foto 32: Seconda deplezione di una "vera" impronta di sangue diluito, dopo LCV



Per il campionamento, in questo esperimento, sono state considerate solamente le impronte di sangue diluito.

Il campionamento è stato effettuato prima del trattamento con Leuco Crystal Violet tramite microFLOQ[15], e dopo il trattamento con LCV tramite tampone floccato Copan e microFLOQ.

A seguito delle procedure di analisi del DNA si è riscontrato che (Appendice 6):

- Sulle impronte campionate tramite microFLOQ prima del trattamento con LCV, è stato possibile identificare il profilo del donatore del sangue, in alcuni casi in miscela con il profilo del donatore dell'impronta;
- Sulle impronte per asportazione campionate tramite tampone floccato Copan dopo trattamento con LCV, è stato possibile estrapolare il profilo del donatore dell'impronta, sebbene parziale, oltre ovviamente al profilo del donatore del sangue.
- Sulle impronte campionate tramite microFLOQ dopo il trattamento con LCV, è stato possibile riscontrare un profilo misto soltanto nel caso dell'impronta depositata per asportazione. Nelle altre impronte si riscontra soltanto il profilo del donatore del sangue.

[15] Il campionamento mediante tampone floccato Copan è stato effettuato solamente dopo il trattamento con il Leuco Crystal Violet per evitare di alterare ulteriormente l'impronta prelevando una quantità eccessiva di materiale biologico

Tabella 6 – Risultati rappresentativi dell'esperimento 6.6

Substrato: acciaio bianco. Trattamento chimico: Leuco Crystal Violet (LCV). Risultati ricavati dagli elettroferogrammi dell'Appendice 6.

Tampone	Campione	Trattamento	Loci STR	Esito
microFLOQ	Per asportazione di sangue diluito al 50%	Prima dell'LCV	26	Profilo riconducibile al donatore del sangue
microFLOQ	Impronta contaminata con sangue diluito al 50%	Prima dell'LCV	25	Profilo riconducibile al donatore del sangue
microFLOQ	Impronta di sangue intero	Prima dell'LCV	21	Profilo riconducibile al donatore del sangue
microFLOQ	Impronta di sangue diluito al 50%	Prima dell'LCV	26	Profilo riconducibile al donatore del sangue
microFLOQ	Per asportazione di sangue diluito al 50%	Dopo LCV	26	Profilo misto: entrambi i donatori identificati
microFLOQ	Impronta contaminata con sangue diluito al 50%	Dopo LCV	8	Profilo parziale
microFLOQ	Impronta di sangue diluito al 50%	Dopo LCV	25	Profilo riconducibile al donatore del sangue
floccato Copan	Per asportazione di sangue diluito al 50%	Dopo LCV	26	Profilo misto: entrambi i donatori identificati
floccato Copan	Impronta contaminata con sangue diluito al 50%	Dopo LCV	26	Profilo riconducibile al donatore del sangue
floccato Copan	Impronta di sangue intero	Dopo LCV	26	Profilo riconducibile al donatore del sangue
floccato Copan	Impronta di sangue diluito al 50%	Dopo LCV	26	Profilo riconducibile al donatore del sangue

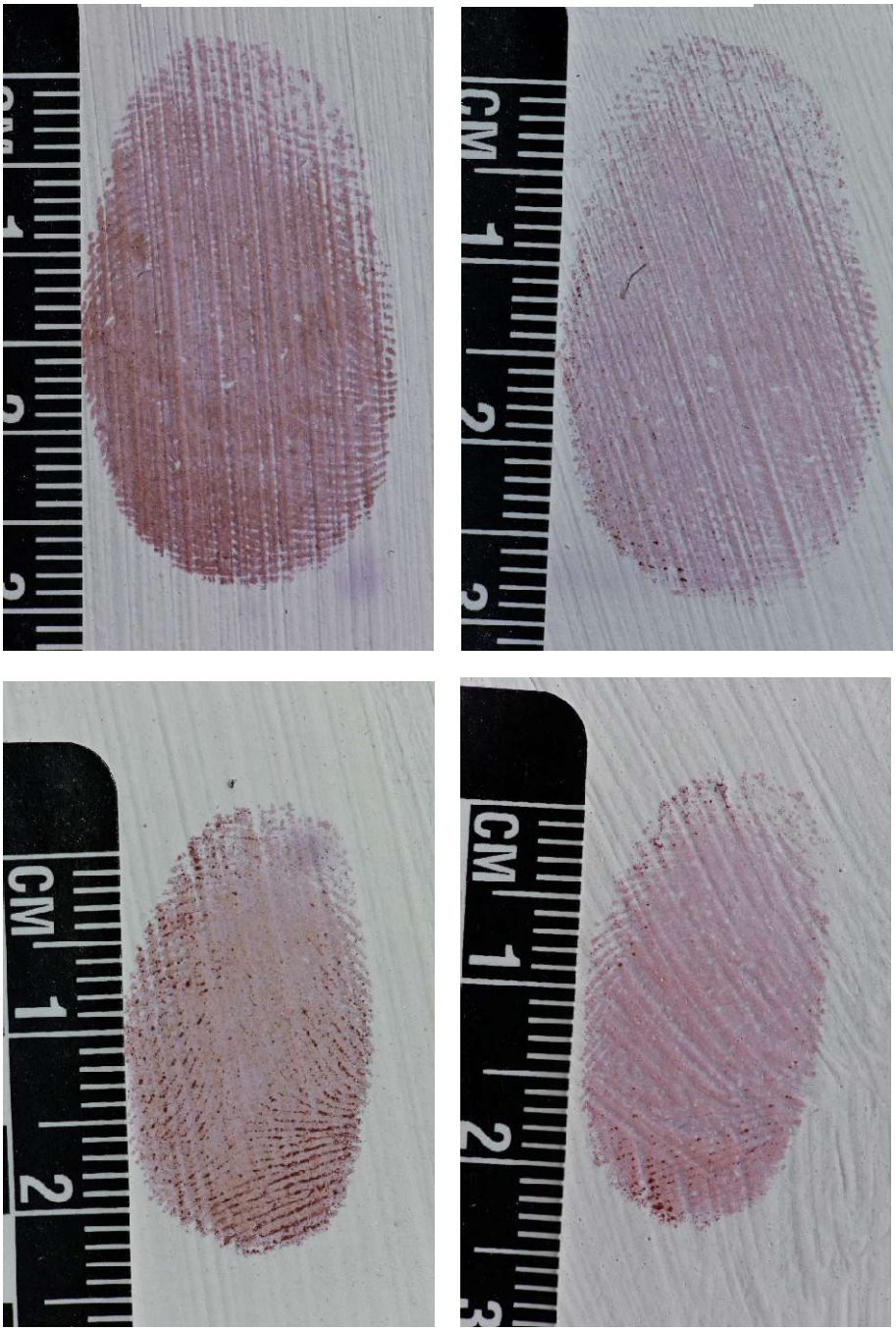
Soglia analitica: 100 RFU; soglia stocastica: 210 RFU.

6.7 DEPOSITO DI IMPRONTE SEBACEE SU CARTONGESSO

Questa sperimentazione si è svolta su un pannello di cartongesso, sul quale sono state depositate cinque impronte sebacee, avendo cura di effettuare una deplezione per ciascuna impronta, e successivamente esaltate con la Ninidrina.

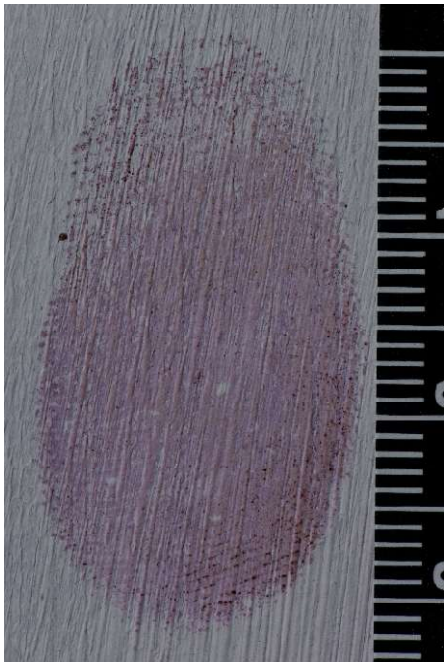
Trascorsi 12 giorni dal trattamento con ninidrina, sono state effettuate le riprese fotografiche (Foto 33) delle impronte esaltate, utilizzando un obiettivo da 105 mm.

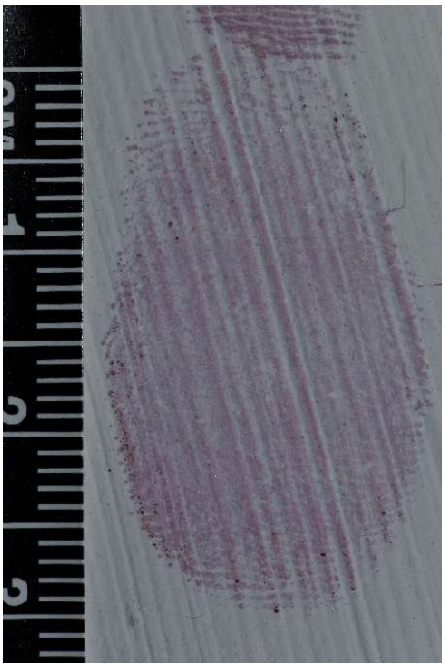
Foto 33: impronte sebacee esaltate con la Ninidrina















Le impronte, successivamente al trattamento con la Ninidrina, hanno permesso il riconoscimento di dettagli papillari utili dal punto di vista dattiloscopico, evidenziando distintamente sia le creste sia i solchi dell'impronta.

I campionamenti, effettuati mediante microFLOQ e tampone floccato Copan, non hanno permesso di estrapolare alcun profilo utile. L'assenza di profili genetici utili potrebbe essere riconducibile alla ridotta quantità di materiale biologico recuperabile e alle caratteristiche del substrato poroso. Non è inoltre possibile escludere un eventuale effetto del trattamento con ninidrina.

È molto probabile che la reazione con la Ninidrina abbia influenzato la degradazione della già limitata traccia biologica (Appendice 7).

Tabella 7 – Risultati rappresentativi dell'esperimento 6.7

Substrato: cartongesso. Trattamento chimico: ninidrina. Tipologia di traccia: impronte sebacee. Risultati ricavati dagli elettroferogrammi dell'Appendice 7.

Tampone	Campione	Trattamento	Loci STR	Esito
floccato Copan	Copan 4	Dopo ninidrina	0	Profilo non utile
floccato Copan	Copan 5	Dopo ninidrina	0	Profilo non utile
floccato Copan	Copan 6	Dopo ninidrina	0	Profilo non utile
floccato Copan	Copan 7	Dopo ninidrina	0	Profilo non utile
microFLOQ	Floq 7	Dopo ninidrina	0	Profilo non utile
microFLOQ	Floq 8	Dopo ninidrina	0	Profilo non utile
microFLOQ	Floq 9	Dopo ninidrina	0	Profilo non utile
microFLOQ	Floq 10	Dopo ninidrina	0	Profilo non utile

Soglia analitica: 100 RFU; soglia stocastica: 210 RFU.

6.8 DEPOSITO DI IMPRONTE DI SANGUE DILUITO SU UN RUBINETTO

La sperimentazione che per certi aspetti si presenta analoga al quarto esperimento[16], è stata svolta sulla rubinetteria di un lavandino, sulla quale sono state depositate delle "vere impronte di sangue" umano diluito al 50%. Come precedentemente descritto, tali impronte sono state ottenute contaminando preventivamente il dito del donatore A con il sangue del donatore B e procedendo successivamente alla deposizione sulla superficie. Sono state effettuate tre deplezioni per ciascuna impronta (Foto 34).

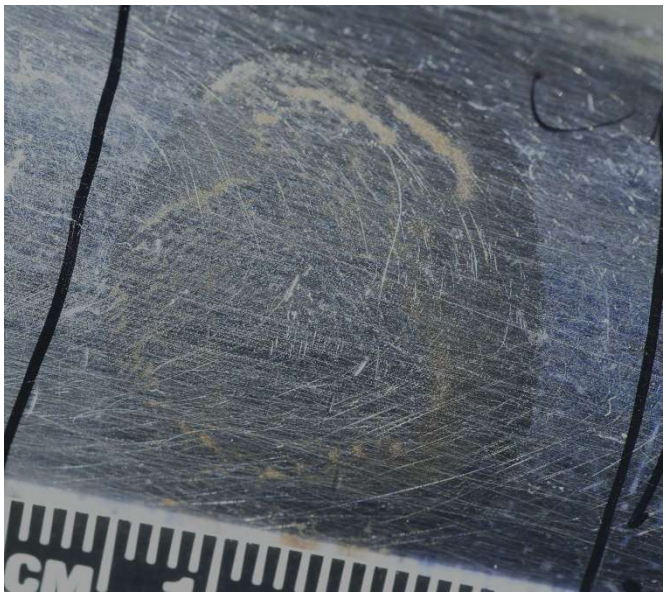
Foto 34: Impronte di sangue diluito

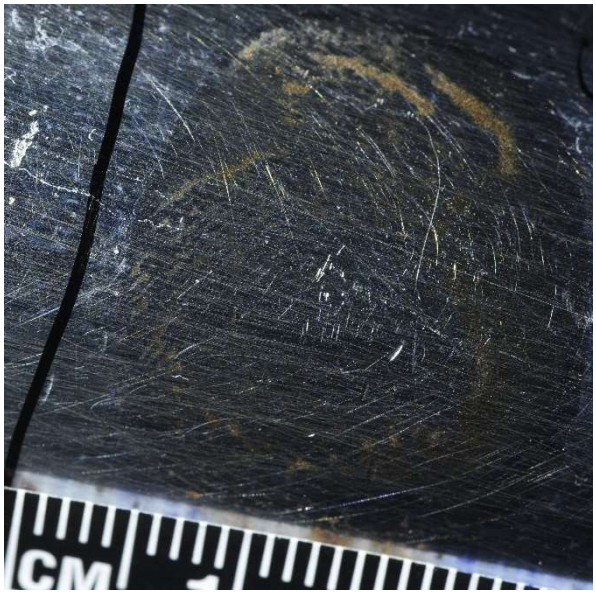


[16] 6.4

Successivamente al deposito delle impronte, 72 ore dopo, sono state effettuate le riprese fotografiche delle impronte (Foto 35, Foto 36).

Foto 35: Le tre deplezioni della prima impronta di sangue





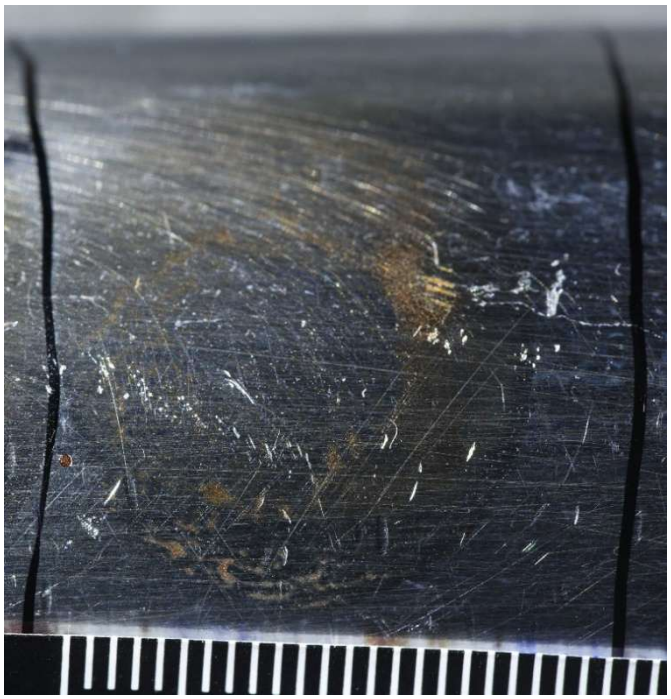


Foto 36: Le tre deplezioni della seconda impronta di sangue







L’esperimento è proseguito utilizzando il Leuco Crystal Violet, prestando particolare attenzione a non esagerare nel sovraccaricare troppo le impronte e le rispettive deplezioni (Foto 37, Foto 38).

Foto 37: Le tre deplezioni della prima impronta successivamente al trattamento con LCV

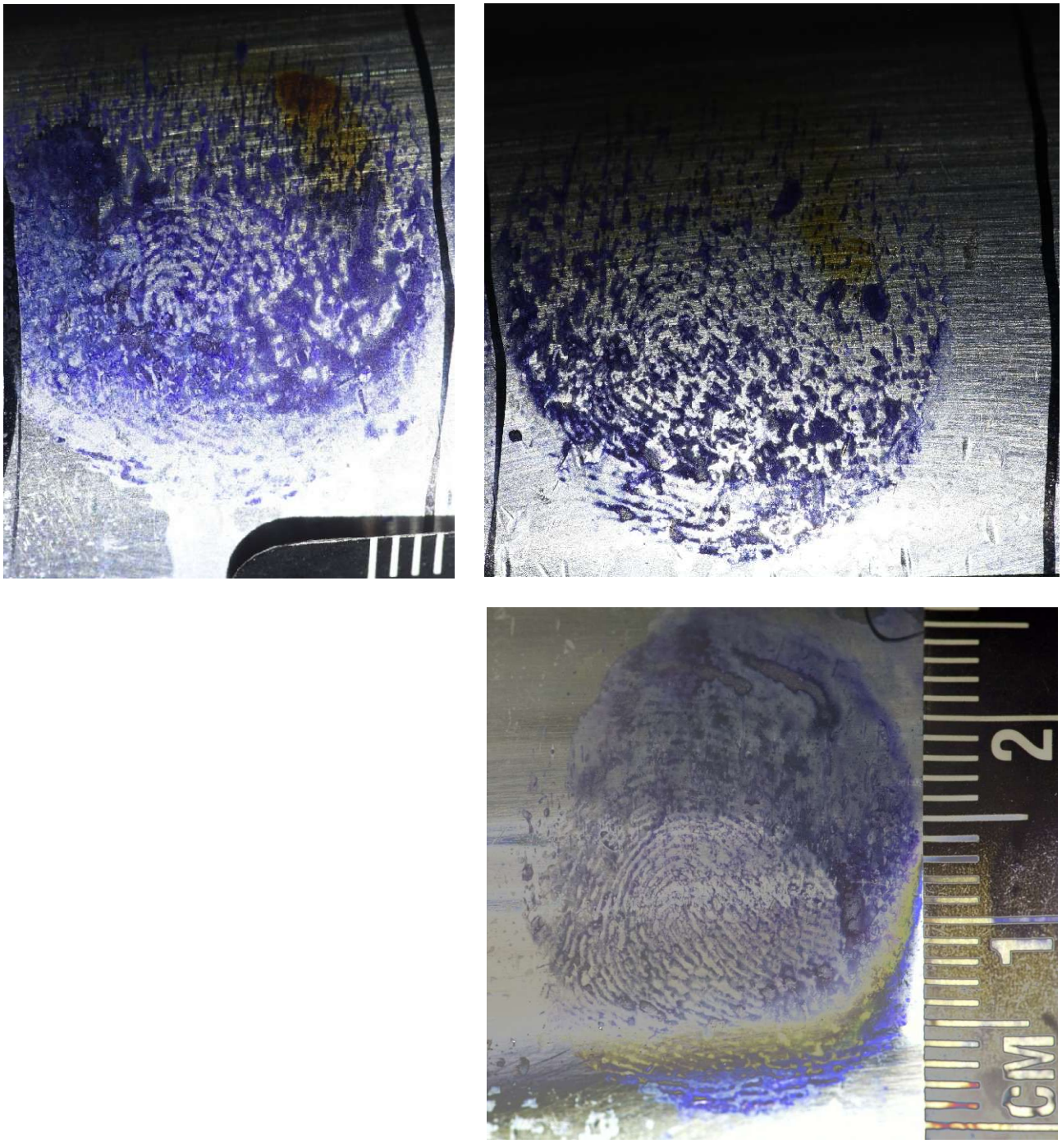
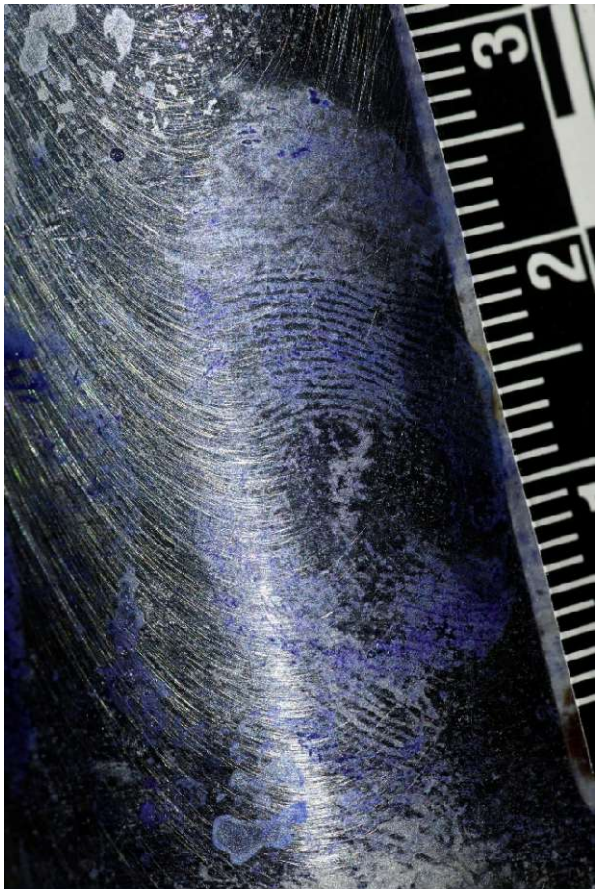


Foto 38: Le tre deplezioni della seconda impronta successivamente al trattamento con LCV







Il trattamento con LCV ha permesso di esaltare alcuni dettagli papillari che precedentemente non erano visibili, rendendosi particolarmente utile per l'analisi dattiloscopica. In particolare, nella prima impronta e nelle rispettive deplezioni ha permesso la distinta visualizzazione di dettagli riguardanti le creste e i solchi (Foto 37, Foto 38).

Successivamente alle riprese fotografiche sono stati effettuati i campionamenti mediante i tamponi microFLOQ e tamponi floccati Copan per le successive analisi genetiche.

Entrambe le tipologie di tampone hanno permesso di estrapolare il profilo del donatore del sangue nonostante il trattamento con Leuco Crystal Violet.

Il dato aggiuntivo e particolarmente significativo riguarda l'utilizzo dei tamponi microFLOQ, che in alcuni casi ha consentito di ottenere un profilo genetico misto, costituito dai contributi del donatore dell'impronta e del donatore del sangue (Appendici 8).

Tabella 8 – Risultati rappresentativi dell'esperimento 6.8

Impronte di sangue diluito al 50% su rubinetteria metallica, trattate con LCV. Risultati ricavati dagli elettroferogrammi dell'Appendice 8.

Tampone	Campione	Trattamento	Loci STR	Esito
floccato Copan	Copan 1	LCV	24	Profilo riconducibile al donatore del sangue
floccato Copan	Copan 2	LCV	1	Profilo non utile
floccato Copan	Copan 3	LCV	18	Profilo riconducibile al donatore del sangue
microFLOQ	microFLOQ 1	LCV	26	Profilo misto: entrambi i donatori identificati
microFLOQ	microFLOQ 2	LCV	N.D.	Elettroferogramma non disponibile
microFLOQ	microFLOQ 3	LCV	13	Profilo misto: entrambi i donatori identificati
microFLOQ	microFLOQ 4	LCV	24	Profilo riconducibile al donatore del sangue
microFLOQ	microFLOQ 5	LCV	26	Profilo misto: entrambi i donatori identificati
microFLOQ	microFLOQ 6	LCV	9	Profilo parziale

. Soglia analitica: 100 RFU; soglia stocastica: 210 RFU.

7. RISULTATI COMPLESSIVI

Nel seguente lavoro di Tesi si è verificata la possibilità di isolare il DNA di un donatore di una impronta partendo da piccole aree di contatto dermico; inoltre è stato possibile discriminare contributi genetici provenienti dal sangue rispetto a quelli riconducibili a contatti papillari. Questi ultimi, infatti, come sovente accade su una scena del crimine, sono spesso commisti al sangue, come nel caso in cui l'aggressore accidentalmente depositi le sue impronte sul sangue della vittima. Il lavoro di sperimentazione ha consentito sia di valutare la qualità delle impronte dal punto di vista dattiloscopico a seconda del modo in cui sono state depositate sia di individuare il trattamento chimico più idoneo per una corretta esaltazione in base al contesto, al substrato e le eventuali interferenze sui susseguenti accertamenti biologici.

Relativamente agli aspetti dattiloscopici della sperimentazione, si è giunti alle seguenti conclusioni:

1. **Comportamento del sangue diluito sulle creste sebacee:** il sangue diluito utilizzato per contaminare delle impronte sebacee raramente riesce a colorare direttamente le creste papillari, verosimilmente a causa della loro componente prevalentemente idrofobica.
2. **Confronto tra Amido Black (AB) e Leuco Crystal Violet (LCV):** l'Amido Black mostra un'efficacia dattiloscopica inferiore rispetto al Leuco Crystal Violet sulle impronte interessate da sangue diluito. La riduzione della concentrazione delle componenti proteiche conseguente alla diluizione del sangue può limitare l'efficacia della colorazione e, di conseguenza, l'esaltazione delle impronte, soprattutto quando viene utilizzato l'Amido Black (AB).
3. **Trattamento delle impronte sebacee con la Ninidrina:** nelle condizioni sperimentali esaminate, il trattamento ha consentito di evidenziare dettagli papillari utili dal punto di vista dattiloscopico, ma i successivi campionamenti non hanno permesso di ottenere profili genetici utili. Tale risultato potrebbe essere associato alla ridotta quantità di materiale biologico disponibile e alle caratteristiche del substrato poroso, senza poter escludere un eventuale contributo del trattamento chimico.

L'assenza di un confronto sistematico con campioni non trattati non consente di distinguere con certezza gli effetti dei reagenti chimici da quelli legati alle caratteristiche delle tracce e alle condizioni di campionamento.

Per quanto riguarda gli aspetti genetici della sperimentazione, è importante evidenziare i seguenti punti:

4. **Confronto tra i tamponi microFLOQ e i tamponi floccati Copan, nell'ambito dell'analisi genetica**: alcuni elettroferogrammi ottenuti mediante campionamento con microFLOQ hanno consentito il riconoscimento sia del donatore dell'impronta sia di quello del sangue, mostrando risultati favorevoli, in determinati contesti sperimentali, rispetto ai campionamenti effettuati mediante tampone floccato Copan.

Tali risultati potrebbero essere attribuiti a due fattori:

   a. al passaggio diretto del campione alla fase di amplificazione che, evitando le convenzionali procedure di estrazione e quantificazione, riduce la perdita di materiale biologico;

b. alla maggiore puntualità e localizzazione del campionamento, che può essersi dimostrata vantaggiosa nel caso di tracce biologiche limitate proprio come le impronte trattate nel presente lavoro di tesi.

Tuttavia, tale vantaggio non è stato riscontrato in tutte le condizioni sperimentali: in alcuni casi i tamponi floccati Copan hanno consentito di ottenere risultati migliori, mentre in altri nessuna delle due metodiche di campionamento ha permesso di ricavare profili genetici utili.

5. **Possibilità di campionamenti multipli con microFLOQ**: l'impiego dei microFLOQ consente di effettuare un maggior numero di campionamenti sulla medesima traccia, offrendo una maggiore flessibilità nella gestione della traccia e nelle successive analisi.
6. **Indicazioni d'impiego dei microFLOQ**: rispetto al tampone floccato Copan, l'utilizzo dei microFLOQ può risultare particolarmente indicato in presenza di tracce di dimensioni molto ridotte, quali impronte digitali caratterizzate da pochi o assenti dettagli utili ai fini dell'identificazione dattiloscopica, e nel caso di campionamenti delle medesime tracce, anche dopo esaltazione con il rispettivo reagente chimico.
7. **Analisi genetica dopo trattamento con LCV**: nonostante il trattamento con Leuco Crystal Violet, il campionamento mediante microFLOQ ha consentito, in diversi casi, di estrapolare il profilo genetico del donatore del sangue, il quale risultava misto, in alcuni casi, con il profilo genetico del donatore dell'impronta.

8. CONCLUSIONI

La scena del crimine è un contesto caratterizzato dalla presenza di numerosi reperti e tracce biologiche che, opportunamente individuati e analizzati, possono fornire informazioni determinanti per la ricostruzione di un evento delittuoso. In tale contesto, fra le evidenze capaci di collocare un individuo sulla scena, vi sono le interazioni del soggetto con delle superfici; infatti, il contatto epidermico rilascia un numero variabile, ma generalmente basso, di cellule dalle quali è possibile recuperare quantità estremamente ridotte di DNA (LCN o LT-DNA[17]). Le tracce di questo tipo, comunemente indicate come Touch DNA, rappresentano pertanto una delle principali sfide analitiche della genetica forense.

L'analisi dattiloscopica è una delle metodologie di riferimento per l'identificazione individuale attraverso l'analisi delle impronte papillari; tuttavia, non è sempre possibile individuare le caratteristiche morfologiche tali da consentirne un efficace utilizzo ai fini identificativi o di esclusione. Questo limite può permanere anche a seguito dell'impiego di metodiche di esaltazione chimica, rendendo necessario considerare l'impronta non soltanto come evidenza dattiloscopica, ma anche come possibile fonte di materiale biologico utile alla successiva caratterizzazione genetica.

Il presente lavoro di tesi nasce, quindi, con l'esigenza di valorizzare al massimo le informazioni ricavabili da evidenze che, per loro stessa natura, possono collocarsi al limite della sensibilità analitica dei laboratori di genetica forense. In questo contesto, la sperimentazione condotta in collaborazione con il Reparto Investigazioni Scientifiche dei Carabinieri di Parma, ha permesso di valutare l'impiego di strumenti di campionamento di ultima generazione, quali i tamponi microFLOQ, nella gestione di quantità ridotte di materiale biologico e di campioni che possono essere caratterizzati da una componente mista.

I risultati ottenuti evidenziano come l'impiego di tale strumento possa rappresentare un valido supporto nella fase preanalitica delle procedure di analisi, contribuendo a ottimizzare il recupero e la successiva caratterizzazione del DNA presente sulla superficie in esame. Fondamentale importanza assume, in questo caso, la possibilità di analizzare anche contributi minoritari all'interno di misture complesse come quelle derivanti dall'interazione dell'impronta dell'aggressore con una traccia ematica riconducibile alla vittima; in tali circostanze un campionamento maggiormente puntuale e localizzato assume un ruolo determinante per l'interpretazione della traccia.

Nel complesso, il lavoro svolto sottolinea l'importanza di un approccio integrato alla gestione delle evidenze sulla scena del crimine, nella quale l'analisi dattiloscopica e quella genetico-forense non siano considerate metodologie alternative, ma strumenti complementari capaci di valorizzare differenti caratteristiche della medesima evidenza.

In tale prospettiva, l'utilizzo di sistemi di campionamento innovativi come il microFLOQ si inserisce nel continuo processo di evoluzione delle metodologie applicate alla genetica forense, offrendo nuove possibilità nella gestione di tracce caratterizzate da quantità estremamente ridotte di DNA e da un'elevata complessità interpretativa.

[17] Low Copy Number o Low Template DNA: si riferisce all'analisi di tracce biologiche minime (spesso meno di 20-30 cellule o <100pg)

BIBLIOGRAFIA

1. James SH, Kish PE, Sutton TP. Principles of bloodstain pattern analysis: theory and practice. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 1–2.

2. Wonder AY. Bloodstain pattern evidence: objective approaches and case applications. Burlington: Academic Press; 2007.

3. Upadhyay M, Shrivastava P, Verma K, Joshi B. Recent advancements in identification and detection of saliva as forensic evidence: a review. Egypt J Forensic Sci. 2023;13:17. doi:10.1186/s41935-023-00336-3.

4. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA 'fingerprints'. Nature. 1985;318(6046):577–579. doi:10.1038/318577a0.

5. Burrill J, Daniel B, Frascione N. A review of trace "Touch DNA" deposits: Variability factors and an exploration of cellular composition. Forensic Sci Int Genet. 2019;39:8–18. doi:10.1016/j.fsigen.2018.11.019.

6. Gennari R. Manuale di dattiloscopia. 2005.

7. Lee HC, Gaensslen RE, editors. Advances in fingerprint technology. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2001.

8. Galton F. Finger prints. London: Macmillan and Co.; 1892.

9. Steri E. Le impronte digitali. 1976.

10. Champod C, Lennard CJ, Margot PA, Stoilovic M. Fingerprints and other ridge skin impressions. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2004.

11. Ramotowski R. Lee and Gaensslen's advances in fingerprint technology. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2013.

12. Sears VG, Butcher CPG, Fitzgerald LA. Enhancement of fingerprints in blood part 3: reactive techniques, Acid Yellow 7, and process sequences. J Forensic Ident. 2005;55:741–763.

13. Stein C, Kyeck SH, Henssge C. DNA typing of fingerprint reagent treated biological stains. J Forensic Sci. 1996;41:1012–1017.

14. Raymond J, Roux C, Pasquier ED, Lennard C, Sutton J. The effect of common fingerprint detection techniques on the DNA typing of fingerprints deposited on different surfaces. J Forensic Ident. 2004;54:22–44.

15. Leintz R, Bond JW. Can the RUVIS reflected UV imaging system visualize fingerprint corrosion on brass cartridge casings postfiring? J Forensic Sci. 2013;58(3):772–775. doi:10.1111/1556-4029.12101.

16. Almog J. Fingerprints (dactyloscopy): visualization. In: Siegel JA, Saukko PJ, Knupfer GC, editors. Encyclopedia of forensic sciences. San Diego: Academic Press; 2000. p. 890–900.

17. Sears VG, Butcher CPG, Prizeman TM. Enhancement of fingerprints in blood—Part 2: Protein dyes. J Forensic Ident. 2001;51:28–38.

18. Centre for Applied Science and Technology (CAST), Home Office. Fingermark visualisation manual. 1st ed. London: The Stationery Office; 2014. p. 470–471.

19. Bowman V, Sears V, Bandey H, Bleay S, Fitzgerald L, Gibson A, et al. Manual of fingerprint development techniques. 2nd ed. Luton: Police Scientific Development Branch; 2004.

20. Forsythe-Erman J. A comparison of blood enhancement techniques. Can Soc Forensic Sci J. 2001;34:159–165.

21. Moore J, Bleay S, Deans J, NicDaeid N. Recovery of fingerprints from arson scenes: part 2—fingerprints in blood. J Forensic Ident. 2008;58:83–108.

22. Mauciere LA, Monk JW. Enhancement of faint and dilute bloodstains with fluorescence reagents. CAC News. 1992;Summer.

23. Jelly R, Patton ELT, Lennard C, Lewis SW, Lim KF. The detection of latent fingermarks on porous surfaces using amino acid sensitive reagents: a review. Anal Chim Acta. 2009;652:128–142.

24. Platt S, Nyström M. Colorimetric staining of ultrafiltration membranes fouled with BSA. Desalination. 2006;199:210–212.

25. Marchant B, Tague C. Developing fingerprints in blood: a comparison of several chemical techniques. J Forensic Ident. 2007;57:76–93.

26. Baxter R. Evaluation of Hungarian Red and Acid Yellow as Fluorogenic for Fingermarks in Blood [thesis]. Canberra: Canberra Institute of Technology; 2008.

27. Ortiz de Montellano PR. Control of the catalytic activity of prosthetic heme by the structure of hemoproteins. Acc Chem Res. 1987;20:289–294.

28. Fiedel SJ. Blood from stones? Some methodological and interpretive problems in blood residue analysis. J Archaeol Sci. 1996;23:139–147.

29. Caldwell JP, Kim ND. Extension of the color suits available for chemical enhancement of fingerprints in blood. J Forensic Sci. 2002;47:332–340.

30. Spence L, Asmussen G. Spectral enhancement of Leucocrystal Violet treated footwear impression evidence in blood. Forensic Sci Int. 2003;132:117–124.

31. Grady DP. Using Adobe Photoshop's Channel Mixer as an evidence enhancement tool. J Forensic Ident. 2001;51:378–384.

32. Miskelly GM, Wagner JH. Using spectral information in forensic imaging. Forensic Sci Int. 2005;155:112–118.

33. Christofidis G, Morrissey J, Birkett JW. Detection of fingermarks—Applicability to metallic surfaces: A literature review. J Forensic Sci. 2018;63:1616–1627. doi:10.1111/1556-4029.13775.

34. Creighton JT. Visualization of latent impressions after incidental or direct contact with human blood. J Forensic Ident. 1997;47:534–541.

35. Rough C, Ebeyan R, Riley B. Investigating the formation of faux bloody fingermarks: The influence of secretion type and blood deposition mechanisms. Forensic Sci Int. 2026;387:113010.

36. Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. Biotechniques. 2007;43(4):ii–v. doi:10.2144/000112582.

37. Hammond HA, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. Am J Hum Genet. 1994;55(1):175–189.

38. Pascali VL, D'Aloja E, Dobosz M, Pescarmona M. Estimating allele frequencies of hypervariable DNA systems. Forensic Sci Int. 1991;51(2):273–280. doi:10.1016/0379-0738(91)90192-L.

39. Jin L, Chakraborty R. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single probe multilocus DNA fingerprinting data. Mol Biol Evol. 1994;11(1):120–127. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040086.

40. Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. 2nd ed. Burlington: Elsevier Academic Press; 2005.

41. Tagliabracci A, Alessandrini F, Mazzarini L, Onofri V, Onori N, Turchi C. Introduzione alla genetica forense: indagini di identificazione personale e di paternità. Milano: Springer; 2010. doi:10.1007/978-88-470-1512-8.

42. Budowle B, Allen RC. Analysis of amplified fragment-length polymorphisms (VNTR/STR loci) for human identity testing. Methods Mol Biol. 1998;98:155–171. doi:10.1385/0-89603-443-7:155.

43. Caramelli D. Antropologia molecolare: manuale di base. Firenze: Firenze University Press; 2009. doi:10.36253/978-88-8453-754-6.

44. Zhang Z, Peng D. Recent advances in enhancement techniques for blood fingerprints. Crit Rev Anal Chem. 2023;53(2):442–461.

45. Elder B, Sharp M, Harvey-Walker N. A stain with all the fixing's—Enhancement of fingermarks in blood using a combined fixative and aqueous protein stain. Forensic Sci Int. 2024;363:112181. doi:10.1016/j.forsciint.2024.112181.

46. Bossers LCAM, Roux C, Bell M, McDonagh AM. Methods for the enhancement of fingermarks in blood. Forensic Sci Int. 2011;210(1–3):1–11. doi:10.1016/j.forsciint.2011.04.006.

47. De Vittori E, Barni F, Lewis SW, Antonini G, Rapone C, Berti A. Forensic application of a rapid one-step tetramethylbenzidine-based test for the presumptive trace detection of bloodstains at the crime scene and in the laboratory. Forensic Chem. 2016;2:63–74. doi:10.1016/j.forc.2016.10.002.

48. O'Farrell B. Evolution in lateral flow–based immunoassay systems. In: Wong RC, Tse HY, editors. Lateral Flow Immunoassay. New York: Humana Press; 2009. p. 1–33. doi:10.1007/978-1-59745-240-3_1.

49. Johnston E, Ames CE, Dagnall KE, Foster J, Daniel BE. Comparison of presumptive blood test kits including Hexagon OBTI. J Forensic Sci. 2008;53(3):687–689. doi:10.1111/j.1556-4029.2008.00727.x.

50. Ambers A, Wiley R, Novroski N, Budowle B. Direct PCR amplification of DNA from human bloodstains, saliva, and touch samples collected with microFLOQ® swabs. Forensic Sci Int Genet. 2018;32:80–87. doi:10.1016/j.fsigen.2017.10.010.

51. Chong KWY, Wong Y, Ng BK, Lim WSH, Rosli AR, Syn CKC. A practical study on direct PCR amplification using the GlobalFiler PCR Amplification Kit on human bloodstains collected with microFLOQ Direct swabs. Forensic Sci Int. 2019;300:43–50. doi:10.1016/j.forsciint.2019.04.018.

52. Cavanaugh SE, Bathrick AS. Direct PCR amplification of forensic touch and other challenging DNA samples: a review. Forensic Sci Int Genet. 2018;32:40–49. doi:10.1016/j.fsigen.2017.10.005.

53. Prasad E, Hitchcock C, Raymond J, Cole A, Barash M, Gunn P, et al. DNA recovery from unfired and fired cartridge cases: A comparison of swabbing, tape lifting, vacuum filtration, and direct PCR. Forensic Sci Int. 2020;317:110507. doi:10.1016/j.forsciint.2020.110507.

54. Altayari W. DNA extraction: organic and solid phase. Methods Mol Biol. 2016;1420:55–68.

55. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.

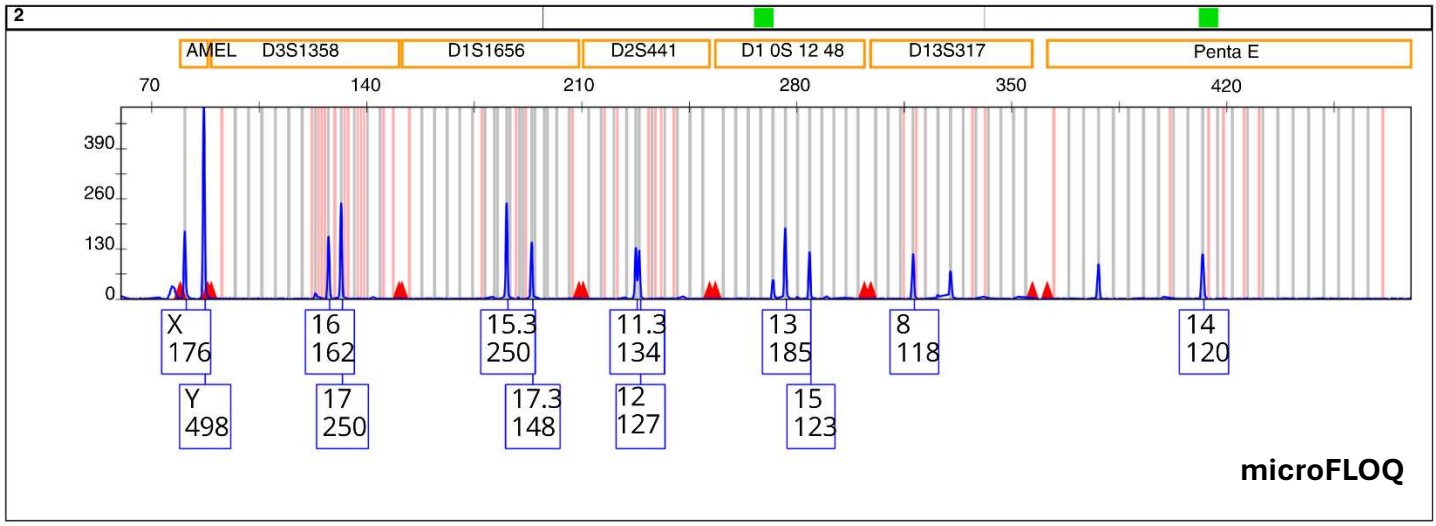
56. Butler JM. PCR amplification: capabilities and cautions. In: Butler JM. Advanced topics in forensic DNA typing: methodology. San Diego: Academic Press; 2011. p. 69–97.

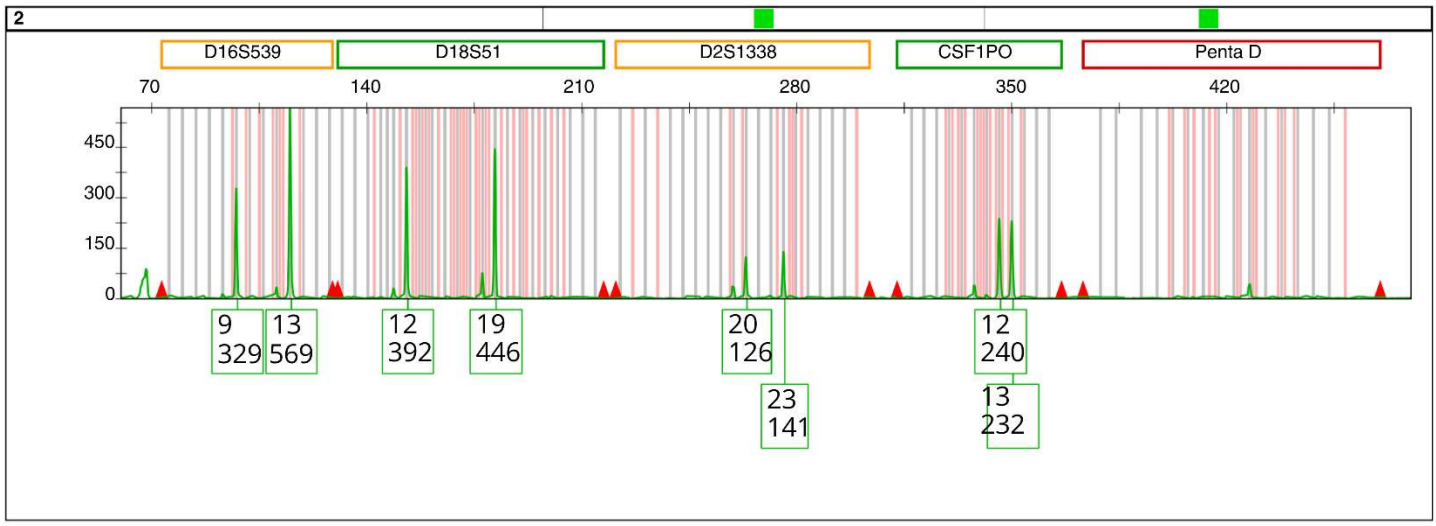
57. Butler JM. Capillary electrophoresis: principles and instrumentation. In: Butler JM. Advanced topics in forensic DNA typing: methodology. San Diego: Academic Press; 2011. p. 141–165.

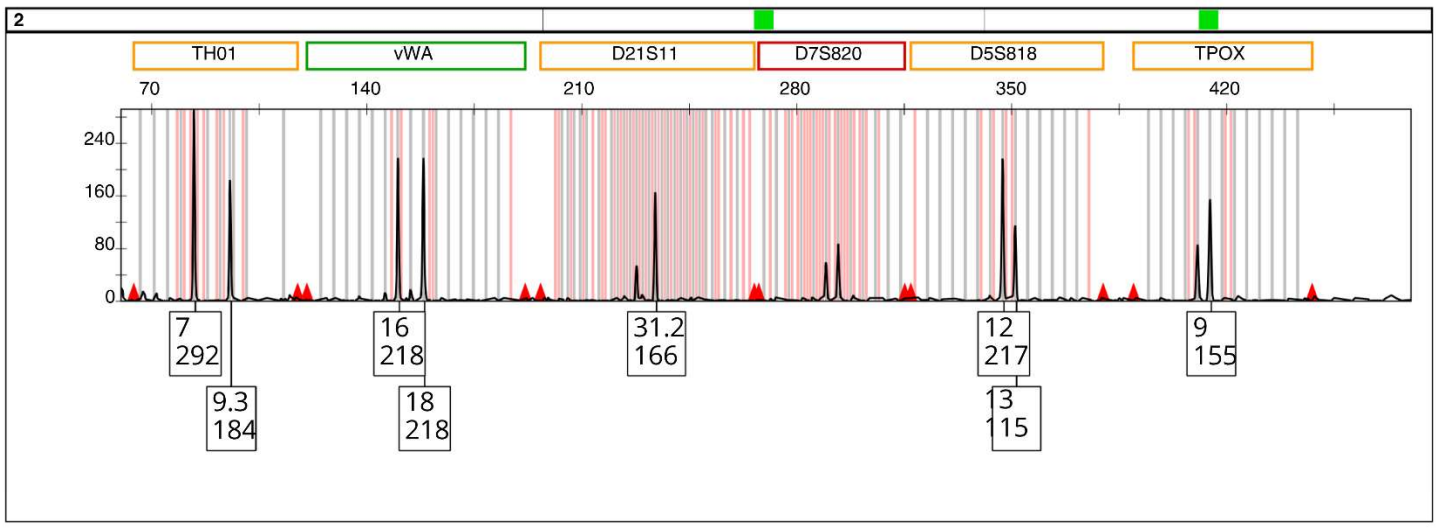
APPENDICE 1

GeneMapper™ ID-X 1.6

Sample Name **SQ** **MIX**

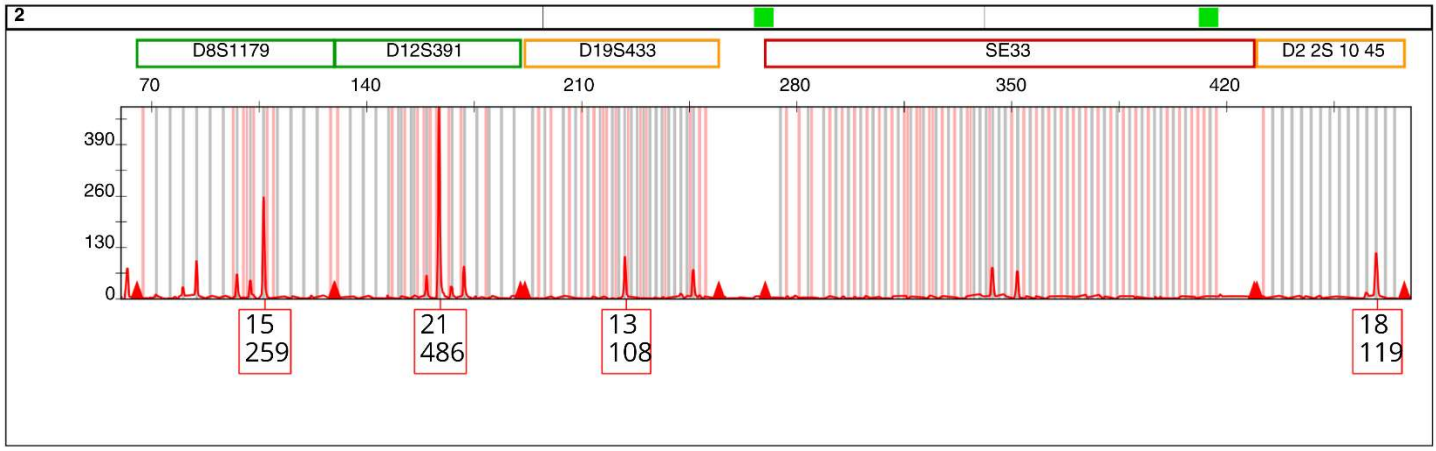


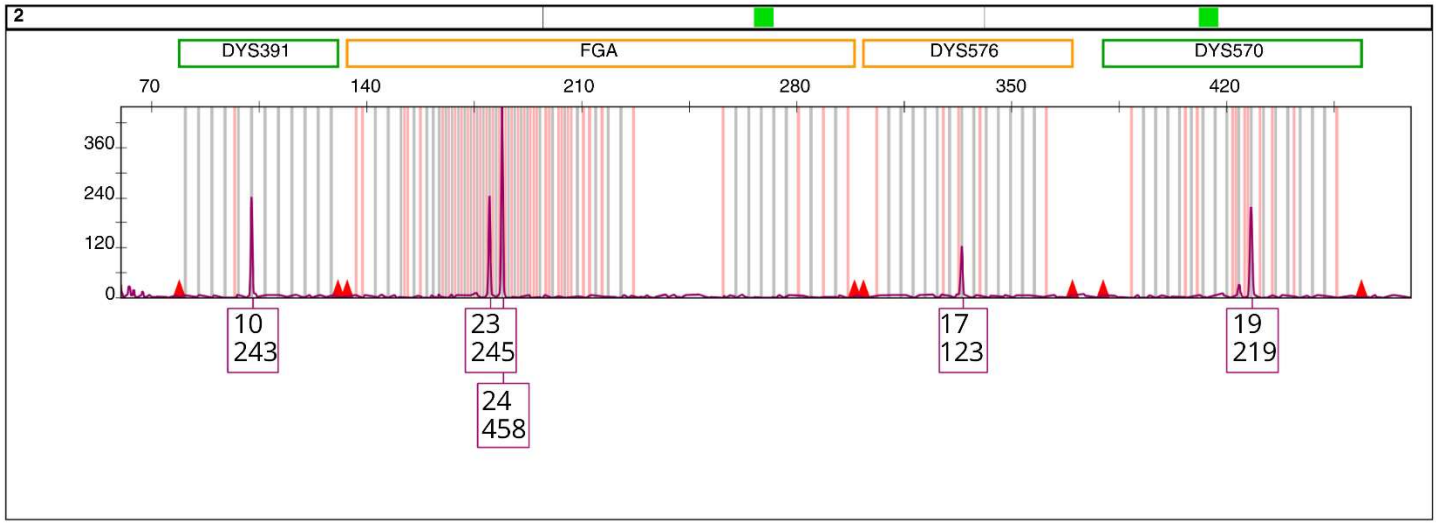




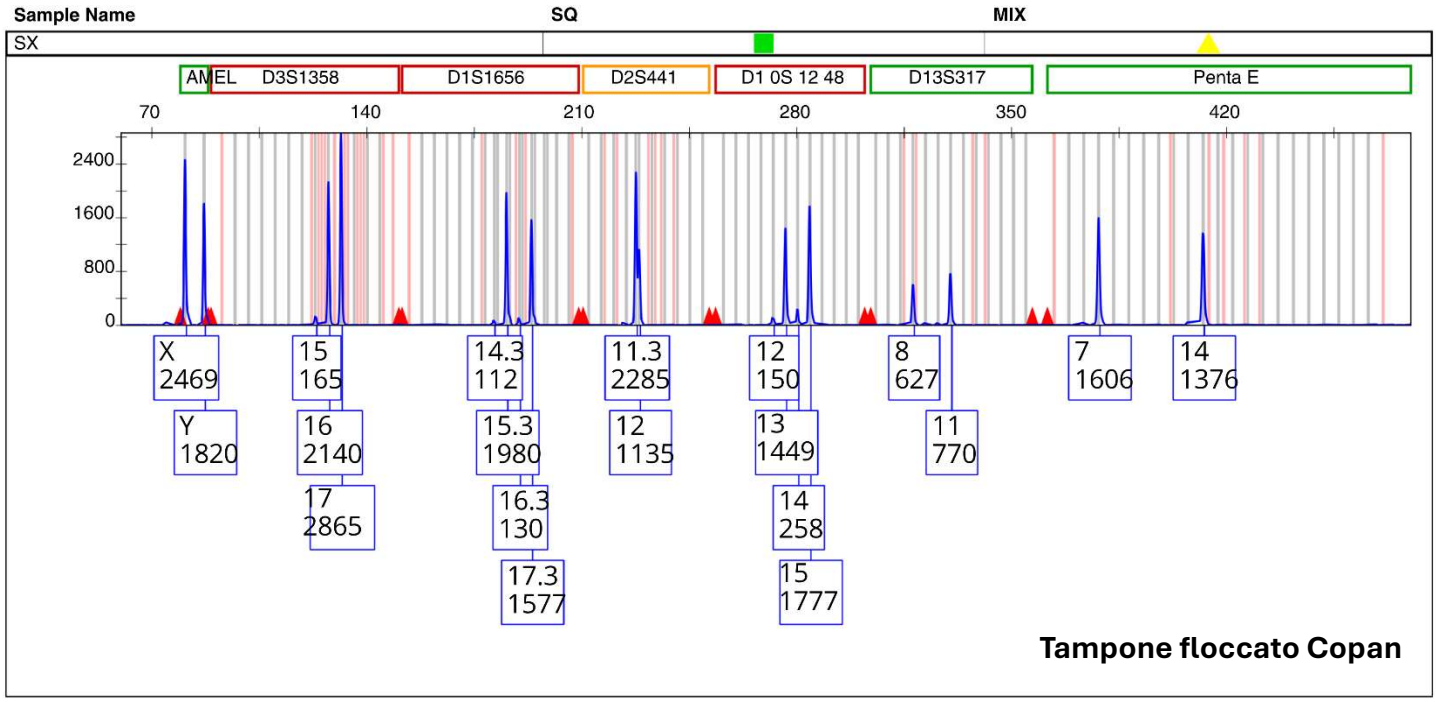
GeneMapper™ ID-X 1.6

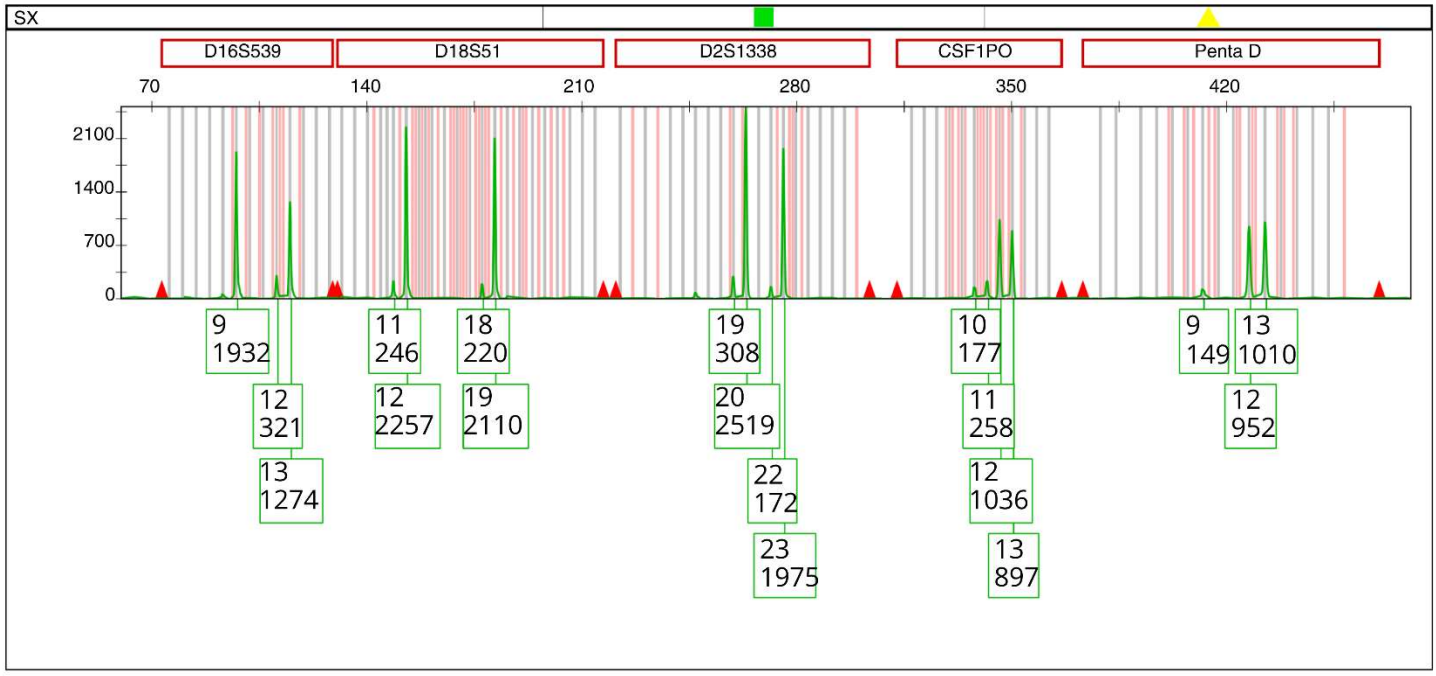
Sample Name **SQ** **MIX**



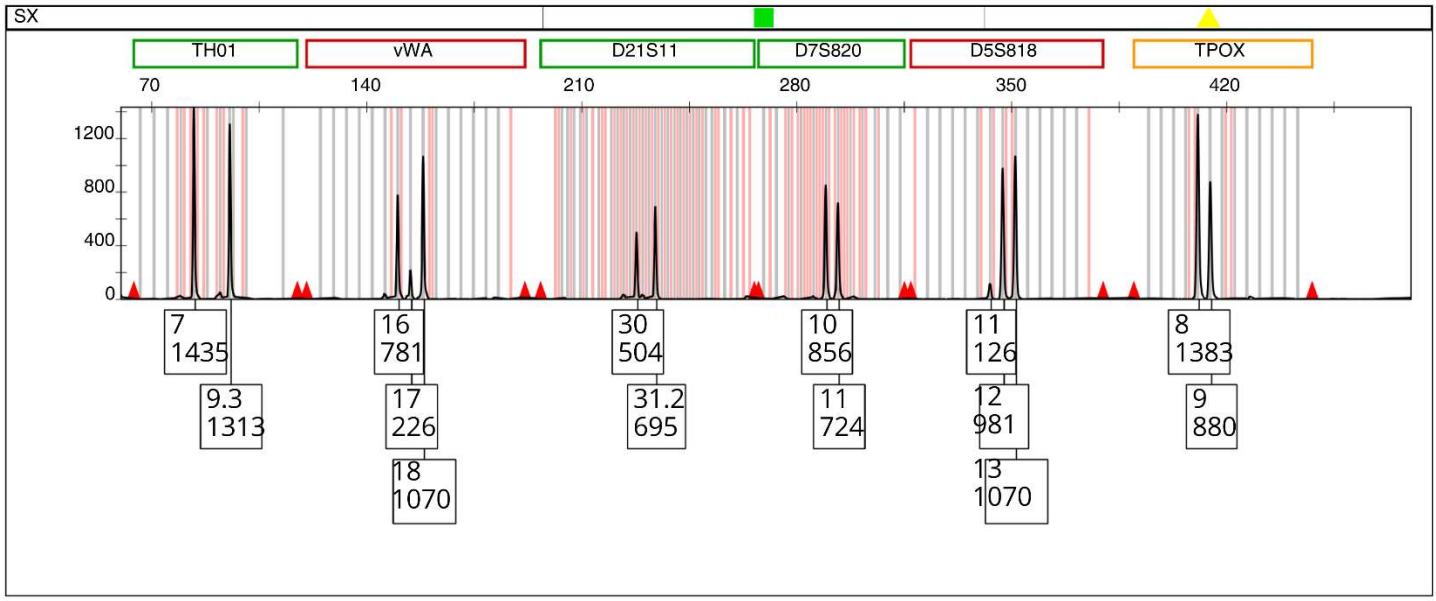


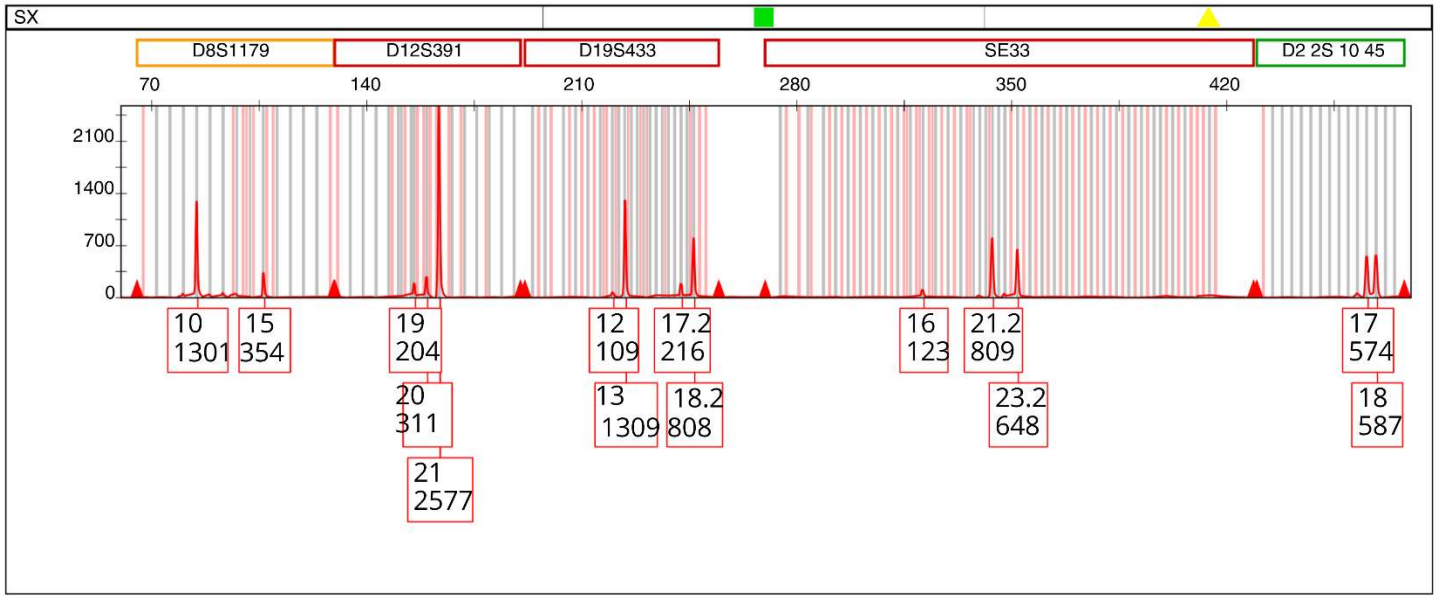
GeneMapper™ ID-X 1.6

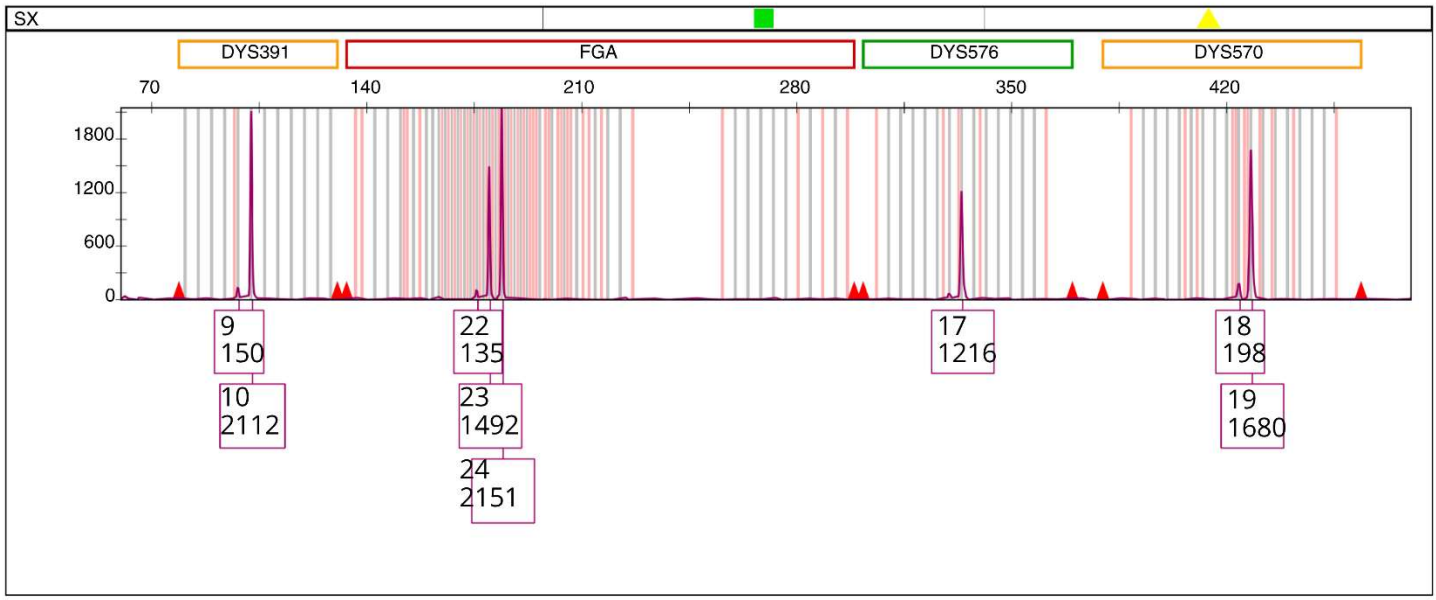




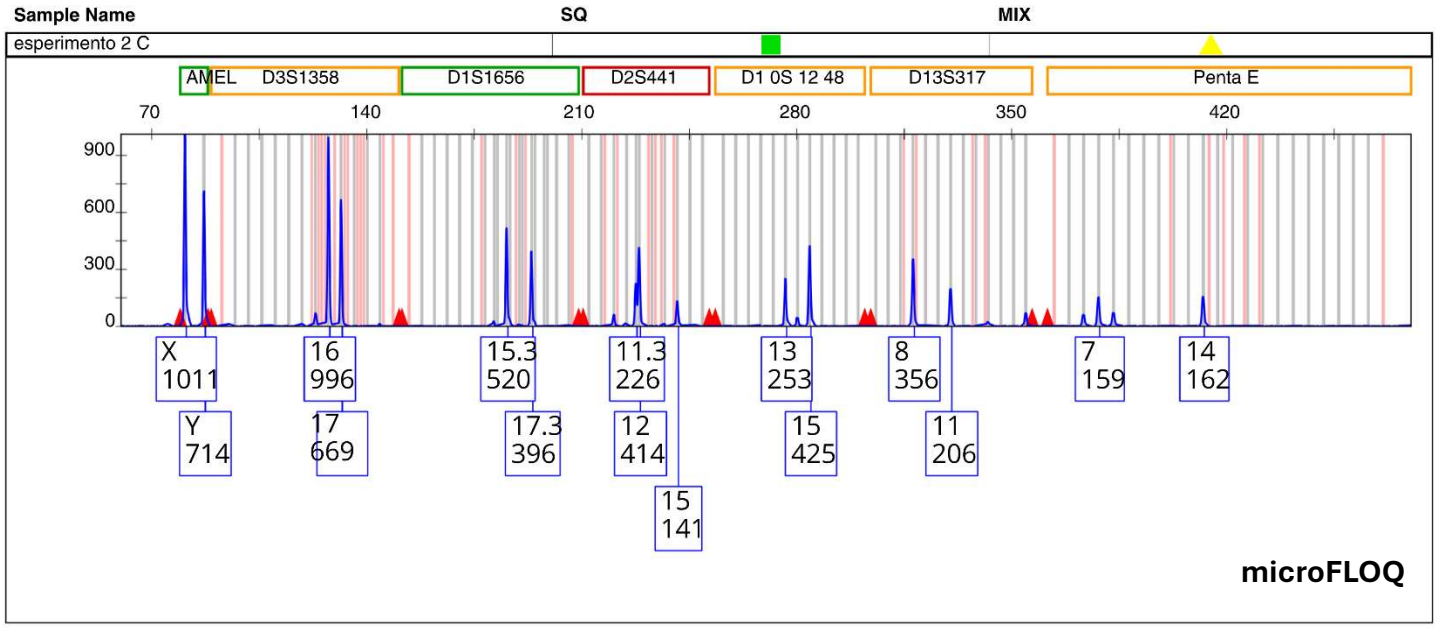
Sample Name **SQ** **MIX**

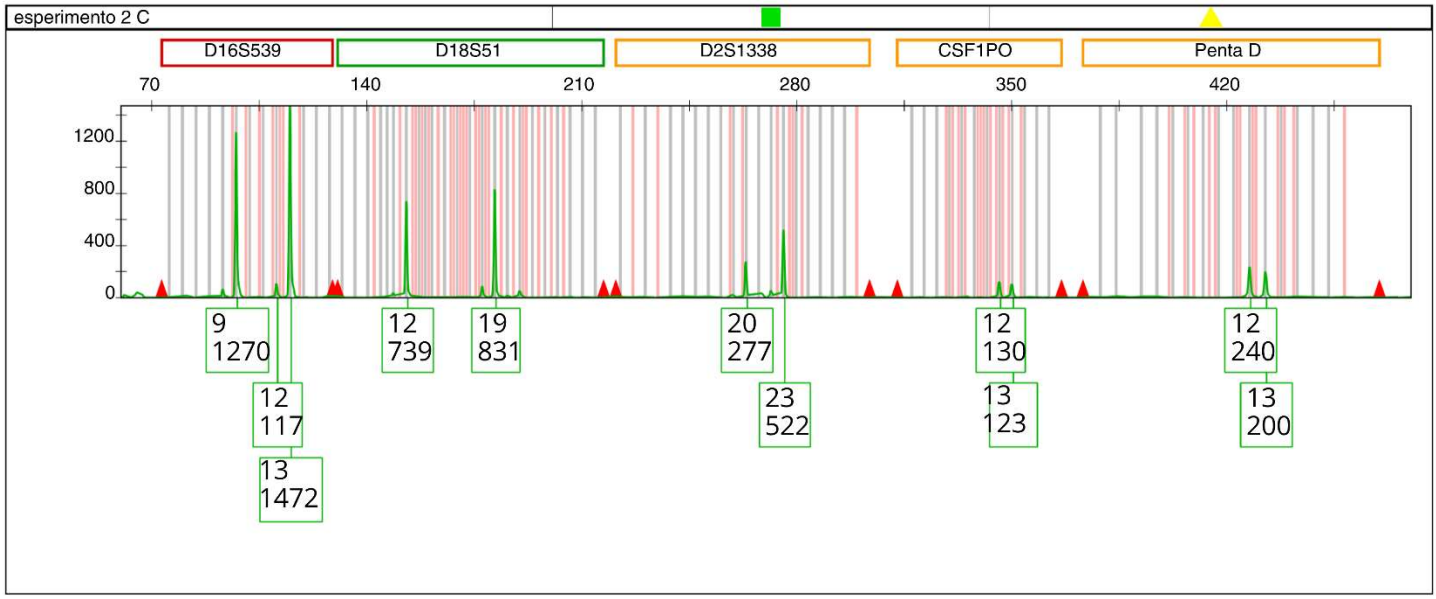


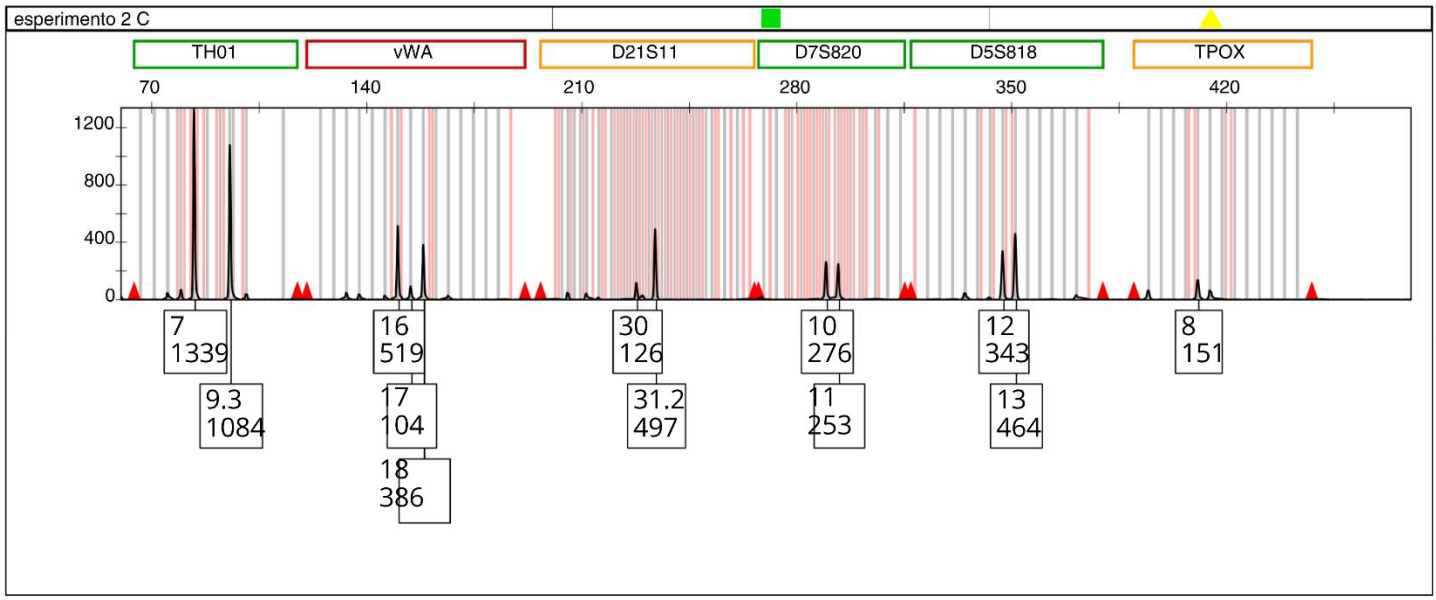


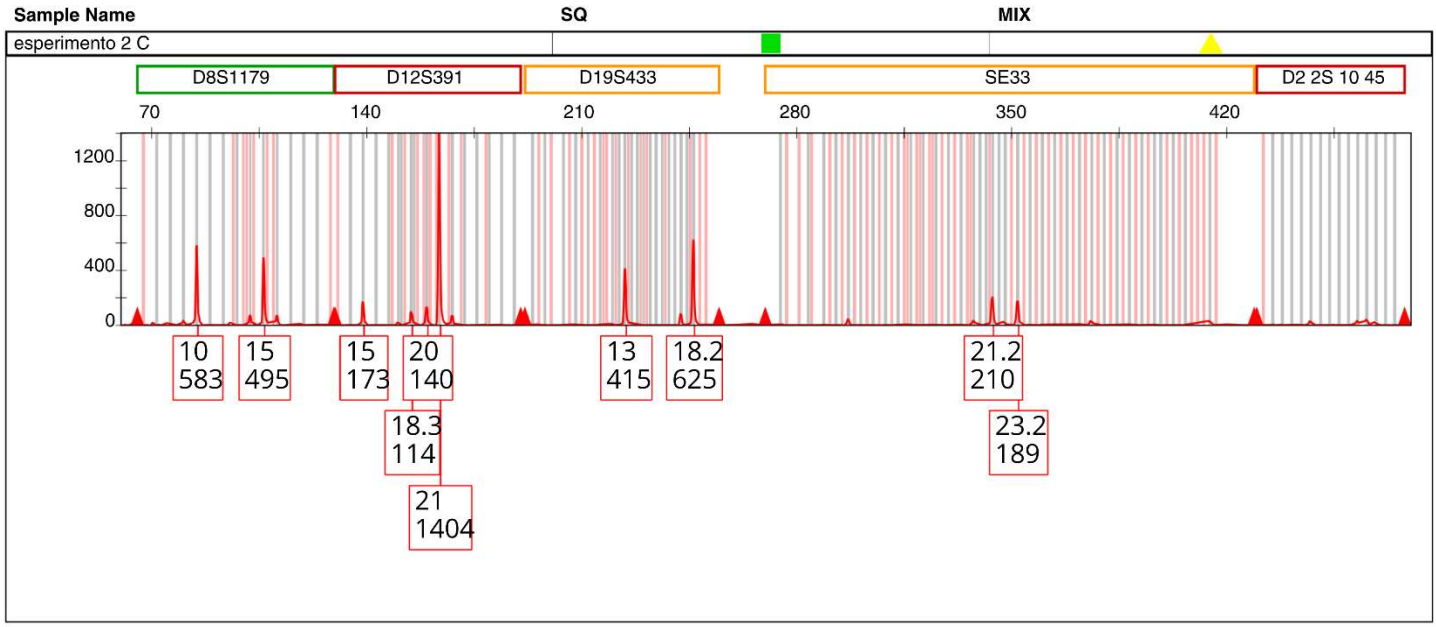


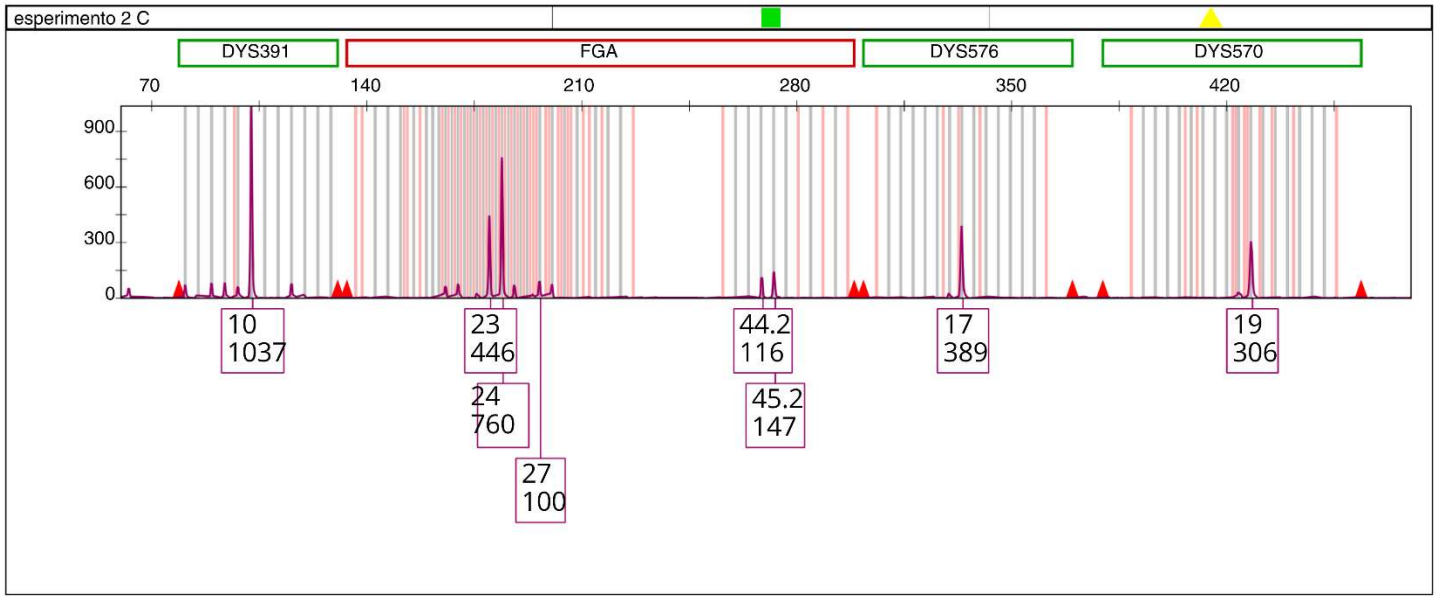
APPENDICE 2

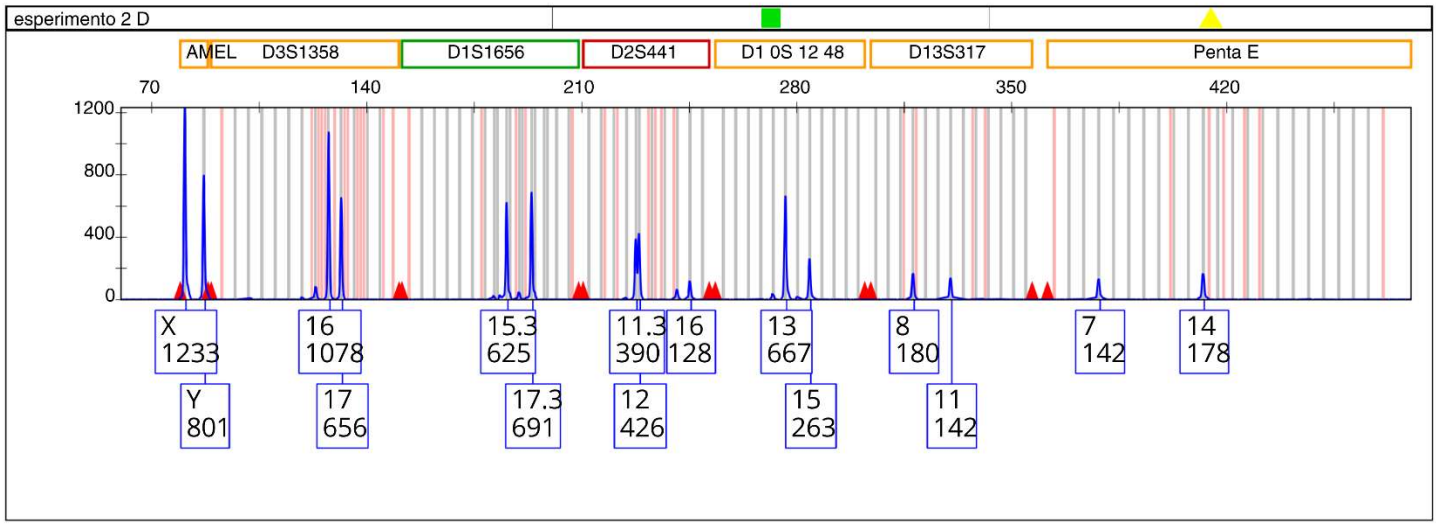

Sample Name
SQ
MIX
esperimento 2 C
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
900
600
300
0
X 1011
Y 714
16 996
17 669
15.3 520
17.3 396
11.3 226
12 414
15 141
13 253
15 425
8 356
11 206
7 159
14 162
microFLOQ


esperimento 2 C
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
1200
800
400
0
9 1270
12 117
13 1472
12 739
19 831
20 277
23 522
12 130
13 123
12 240
13 200

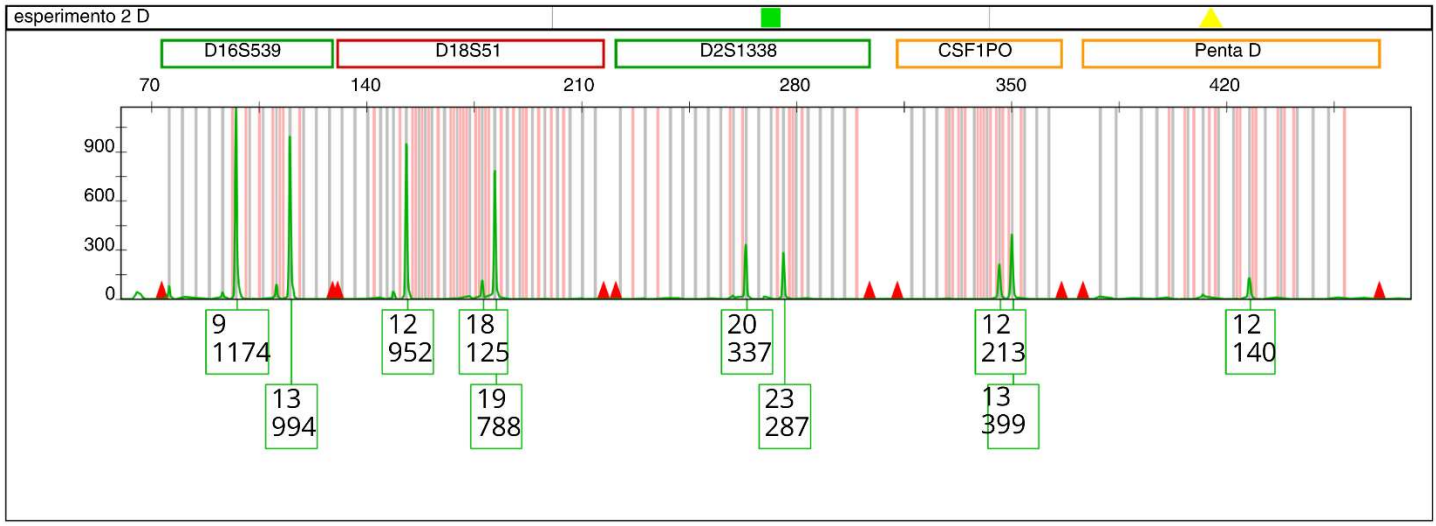

esperimento 2 C
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
1200
800
400
0
7 1339
9.3 1084
16 519
17 104
18 386
30 126
31.2 497
10 276
11 253
12 343
13 464
8 151

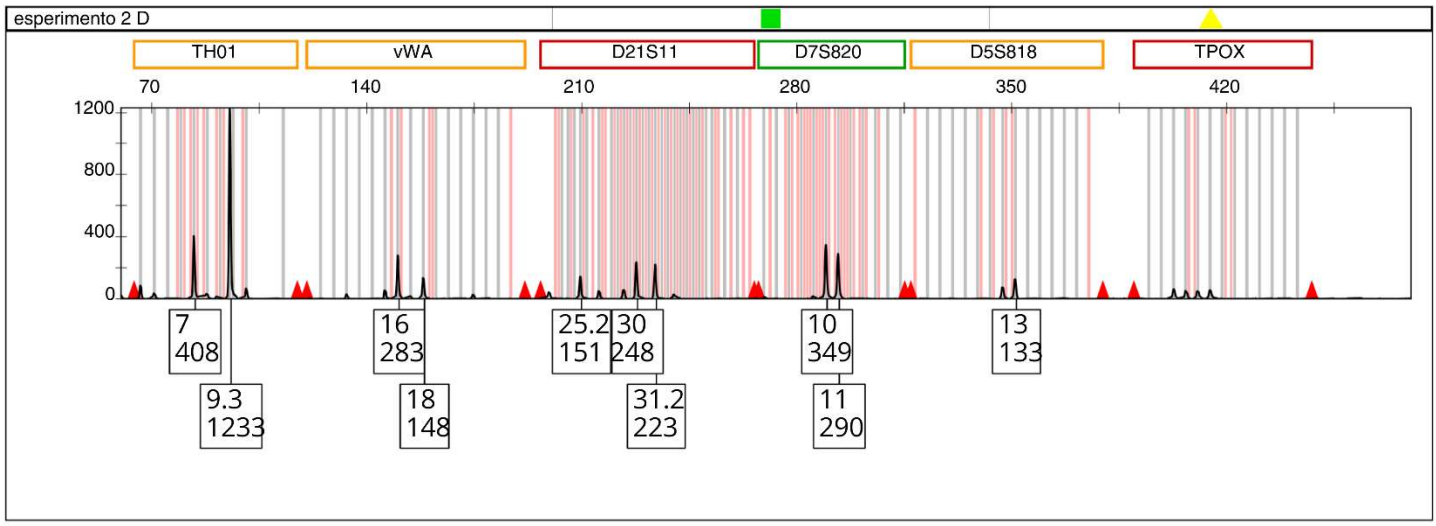

Sample Name
SQ
MIX
esperimento 2 C
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
1200
800
400
0
10 583
15 495
15 173
20 140
18.3 114
21 1404
13 415
18.2 625
21.2 210
23.2 189

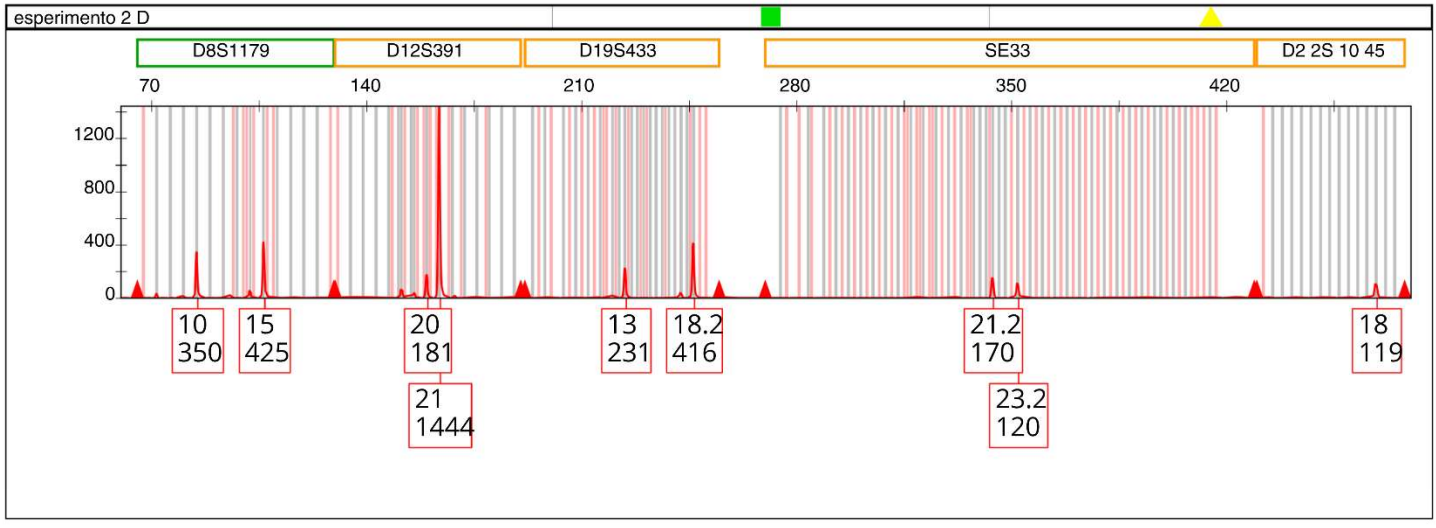

esperimento 2 C
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
900
600
300
0
10 1037
23 446
24 760
27 100
44.2 116
45.2 147
17 389
19 306


esperimento 2 D
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
1200
800
400
0
X 1233
Y 801
16 1078
17 656
15.3 625
17.3 691
11.3 390
16 128
12 426
13 667
15 263
8 180
11 142
7 142
14 178

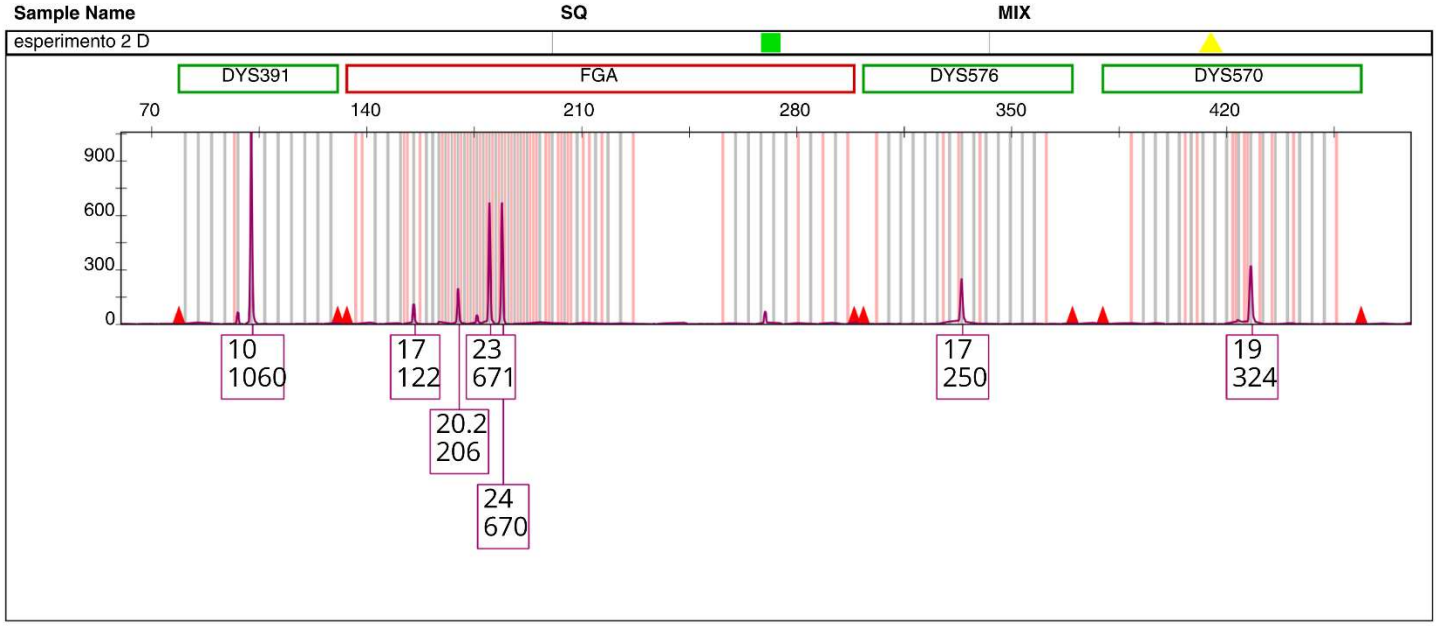
Sample Name **SQ** **MIX**

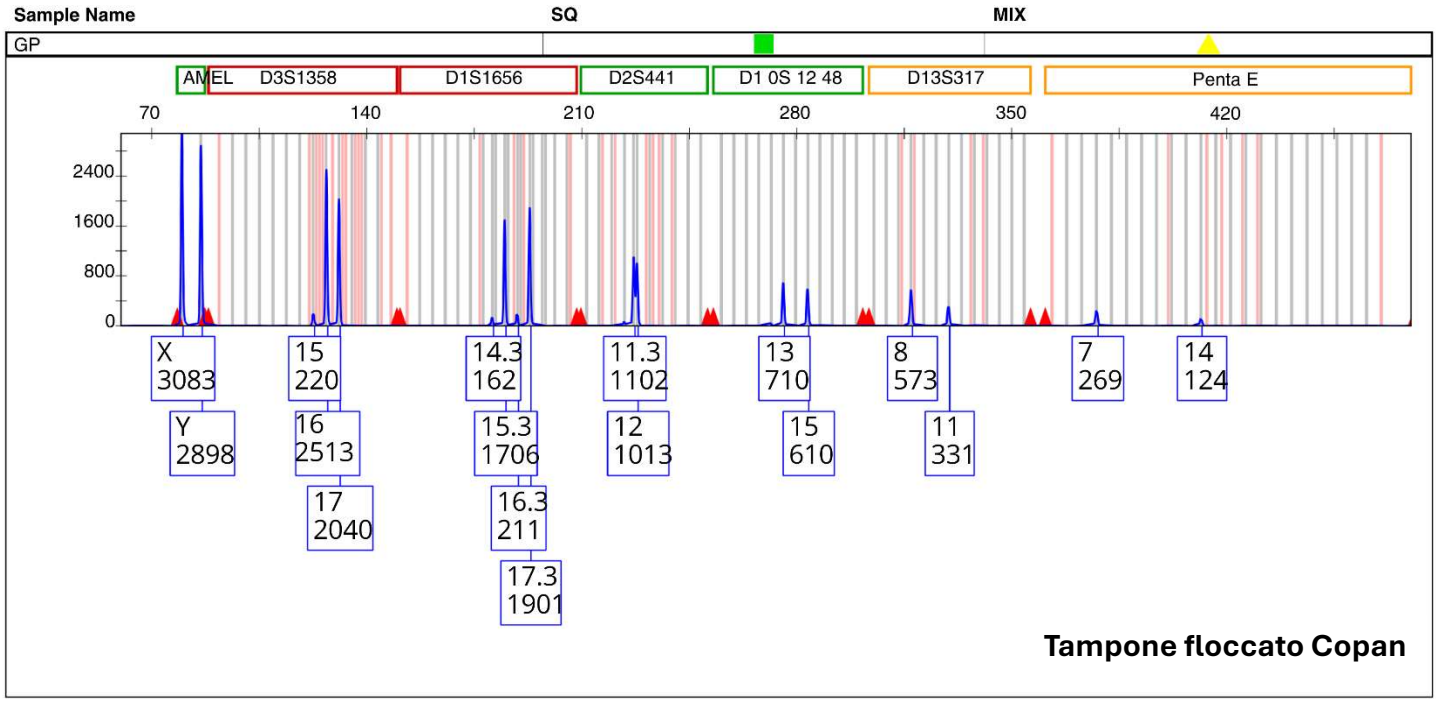


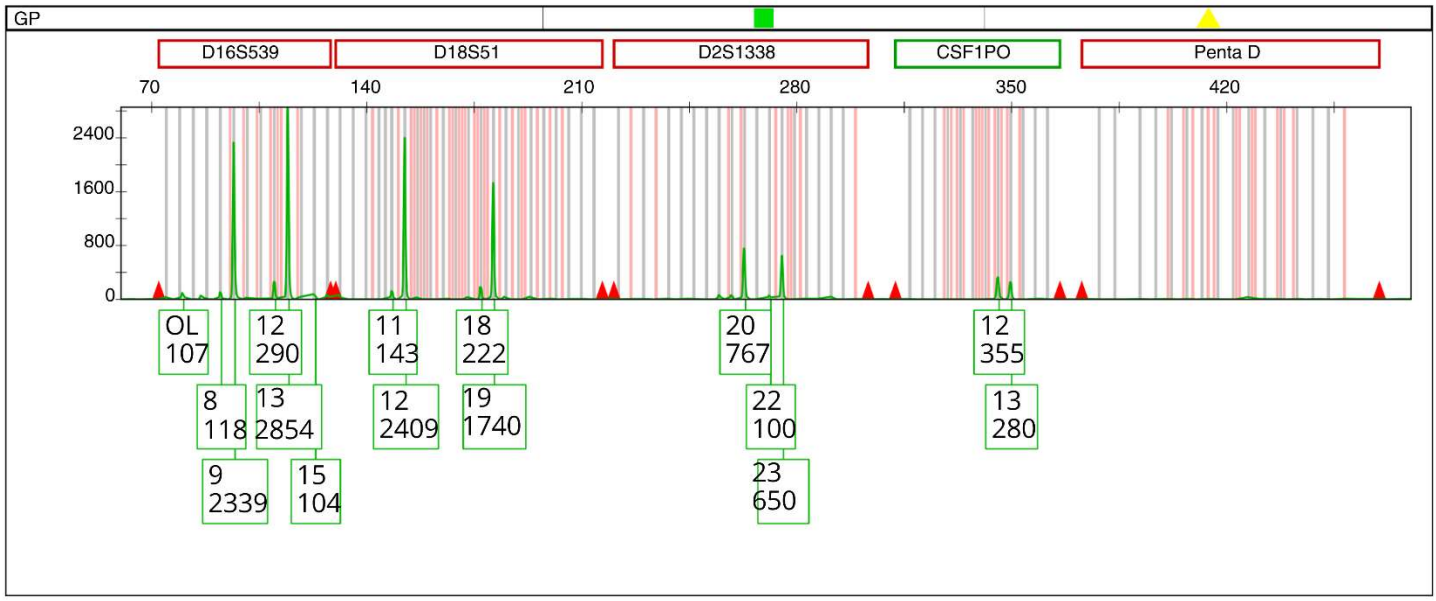




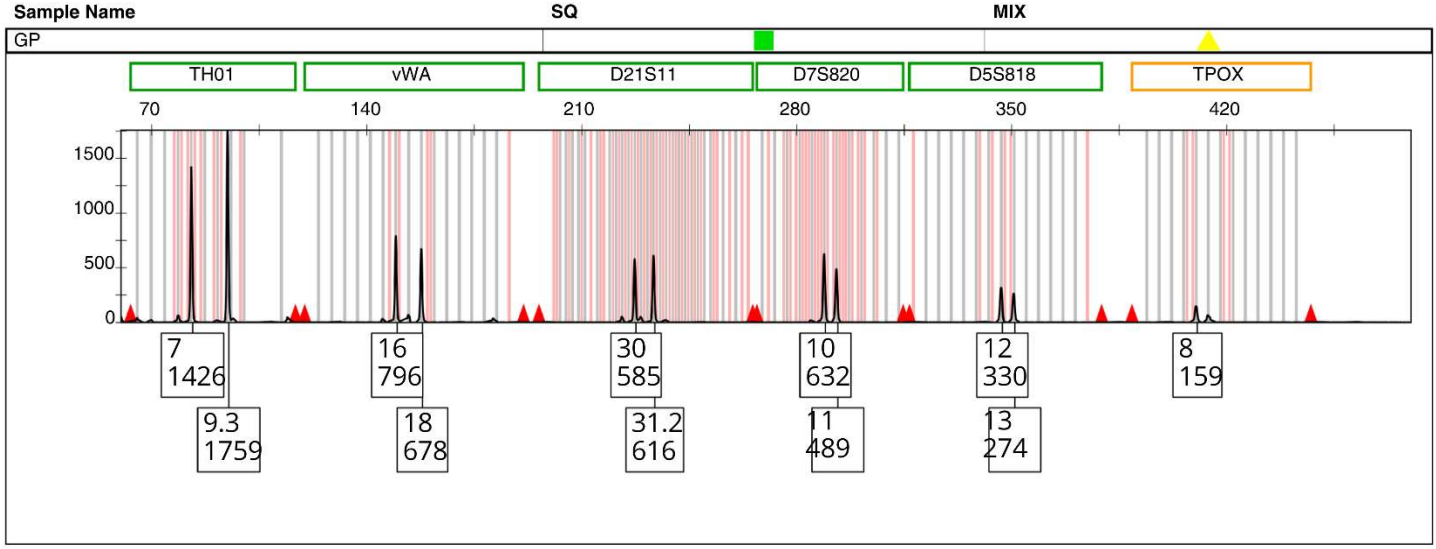
GeneMapper™ ID-X 1.6

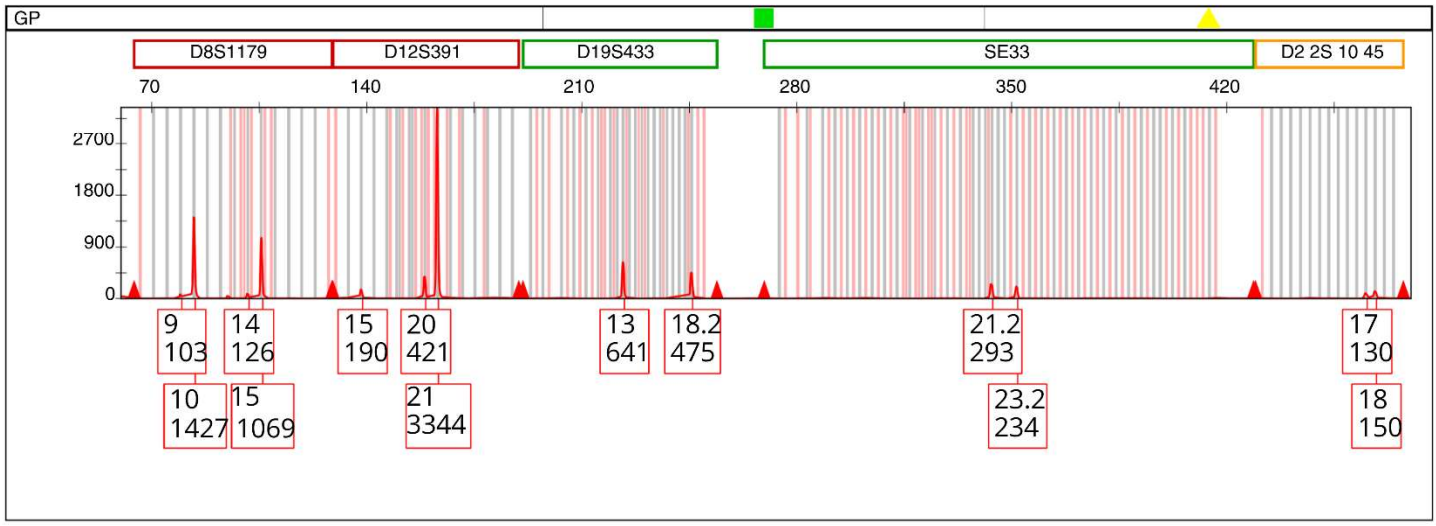


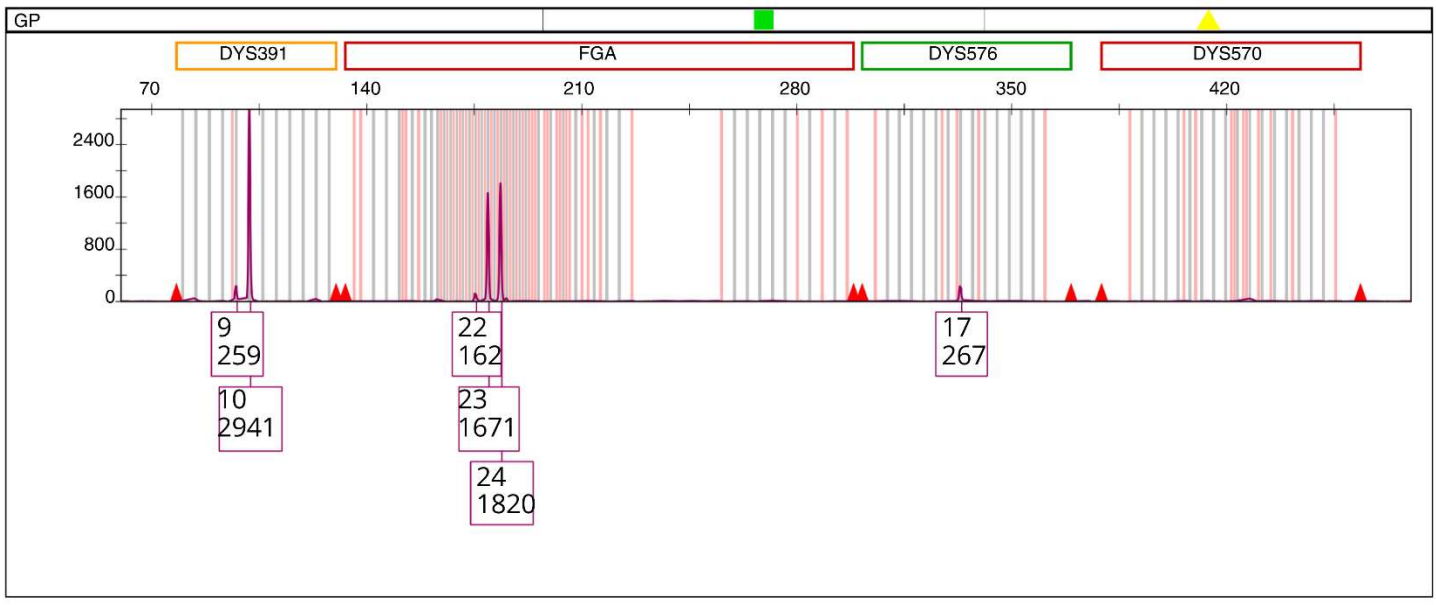

Sample Name
SQ
MIX
GP
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
2400
1600
800
0
X 3083
Y 2898
15 220
16 2513
17 2040
14.3 162
15.3 1706
16.3 211
17.3 1901
11.3 1102
12 1013
13 710
15 610
8 573
11 331
7 269
14 124
Tampone floccato Copan


GP
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
2400
1600
800
0
OL 107
8 118
9 2339
12 290
13 2854
15 104
11 143
12 2409
18 222
19 1740
20 767
22 100
23 650
12 355
13 280

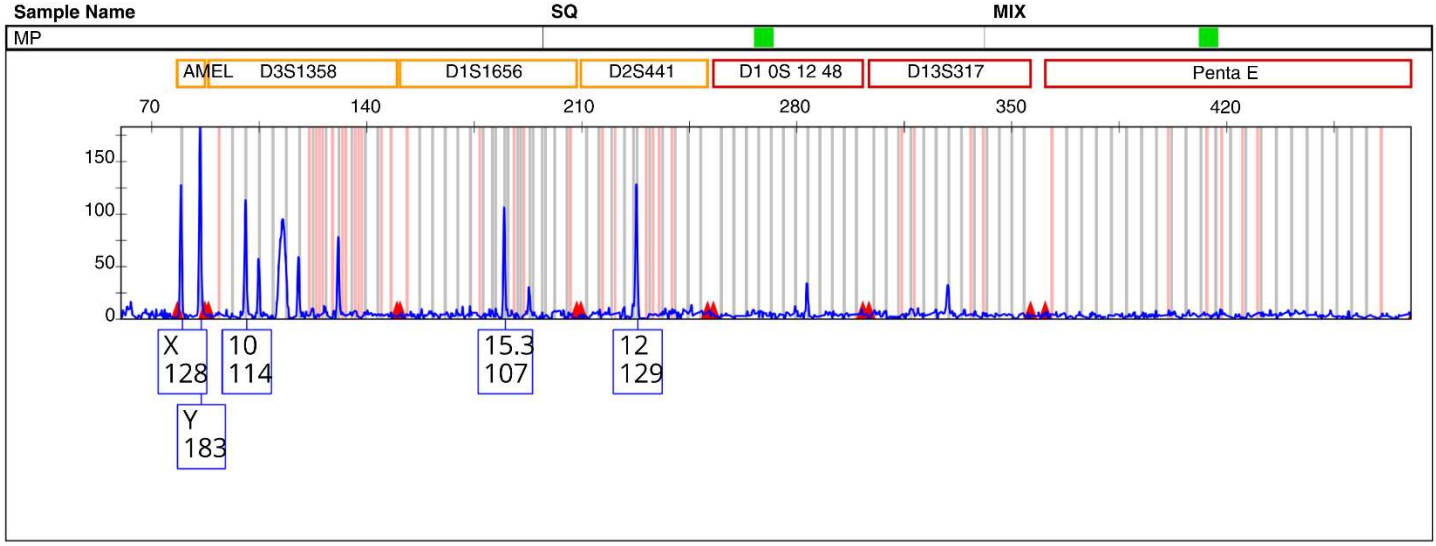
Sample Name **SQ** **MIX**

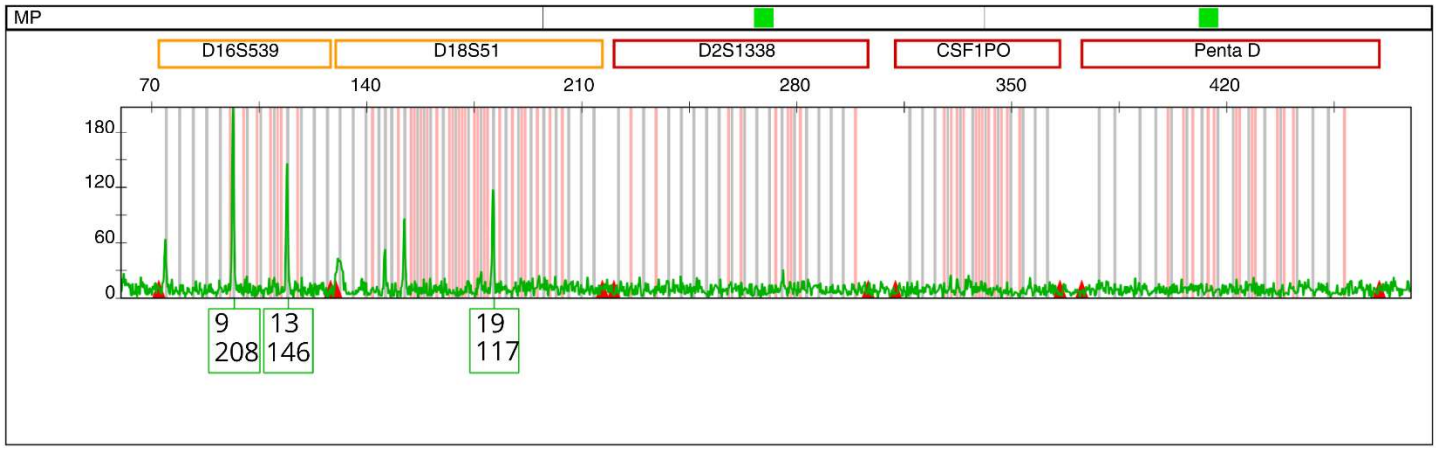


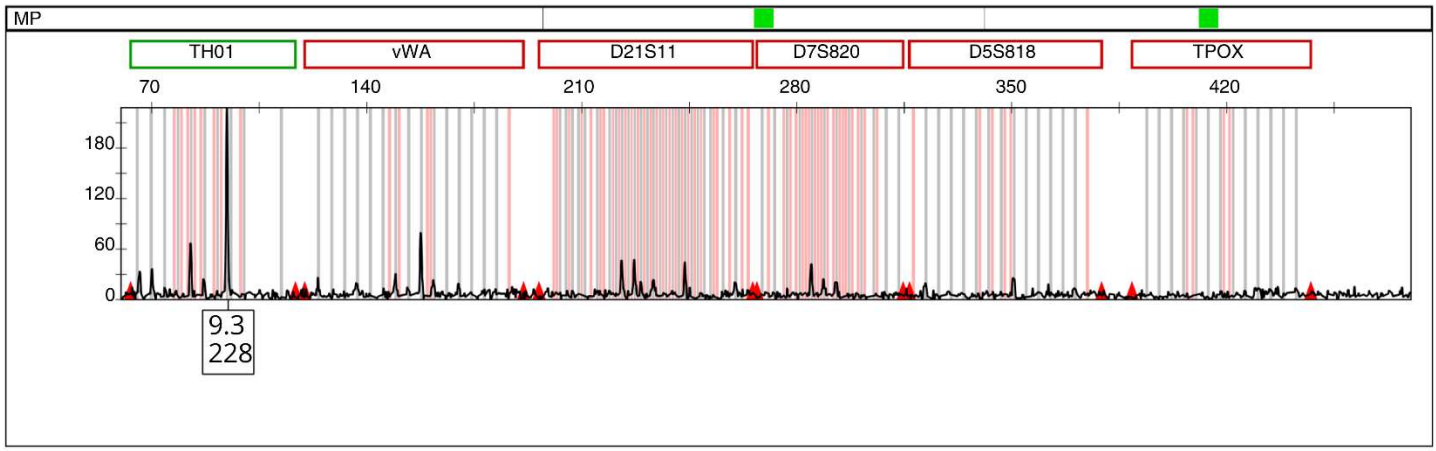


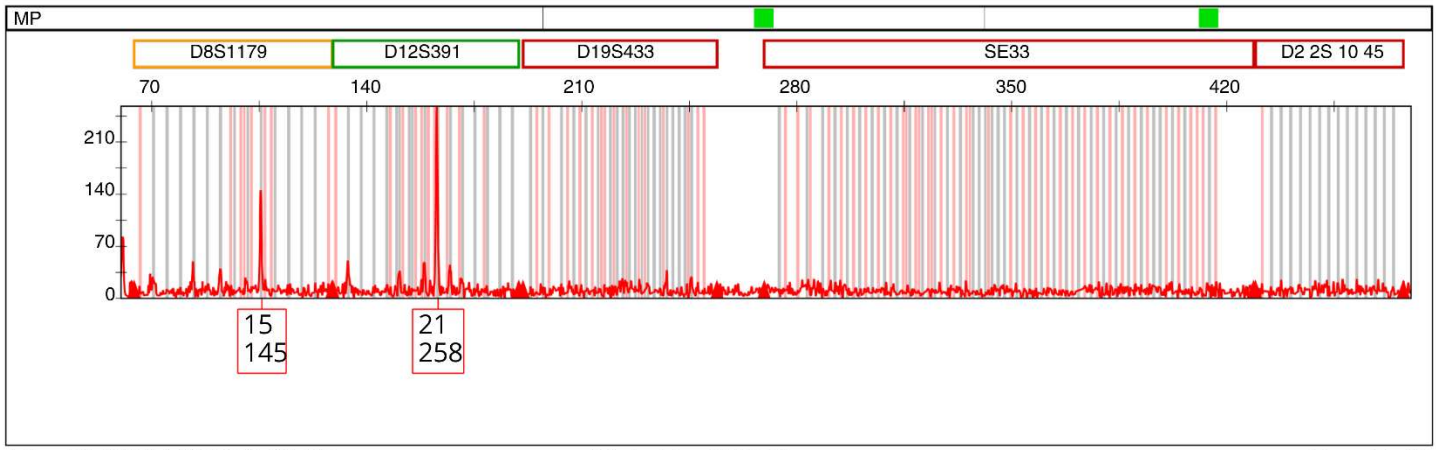


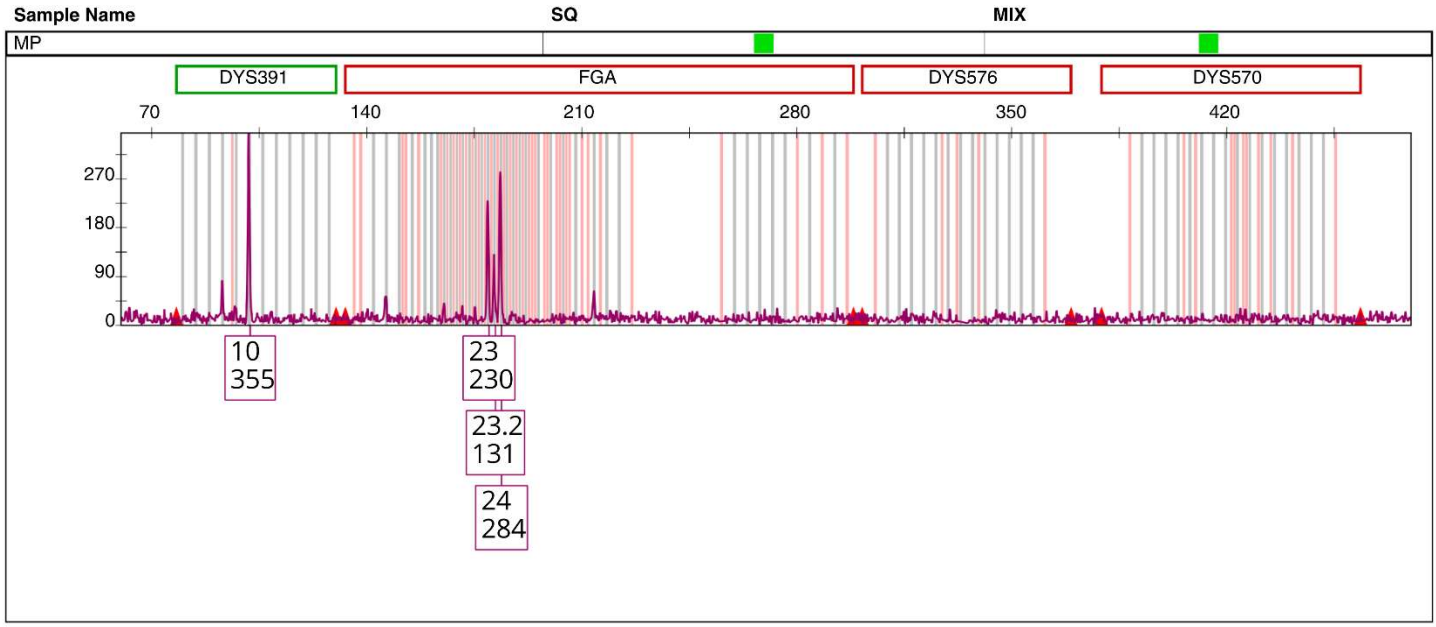
Sample Name **SQ** **MIX**





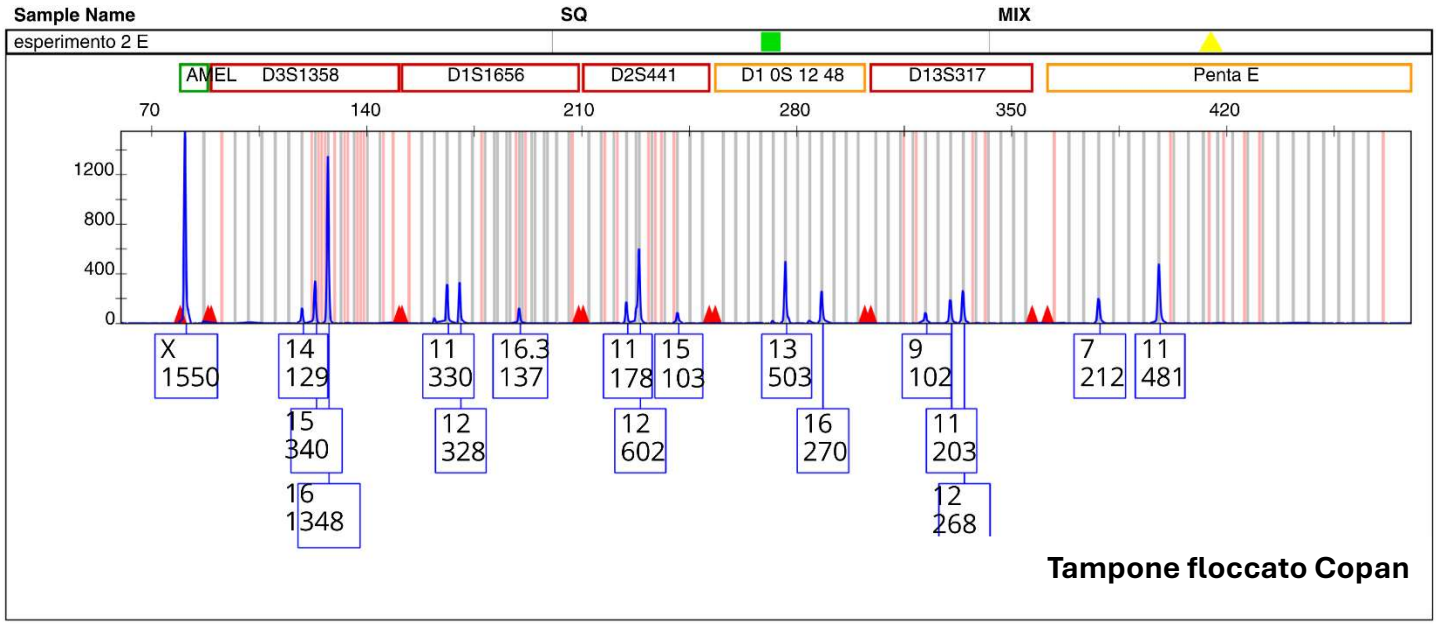


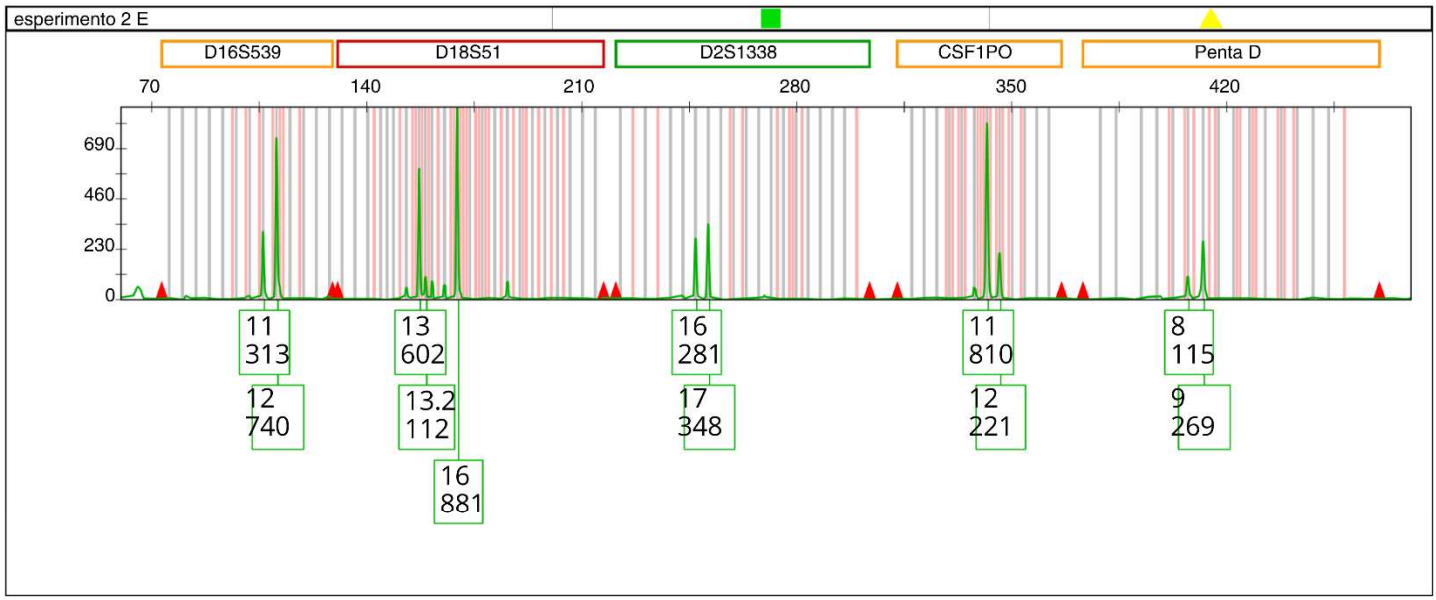



Sample Name
SQ
MIX
MP
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
270
180
90
0
10
355
23
230
23.2
131
24
284

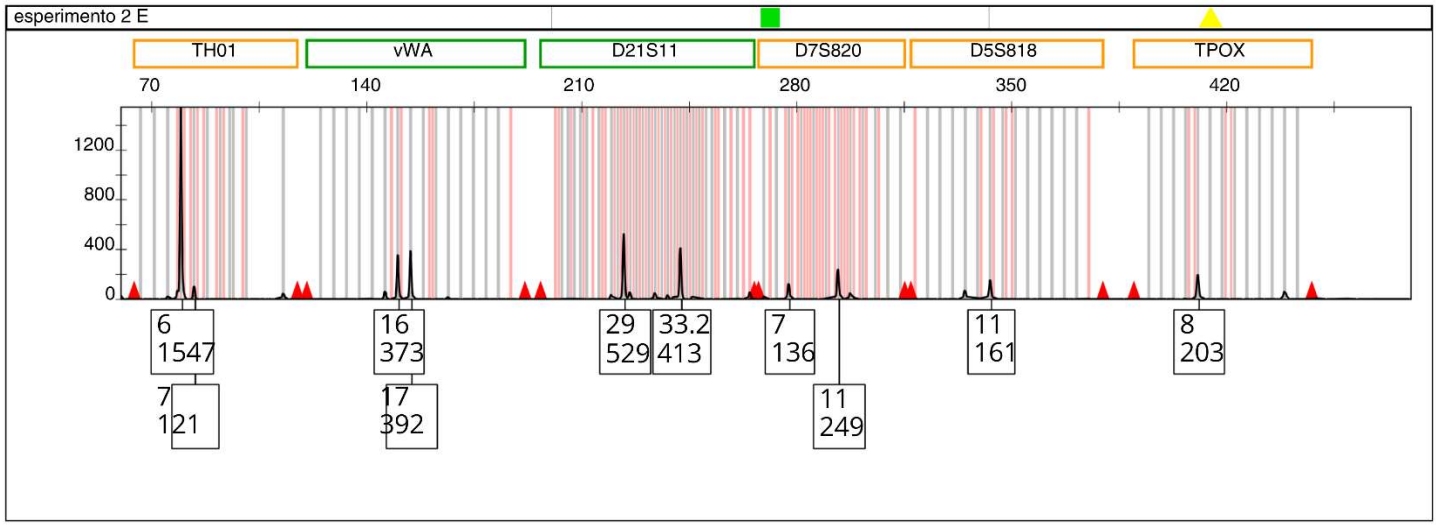
APPENDICE 3

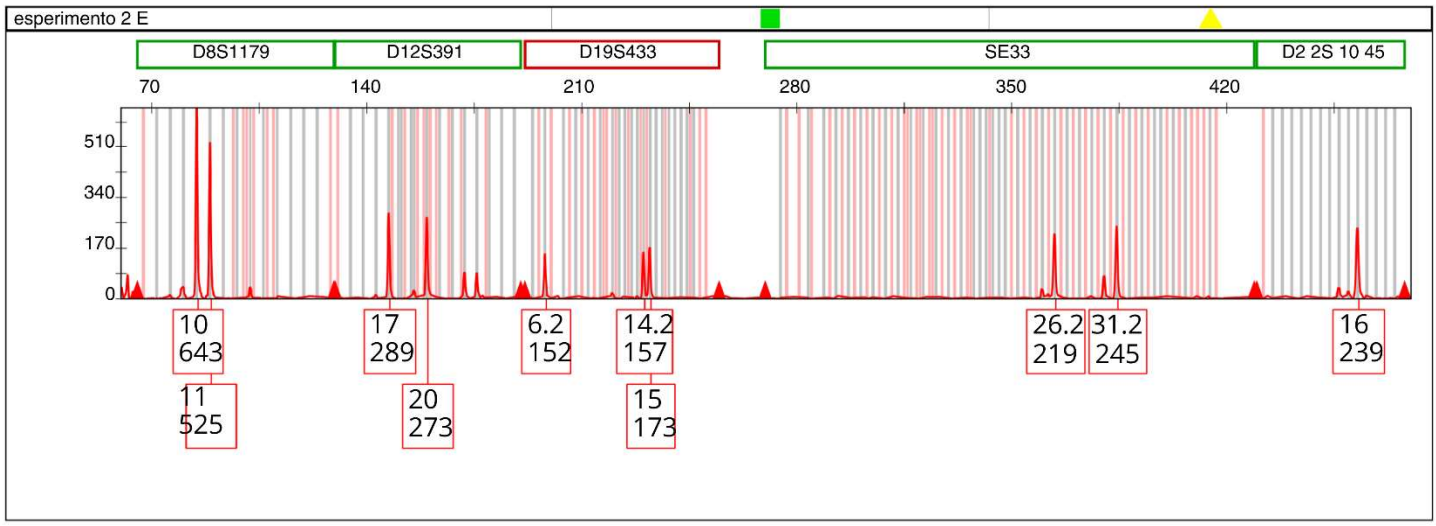
GeneMapper™ ID-X 1.6

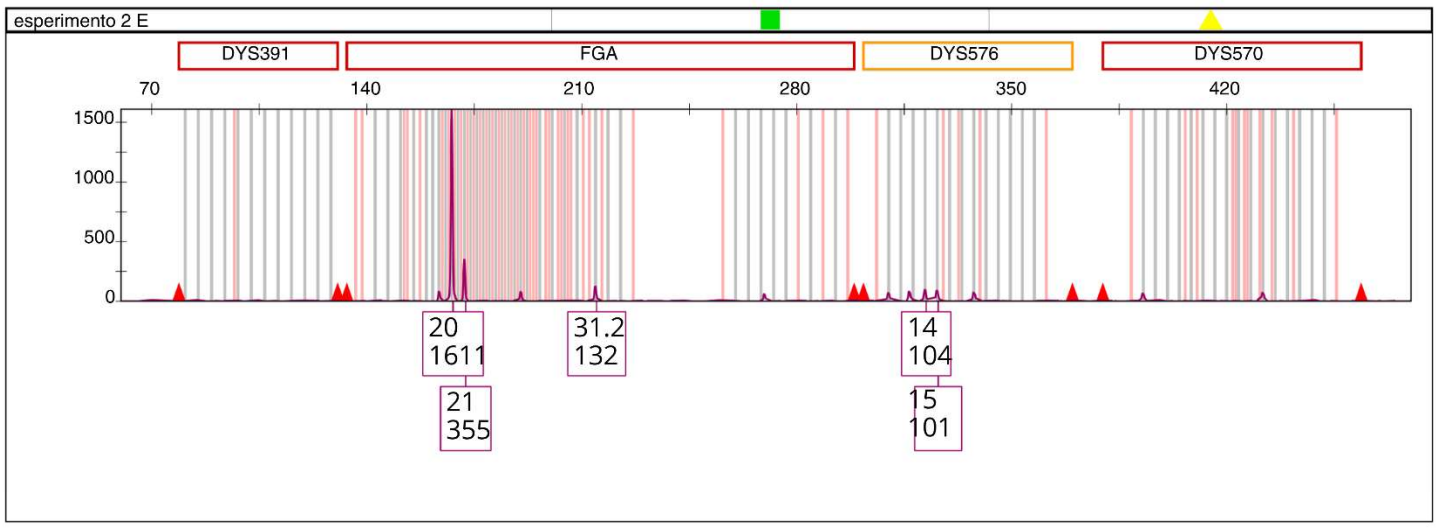


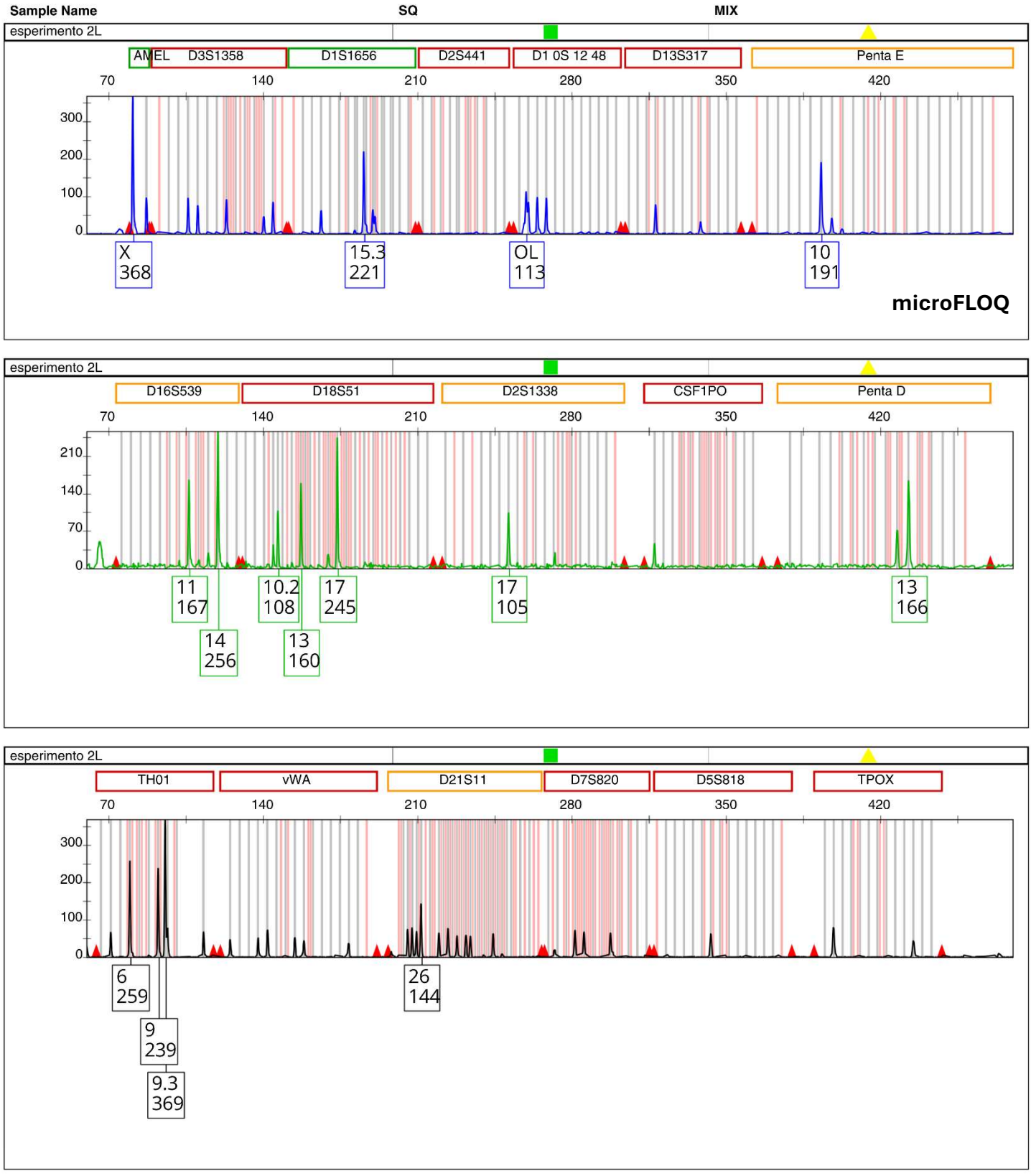


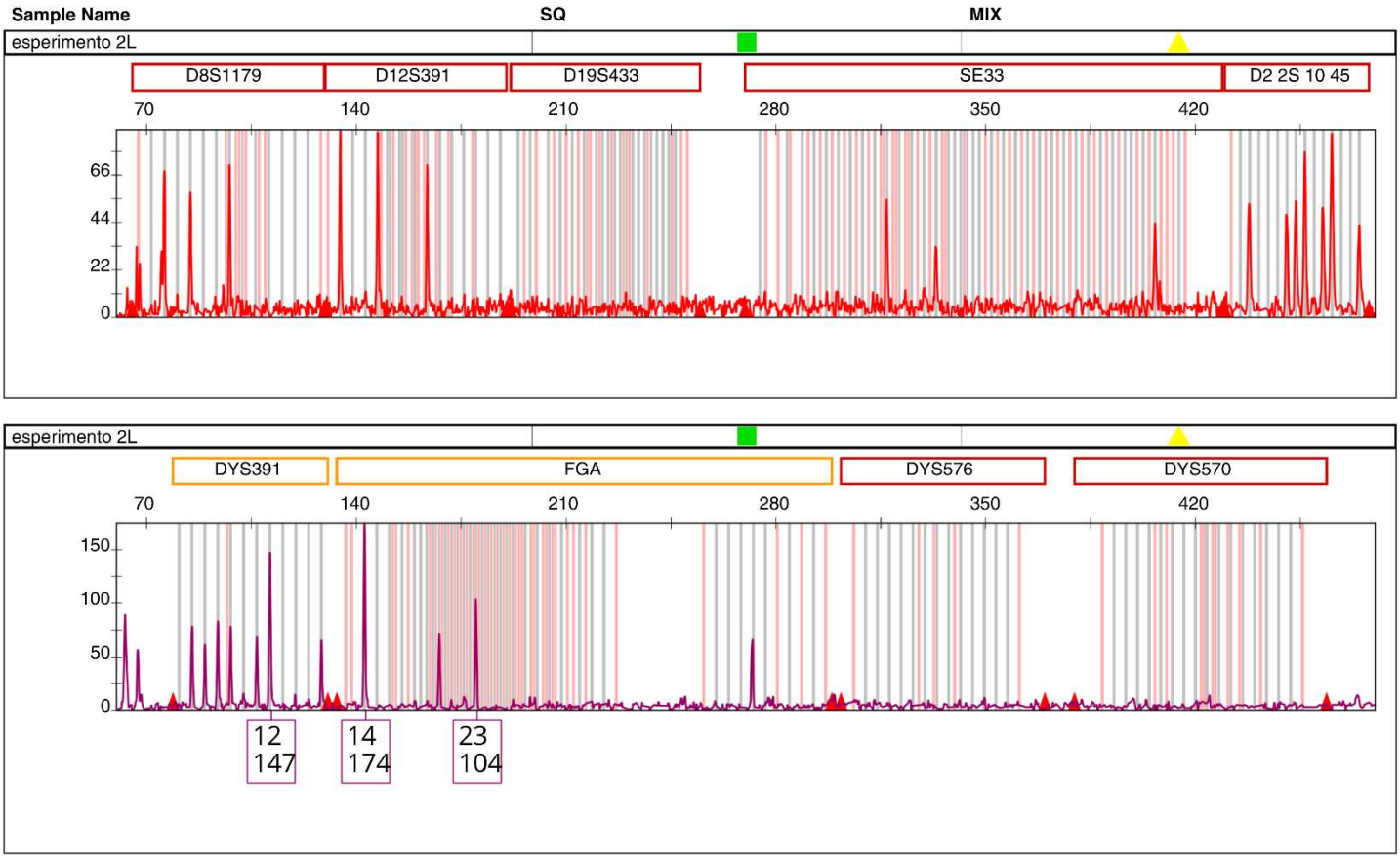
Sample Name **SQ** **MIX**



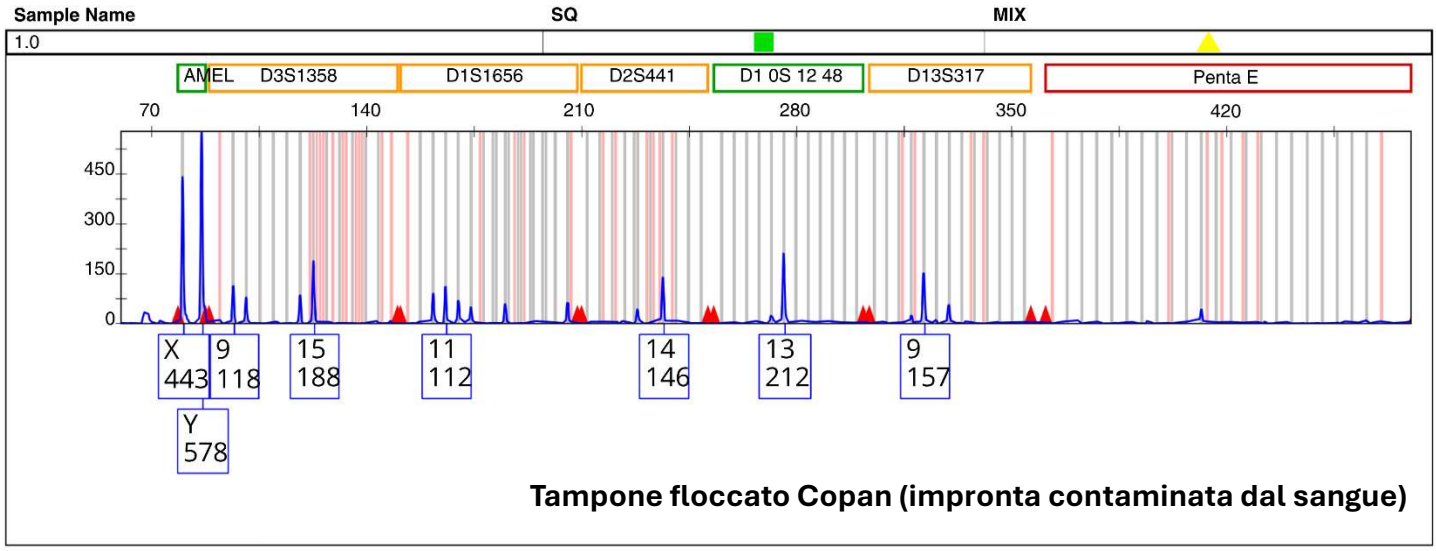




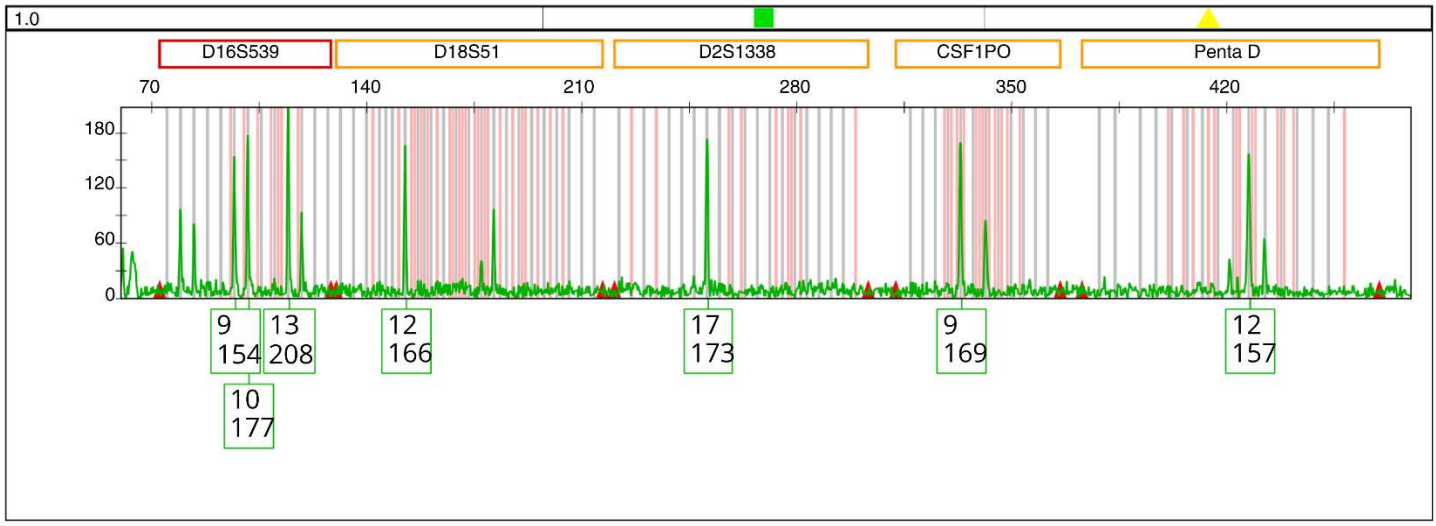

Sample Name
SQ
MIX
esperimento 2L
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
300
200
100
0
X
368
15.3
221
OL
113
10
191
microFLOQ
esperimento 2L
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
210
140
70
0
11
167
14
256
10.2
108
13
160
17
245
17
105
13
166
esperimento 2L
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
300
200
100
0
6
259
9
239
9.3
369
26
144


Sample Name
SQ
MIX
esperimento 2L
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
66
44
22
0
esperimento 2L
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
150
100
50
0
12
147
14
174
23
104

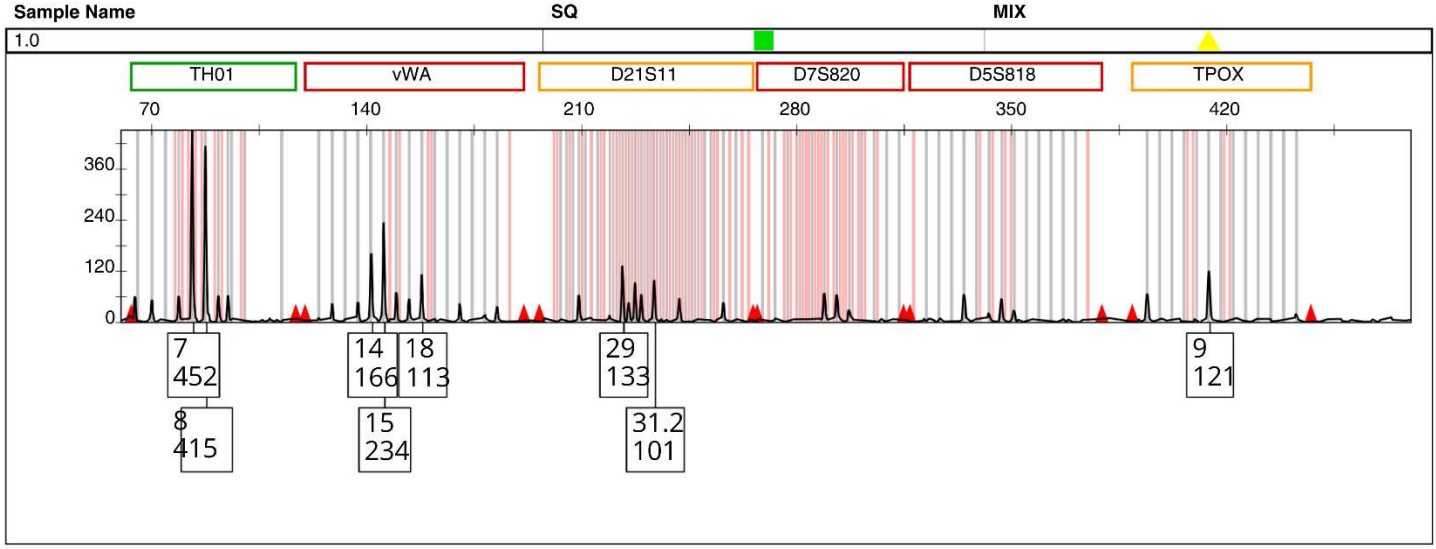
APPENDICE 4

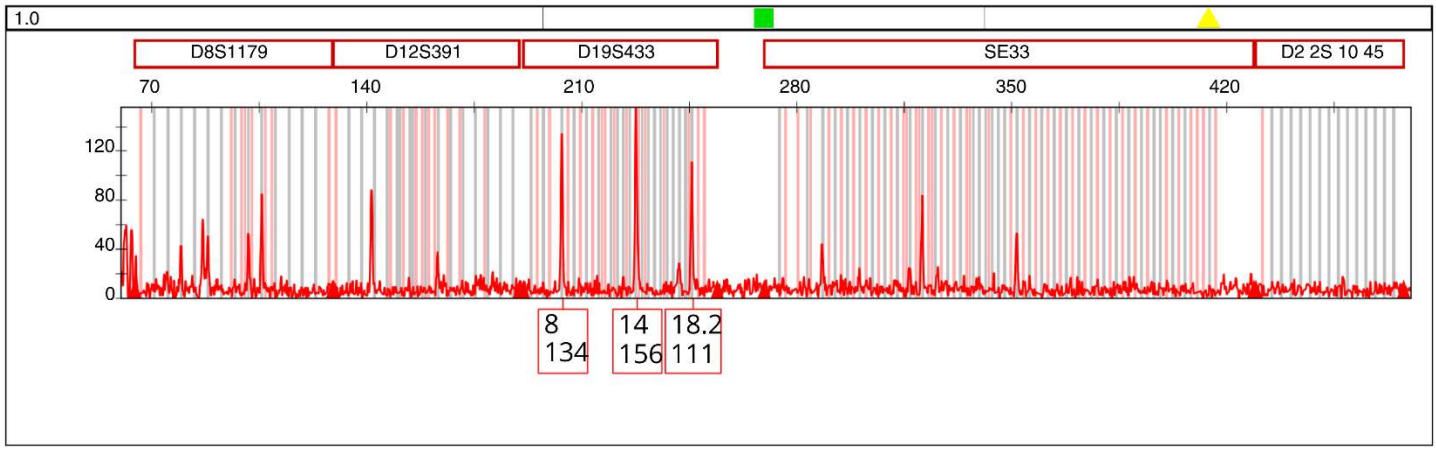


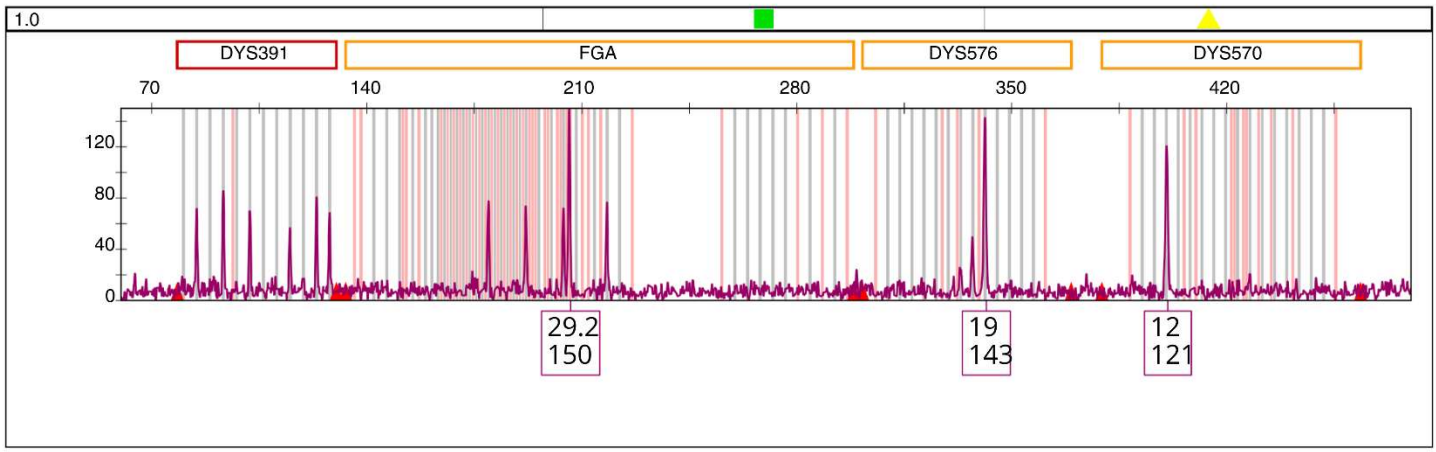
Tampone floccato Copan (impronta contaminata dal sangue)

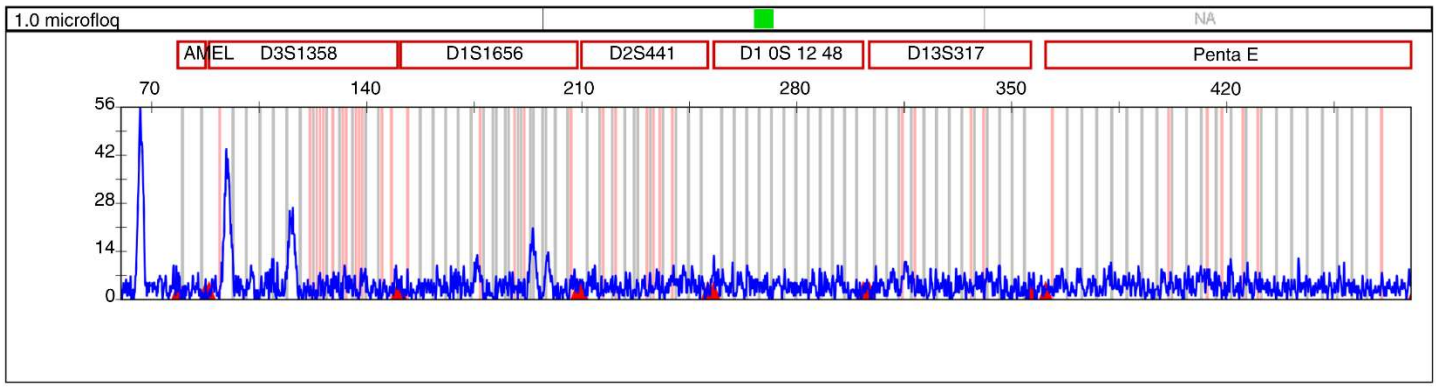


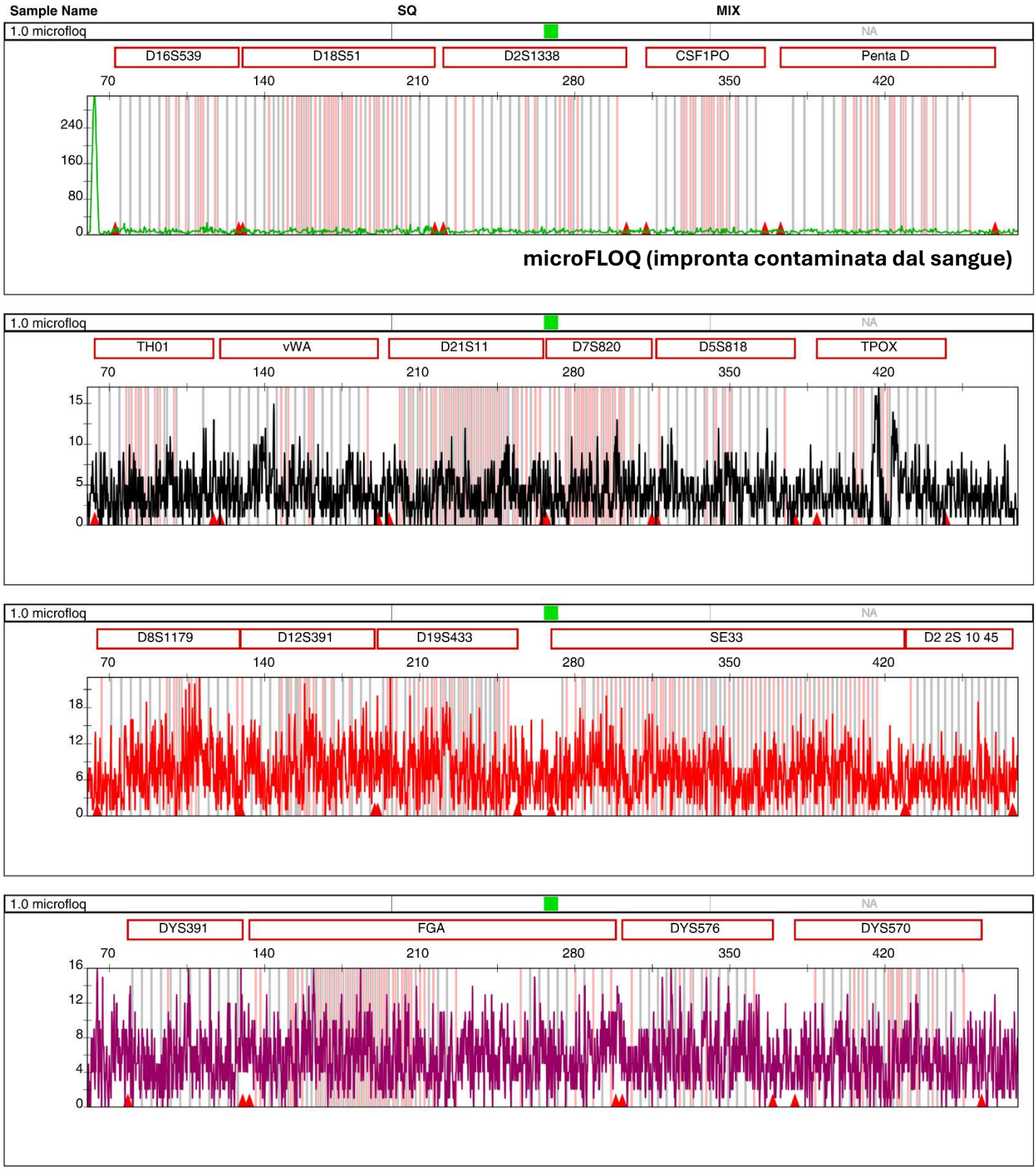
Sample Name **SQ** **MIX**



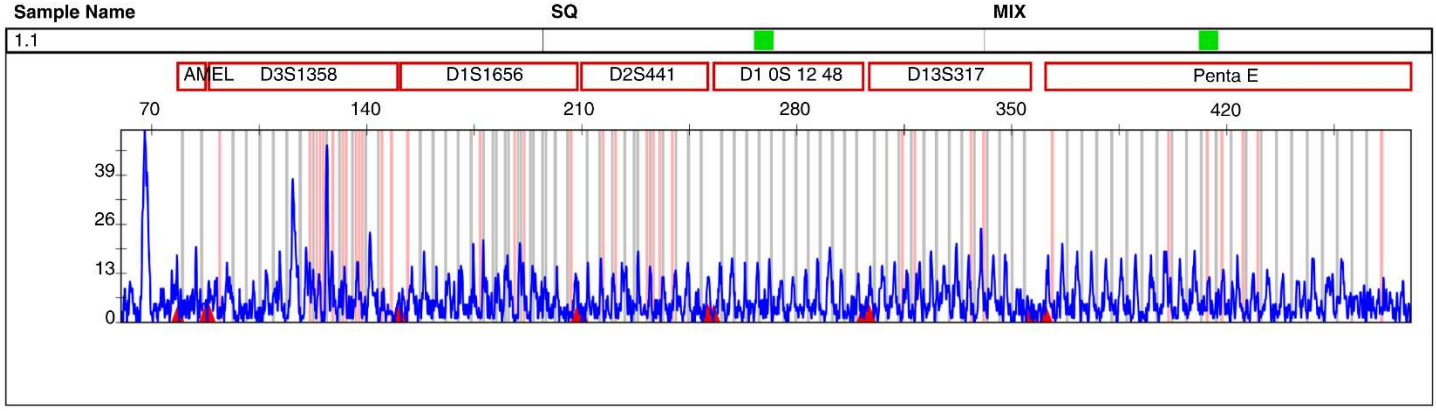


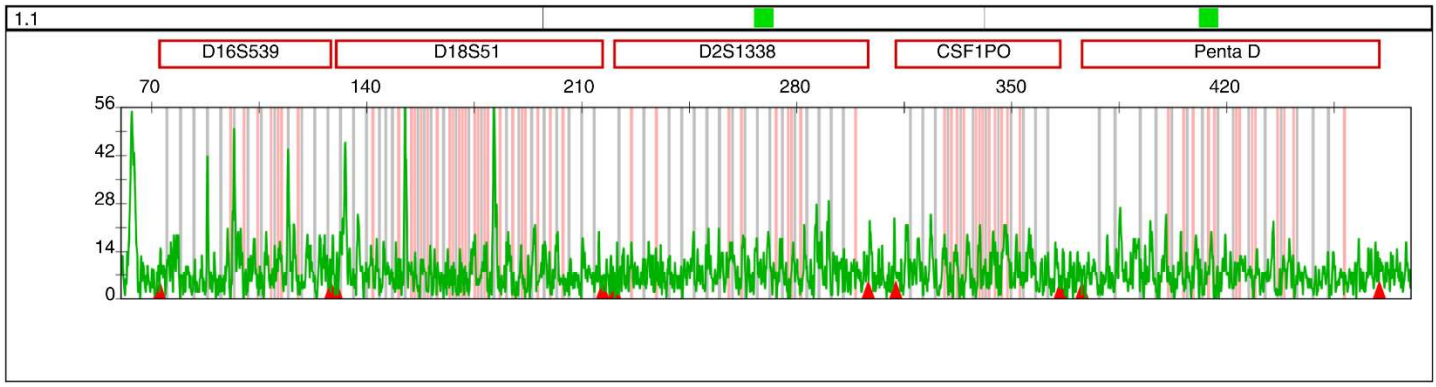


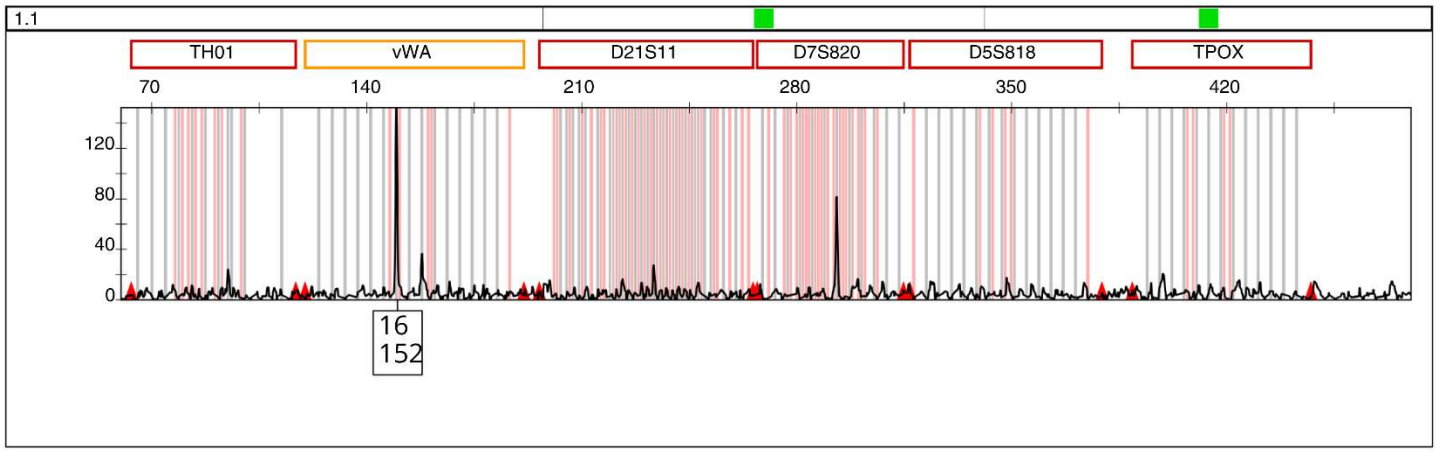


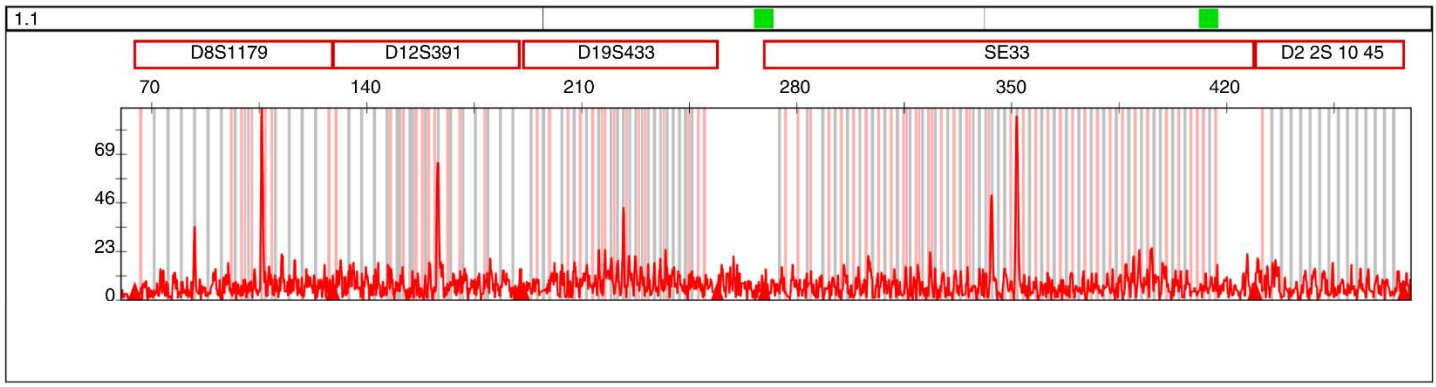

Sample Name
SQ
MIX
1.0 microfloq
NA
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
240
160
80
0
microFLOQ (impronta contaminata dal sangue)
1.0 microfloq
NA
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
15
10
5
0
1.0 microfloq
NA
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
18
12
6
0
1.0 microfloq
NA
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
16
12
8
4
0

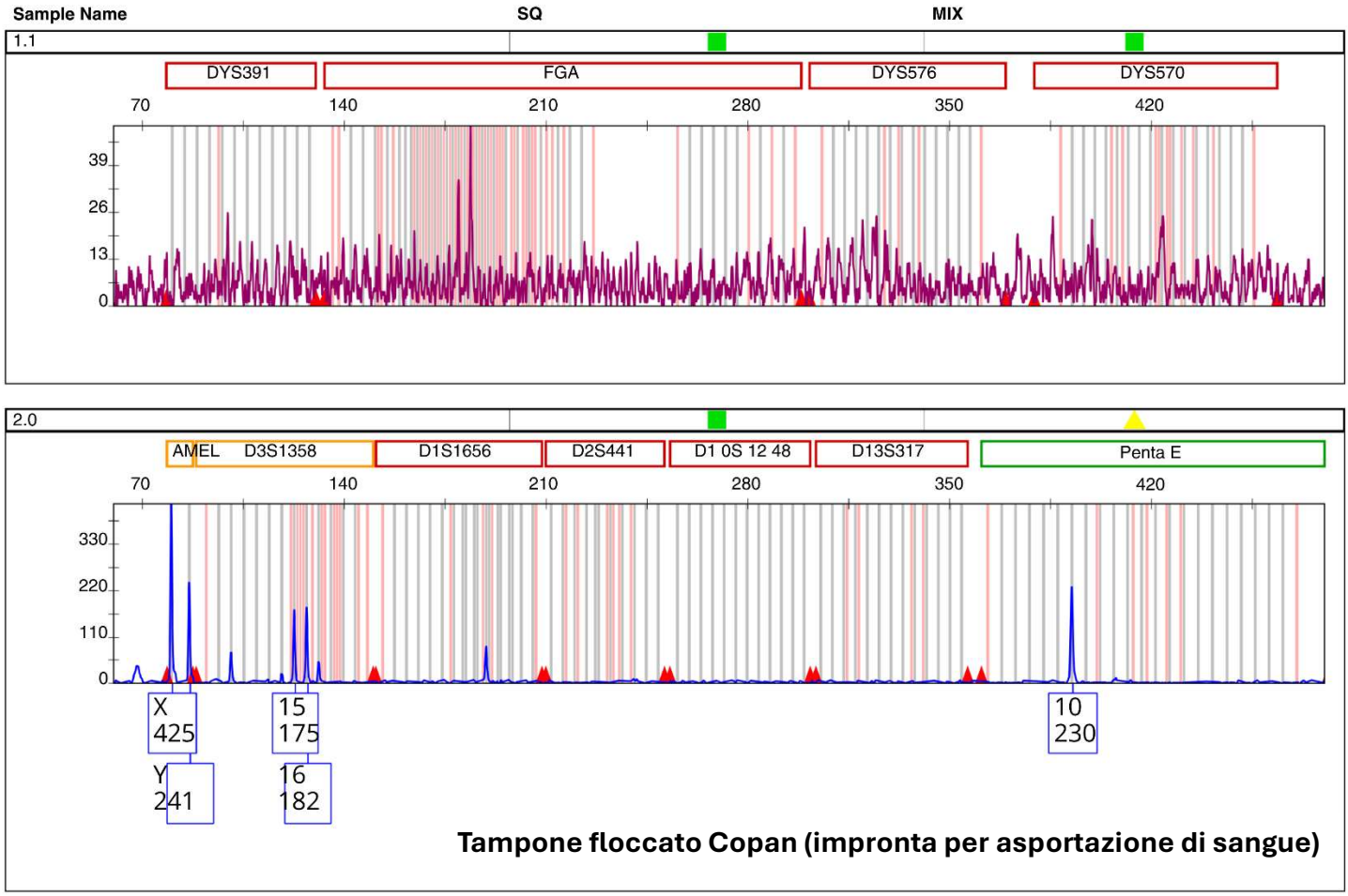
Sample Name **SQ** **MIX**

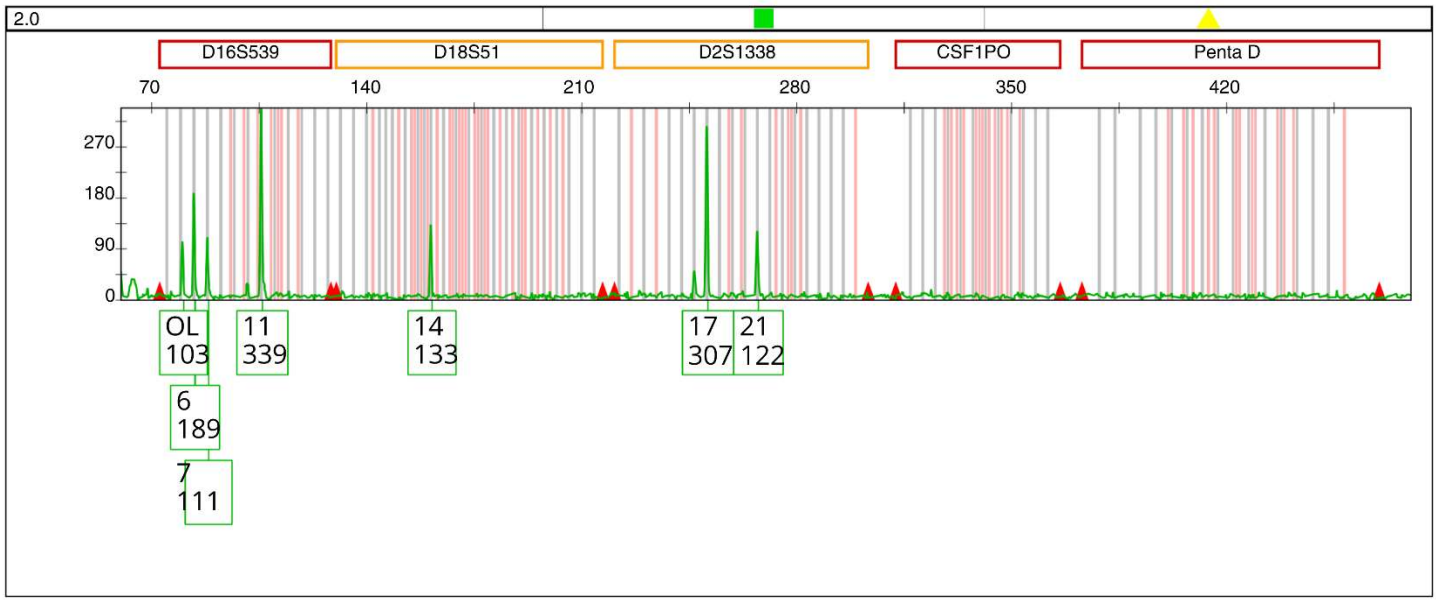




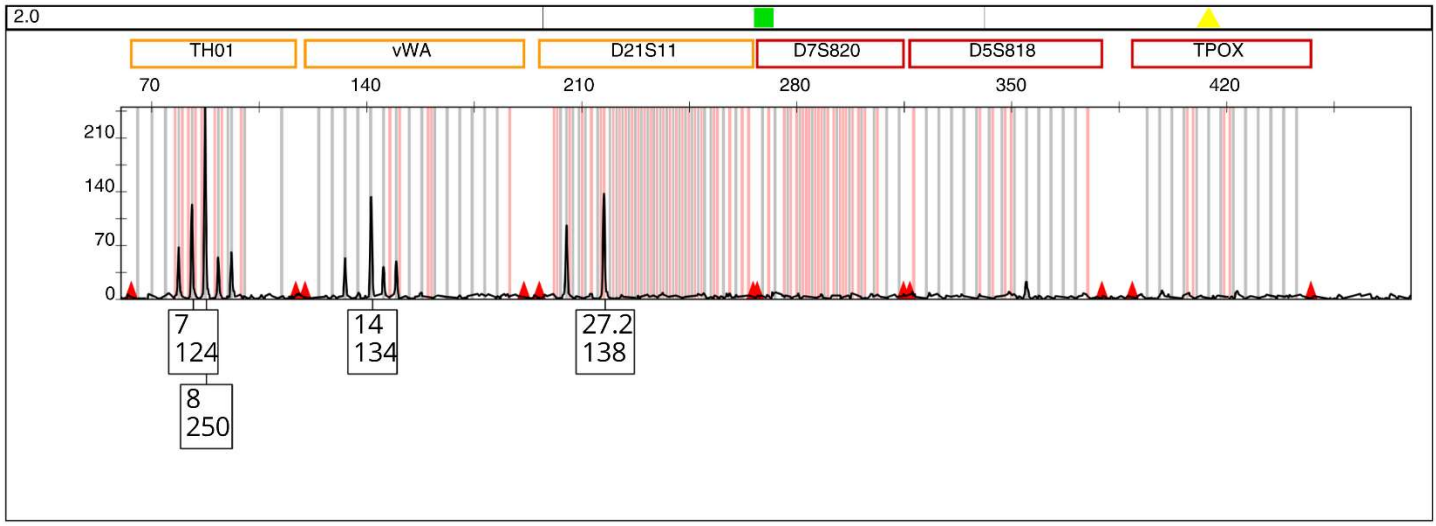


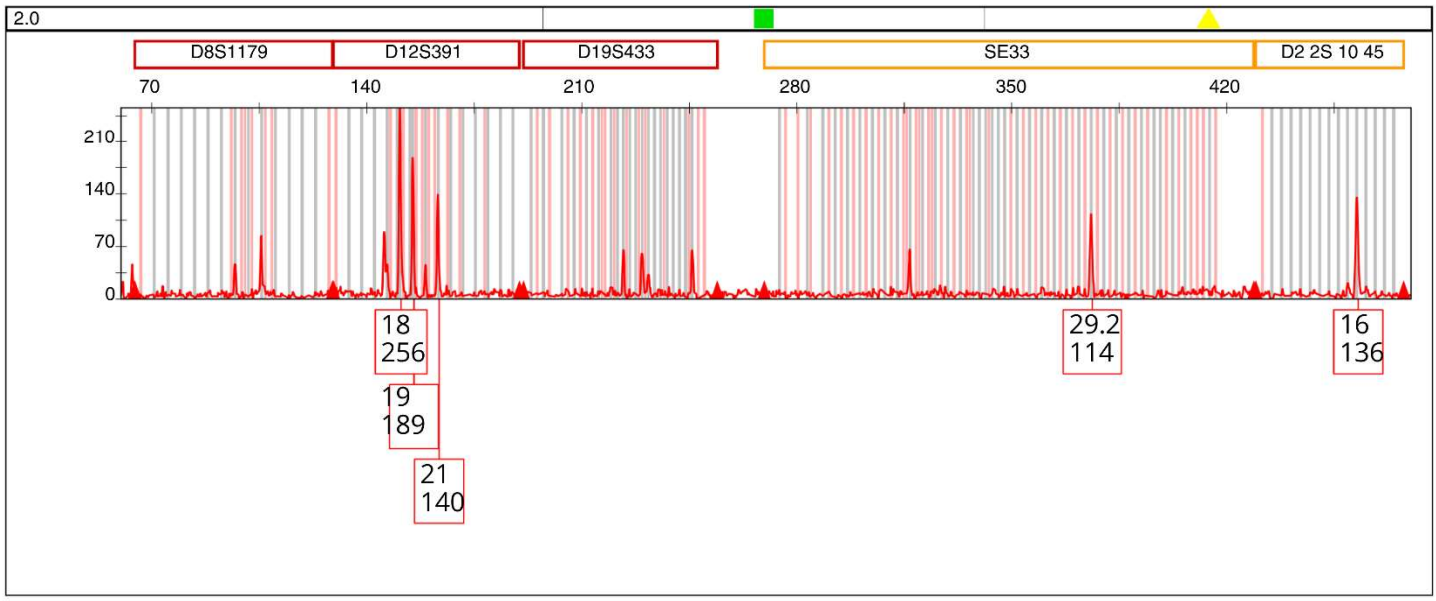


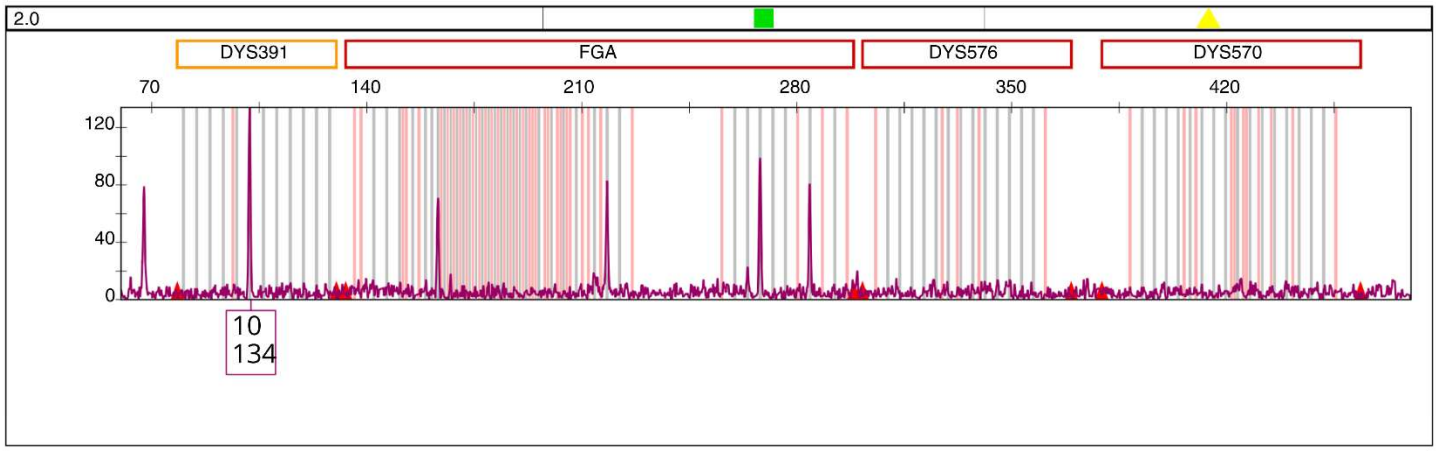

Sample Name
SQ
MIX
1.1
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
39
26
13
0
2.0
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
330
220
110
X
425
Y
241
15
175
16
182
10
230
Tampone floccato Copan (impronta per asportazione di sangue)

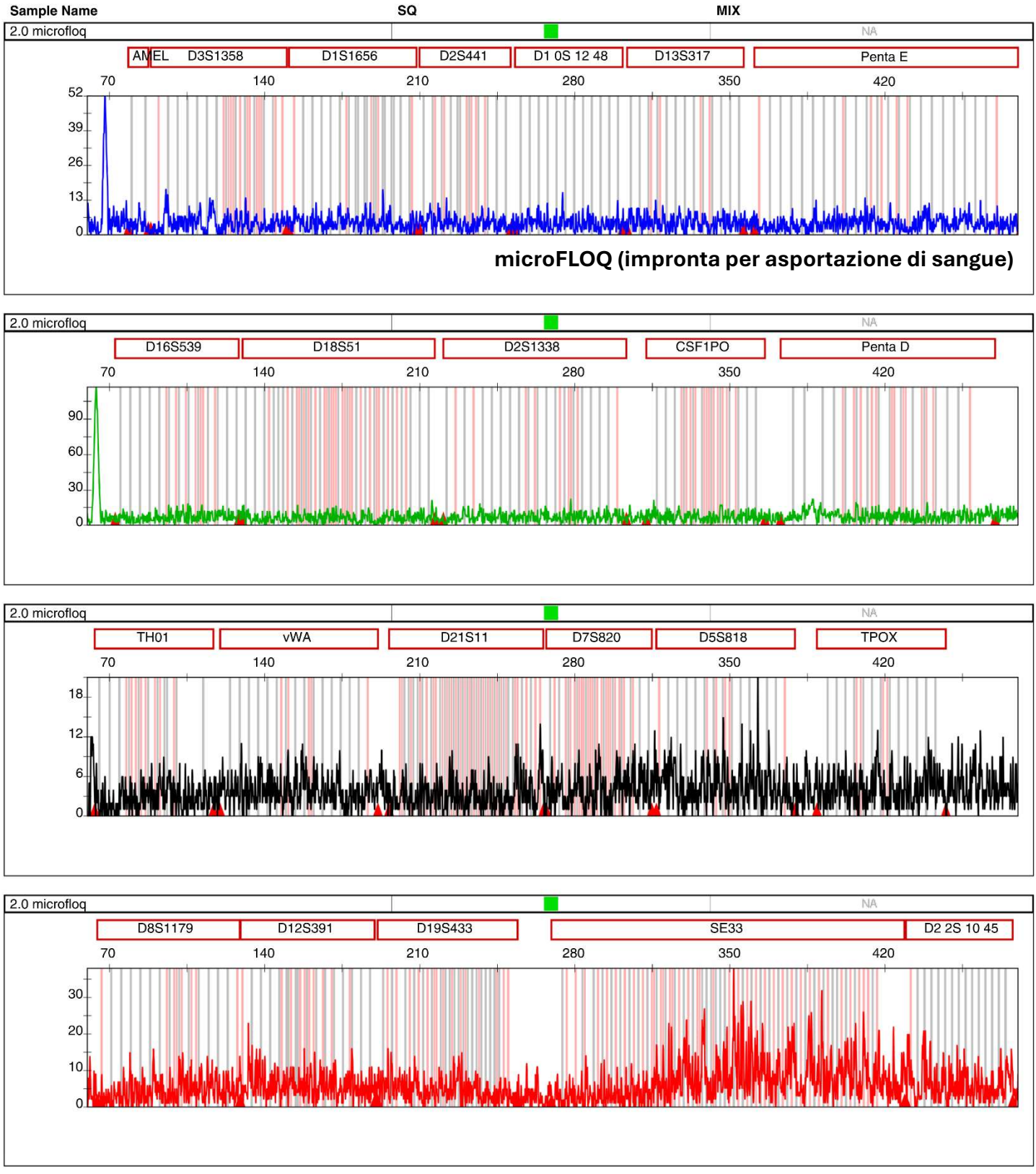

2.0
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
270
180
90
0
OL
103
6
189
7
111
11
339
14
133
17
307
21
122

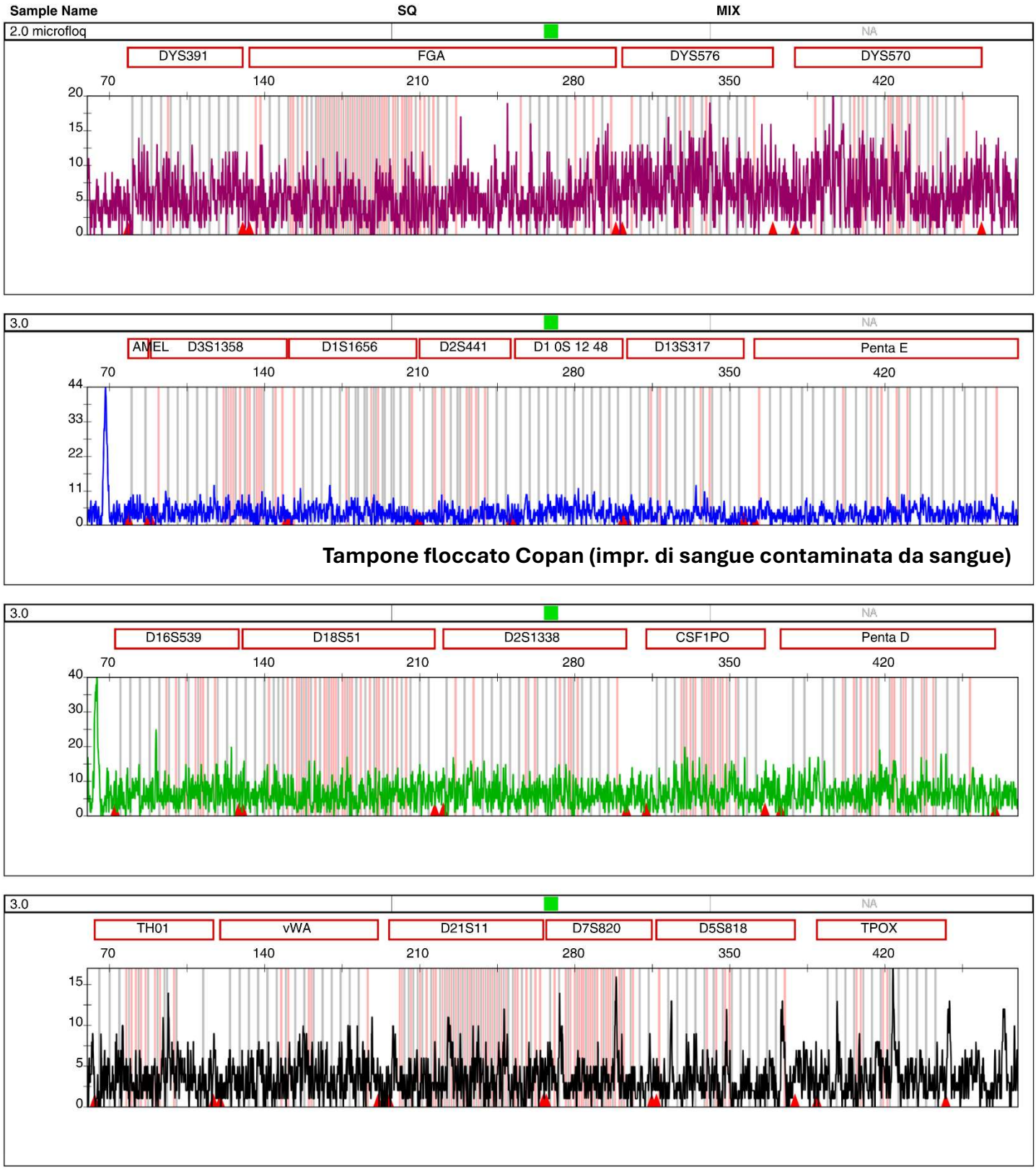
Sample Name **SQ** **MIX**

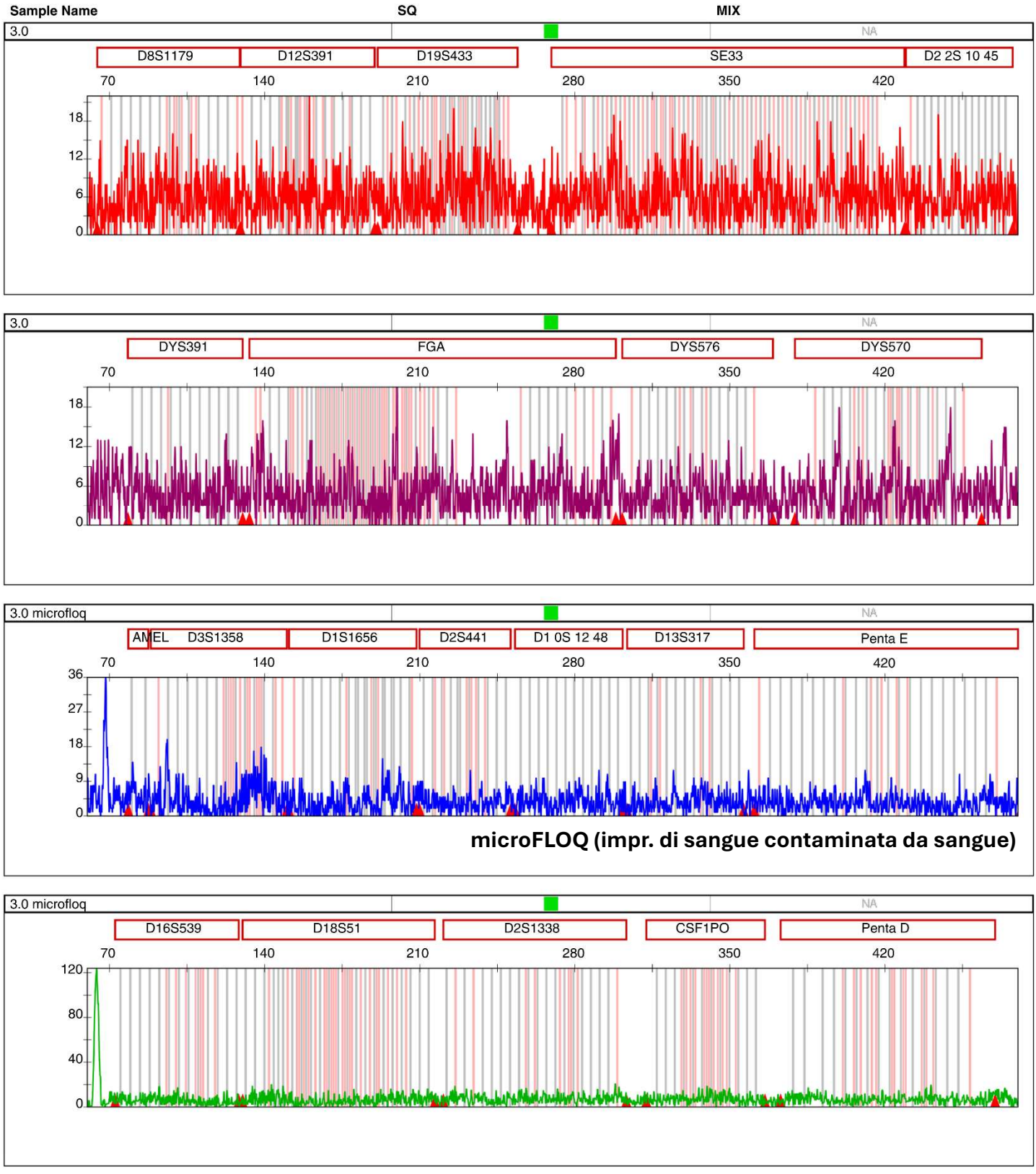




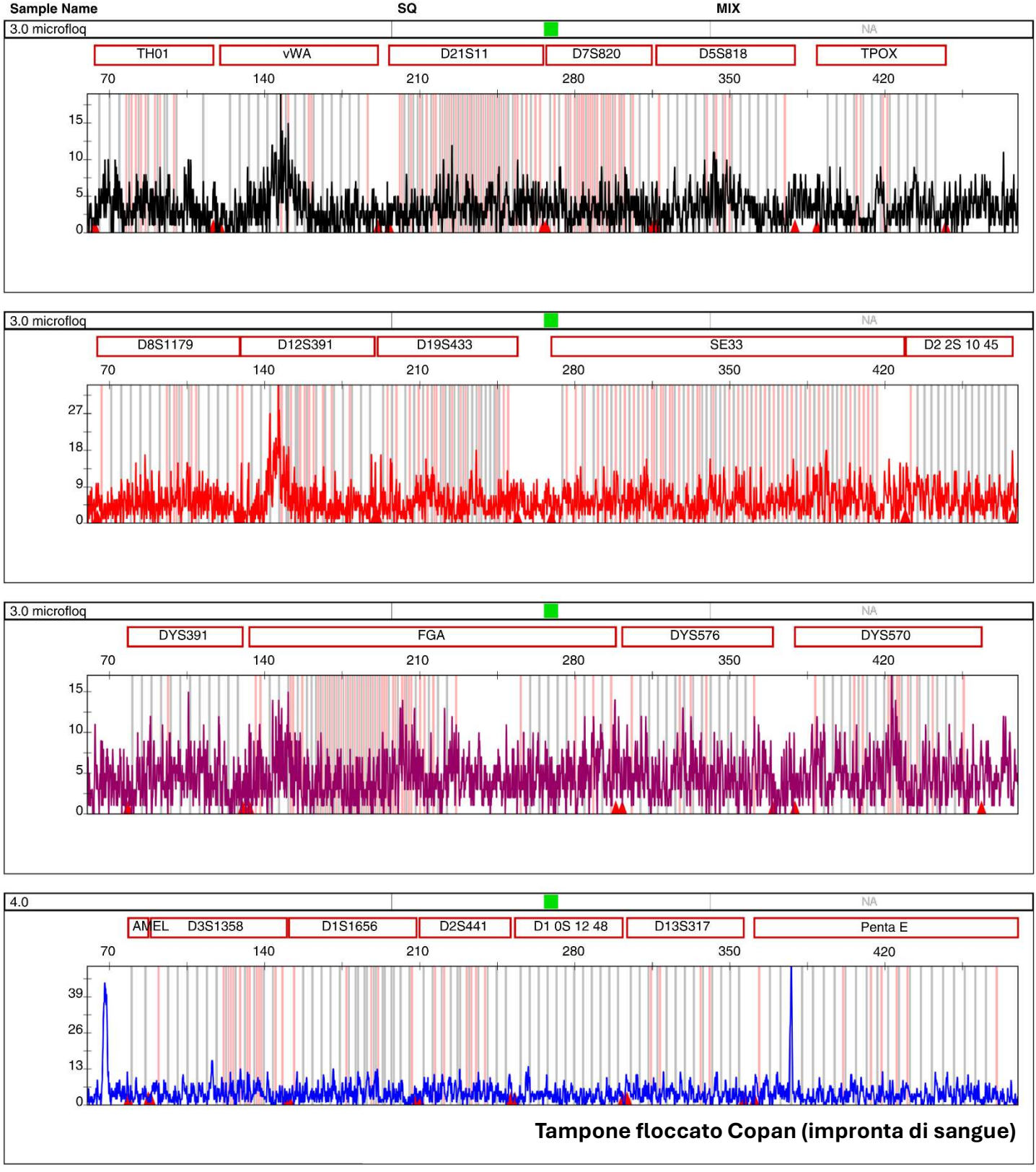



Sample Name
SQ
MIX
2.0 microfloq
NA
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
52
39
26
13
0
microFLOQ (impronta per asportazione di sangue)
2.0 microfloq
NA
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
90
60
30
0
2.0 microfloq
NA
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
18
12
6
0
2.0 microfloq
NA
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
30
20
10
0


Sample Name
SQ
MIX
2.0 microfloq
NA
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
20
15
10
5
0
3.0
NA
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
44
33
22
11
Tampone floccato Copan (impr. di sangue contaminata da sangue)
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
40
30
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX

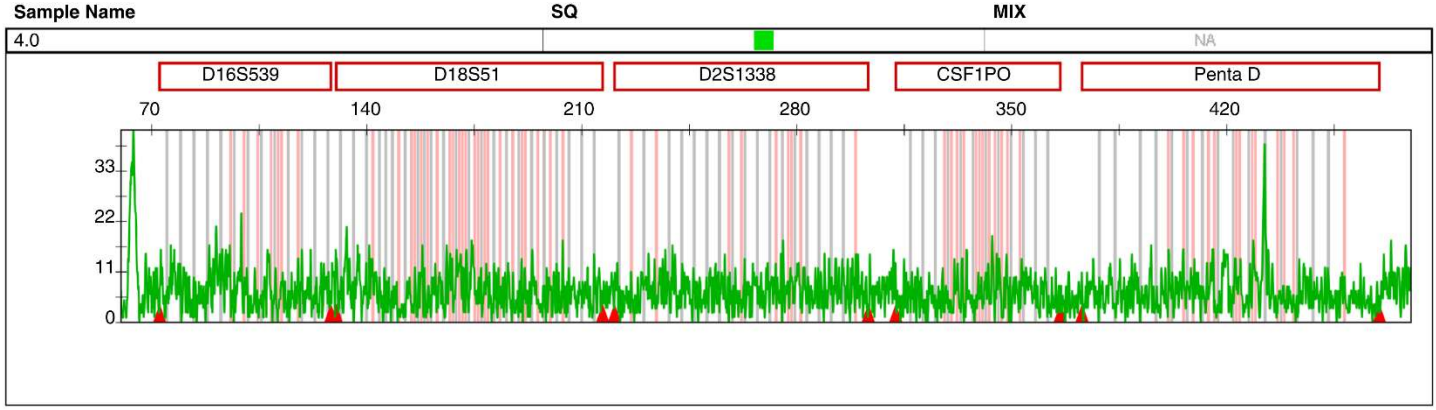

Sample Name
SQ
MIX
3.0
NA
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
18
12
6
0
3.0
NA
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
18
12
6
0
3.0 microfloq
NA
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
36
27
18
9
0
microFLOQ (impr. di sangue contaminata da sangue)
3.0 microfloq
NA
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
120
80
40
0

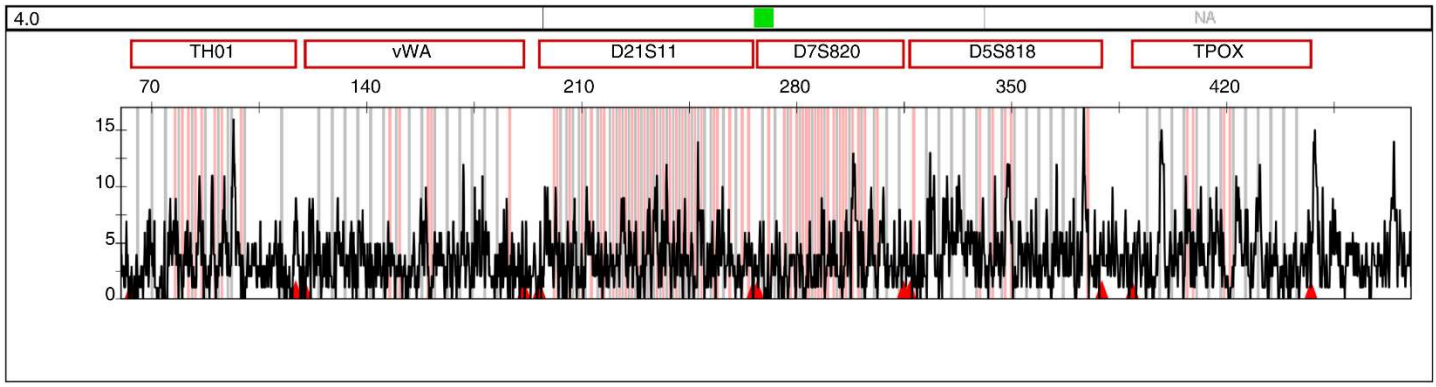
Sample Name **SQ** **MIX**

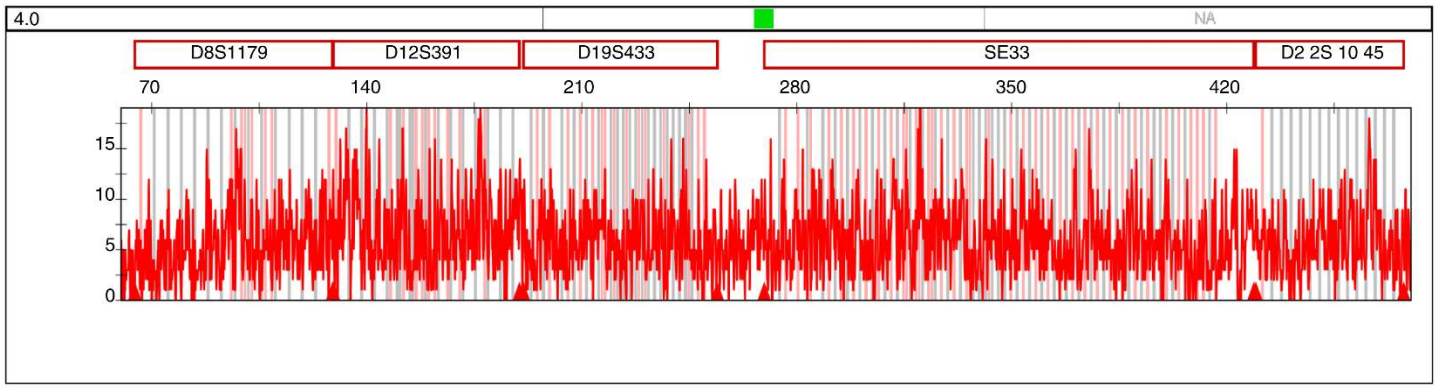


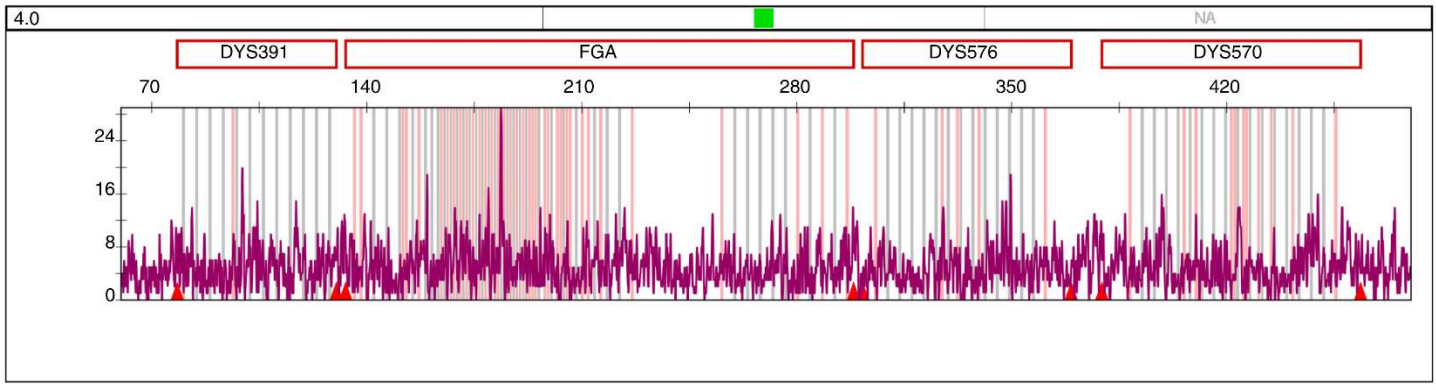
Tampone floccato Copan (impronta di sangue)

Sample Name **SQ** **MIX**

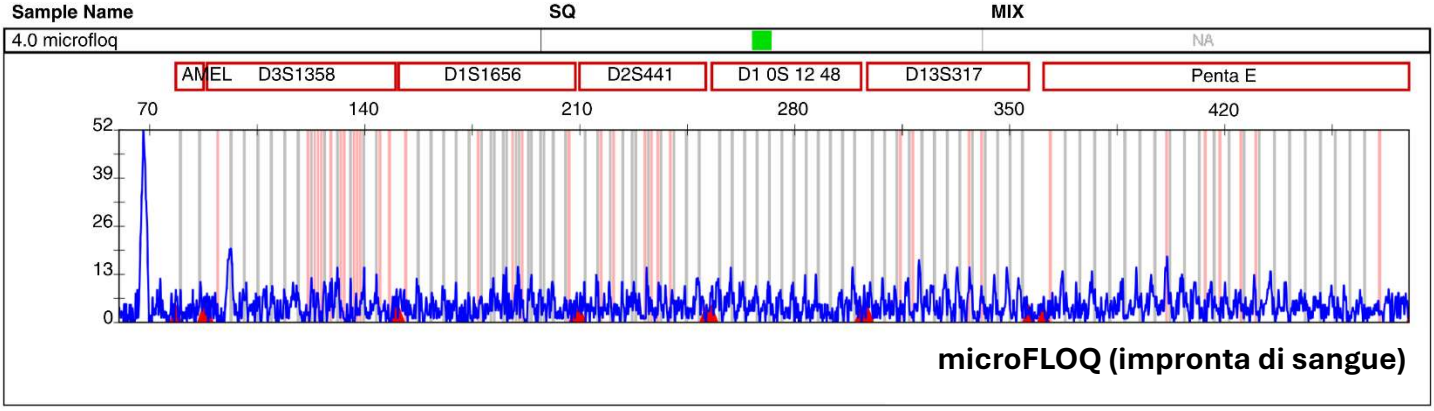




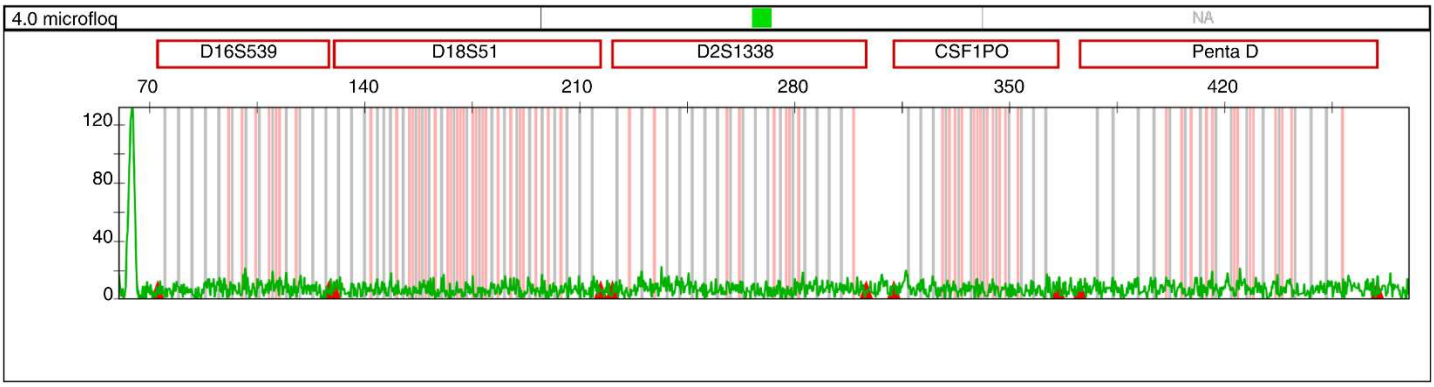


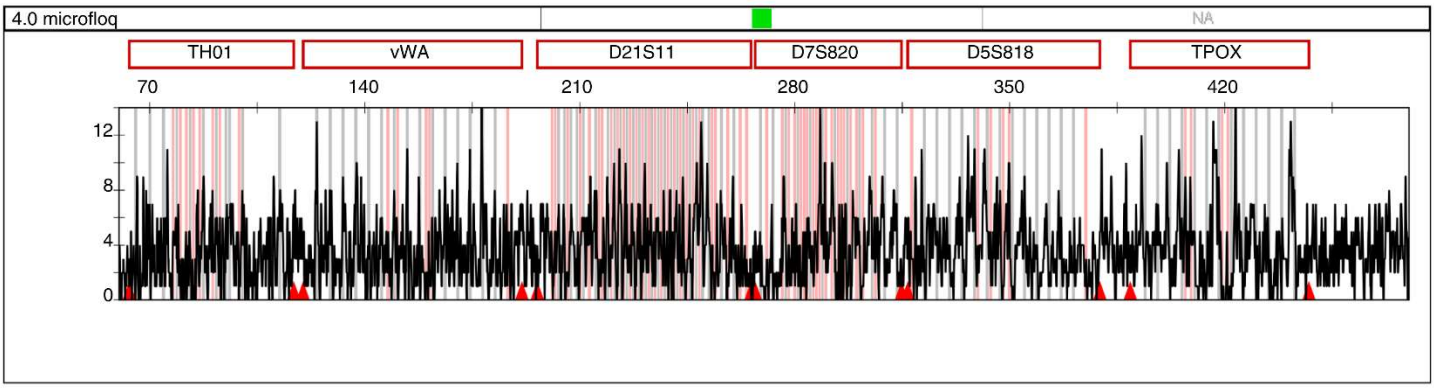


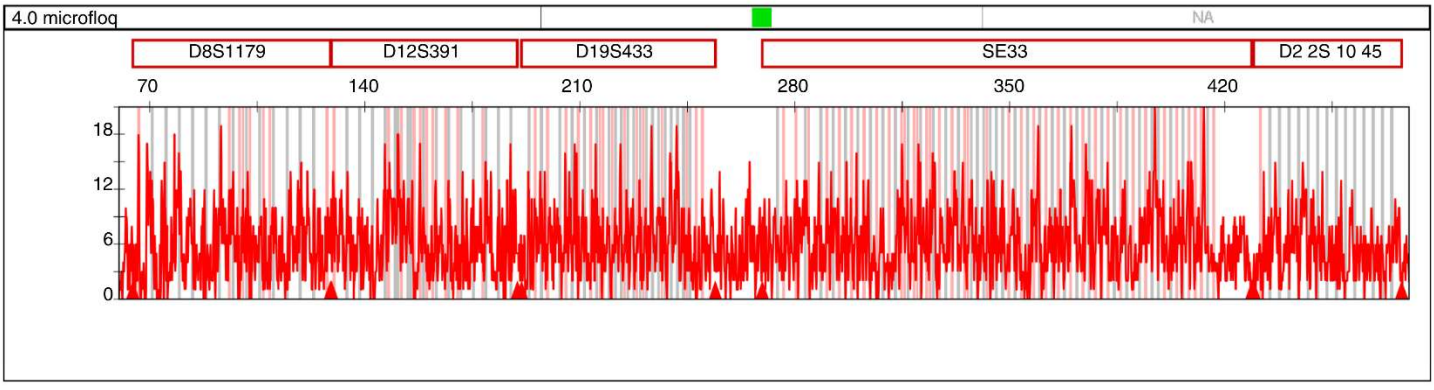
Sample Name **SQ** **MIX**

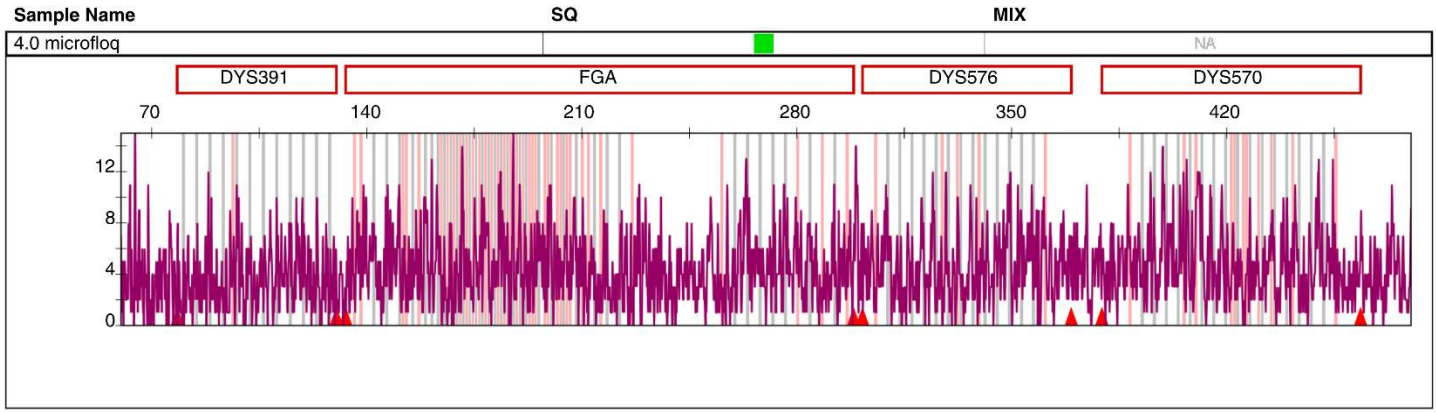


microFLOQ (impronta di sangue)



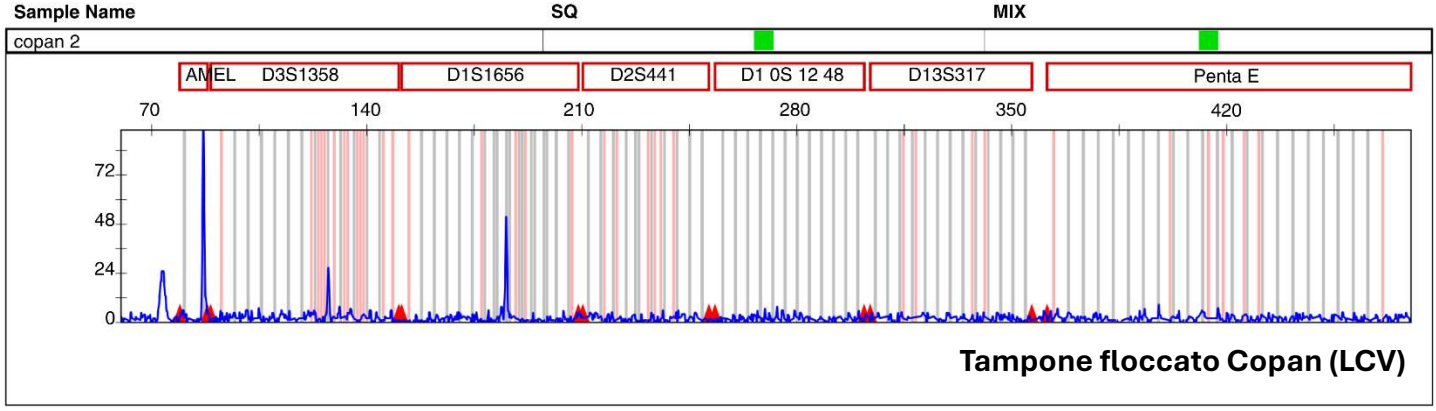




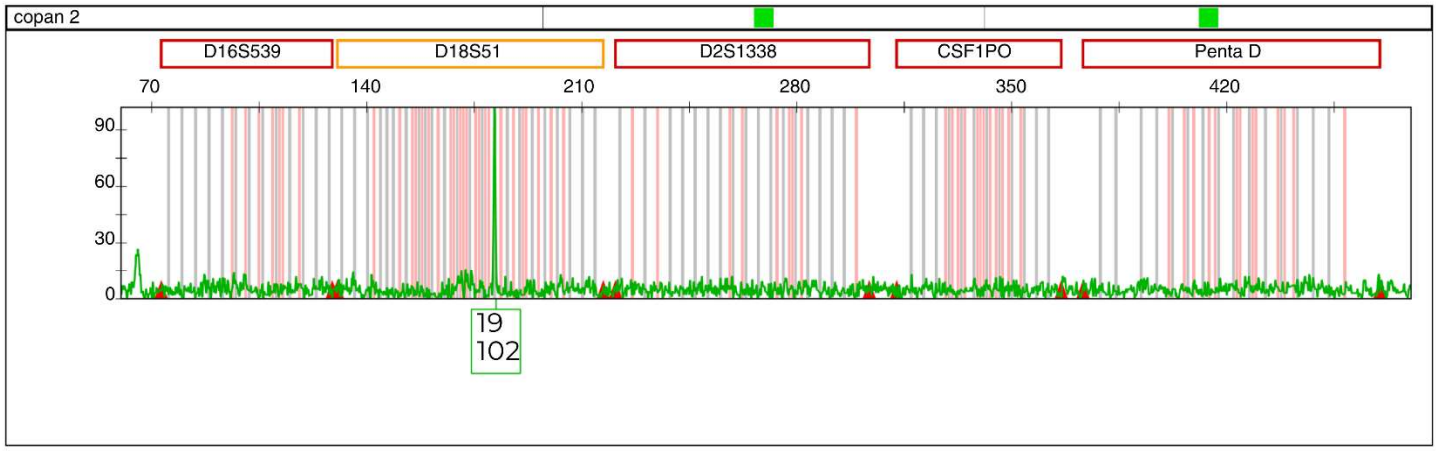

Sample Name
SQ
MIX
4.0 microfloq
NA
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
12
8
4
0

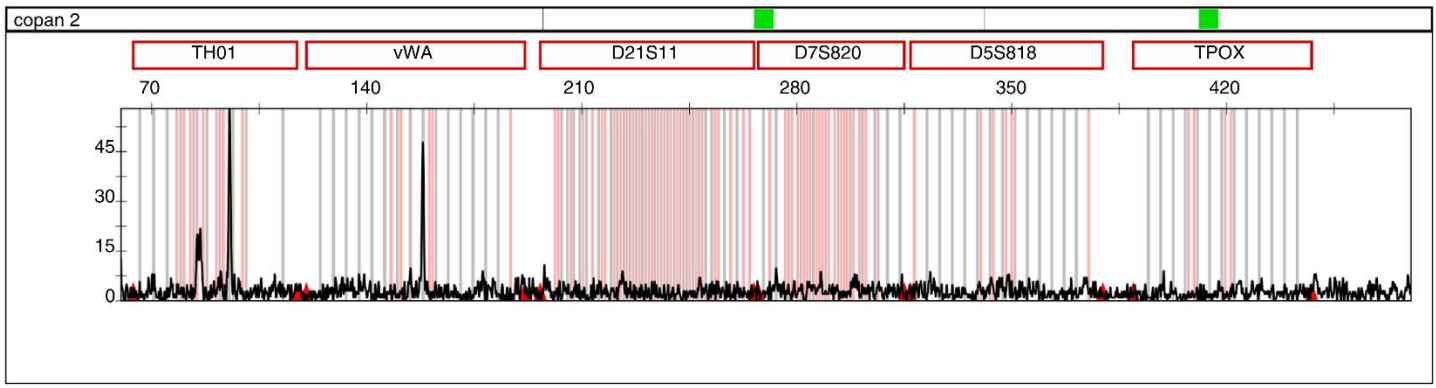
APPENDICE 5

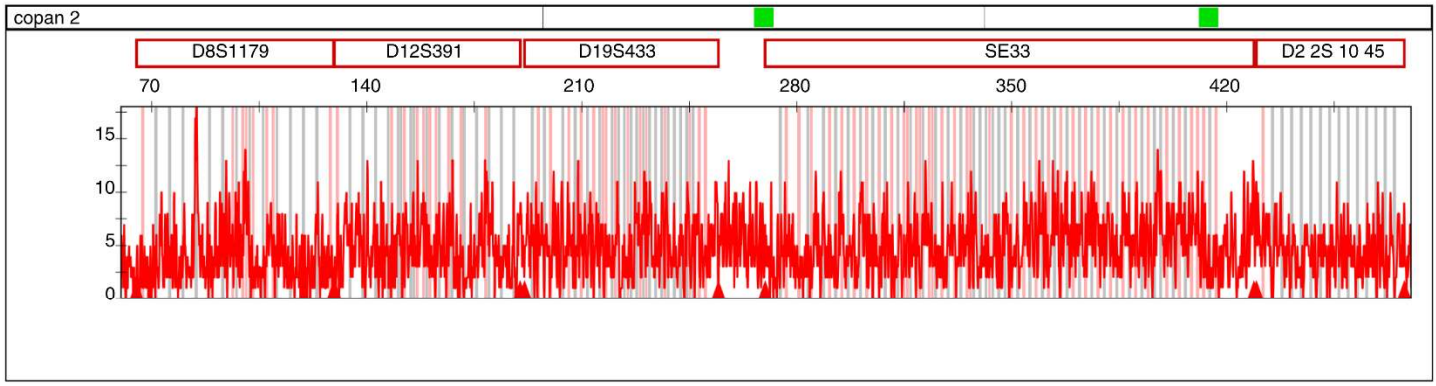
Sample Name **SQ** **MIX**



Tampone floccato Copan (LCV)

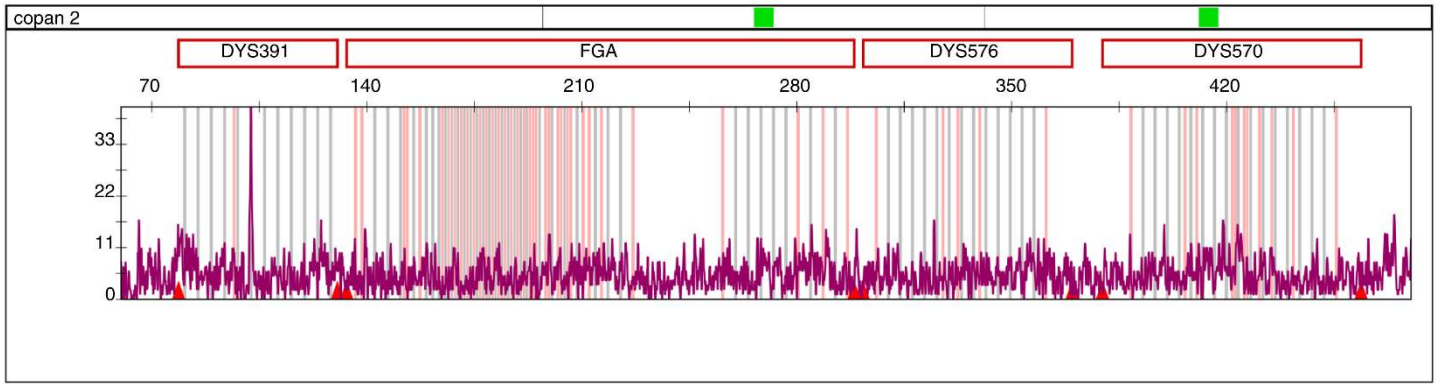


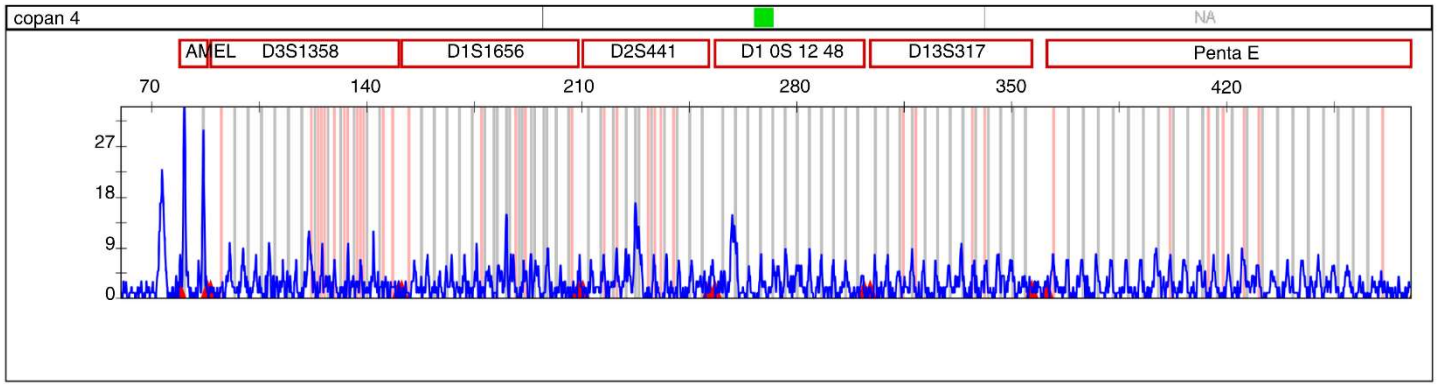


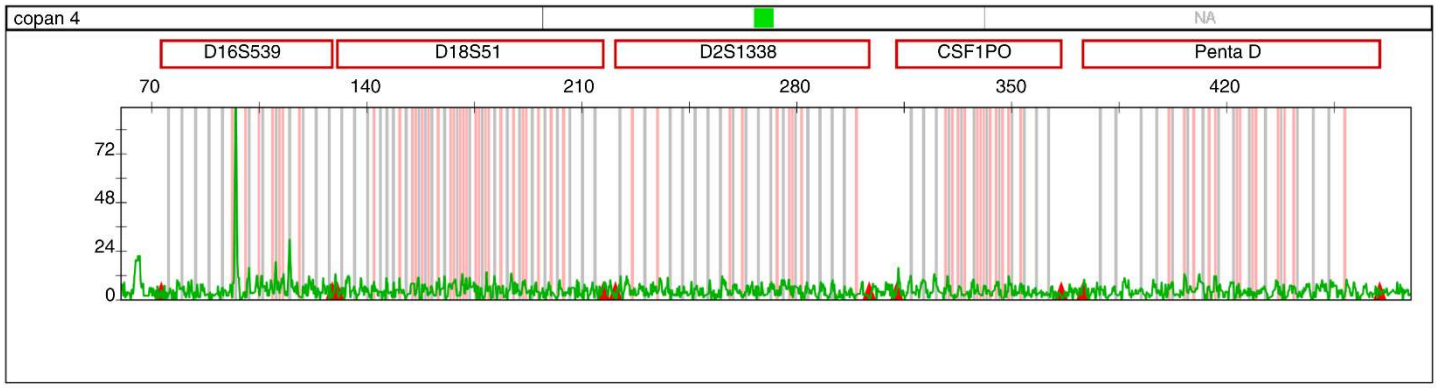


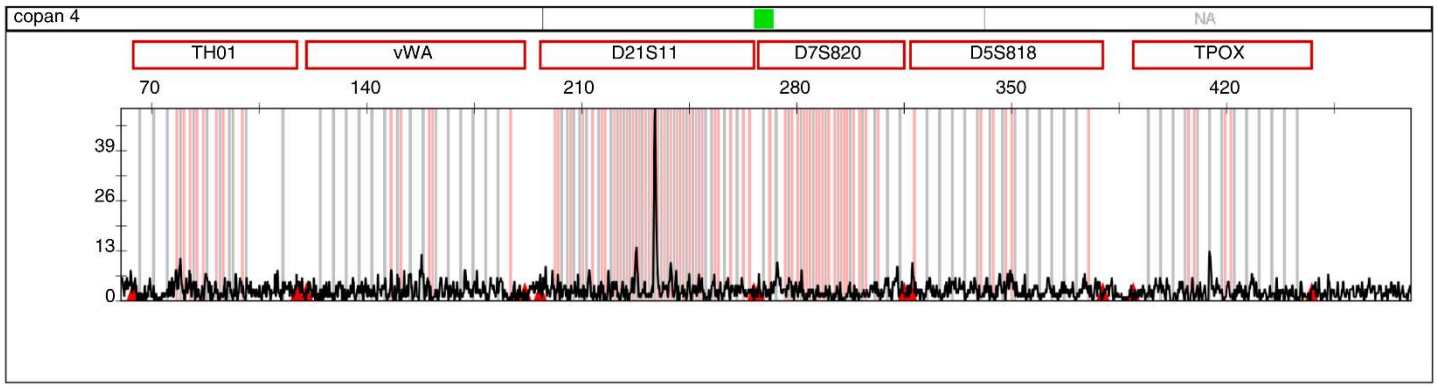
GeneMapper™ ID-X 1.6

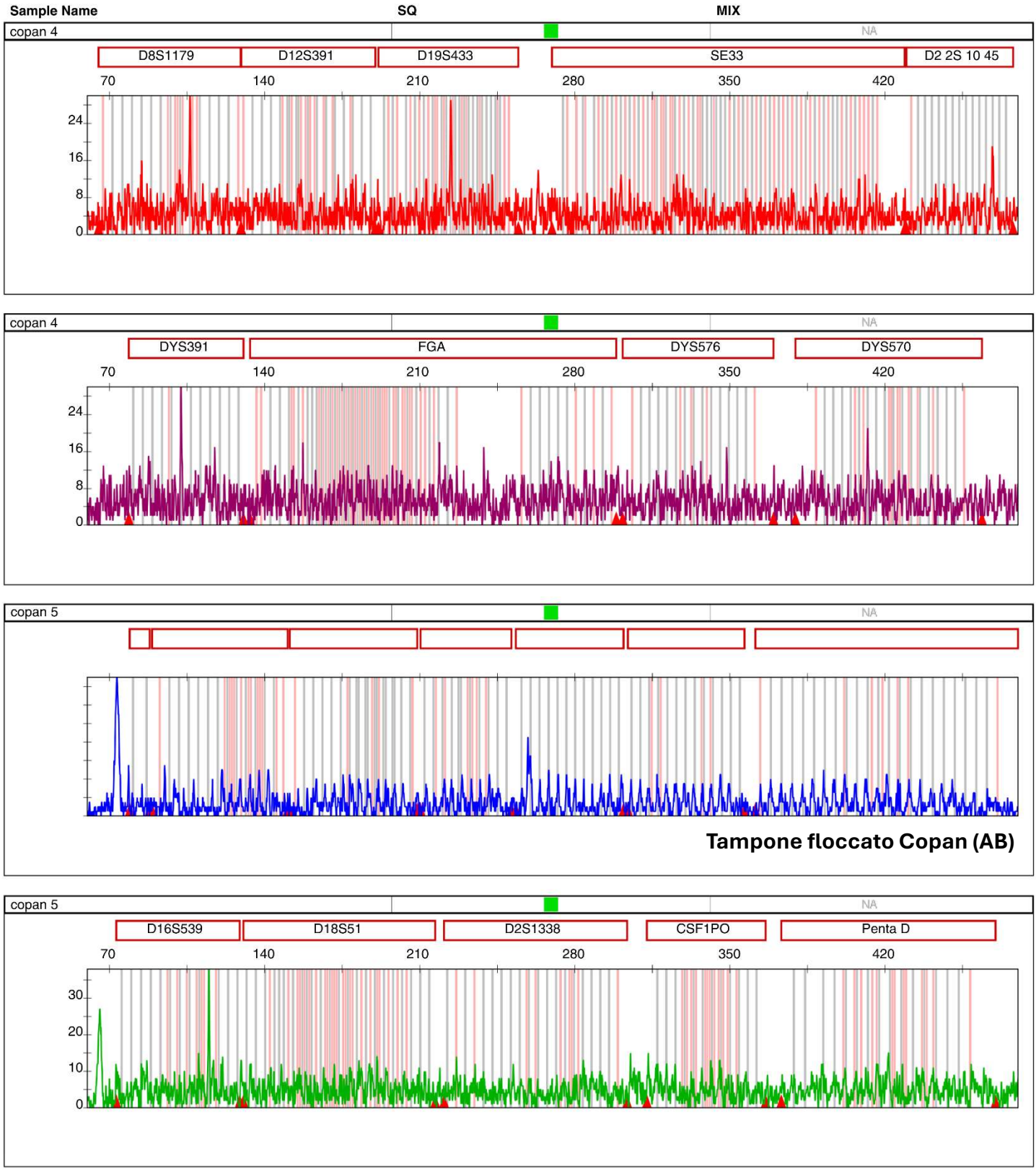
Sample Name **SQ** **MIX**

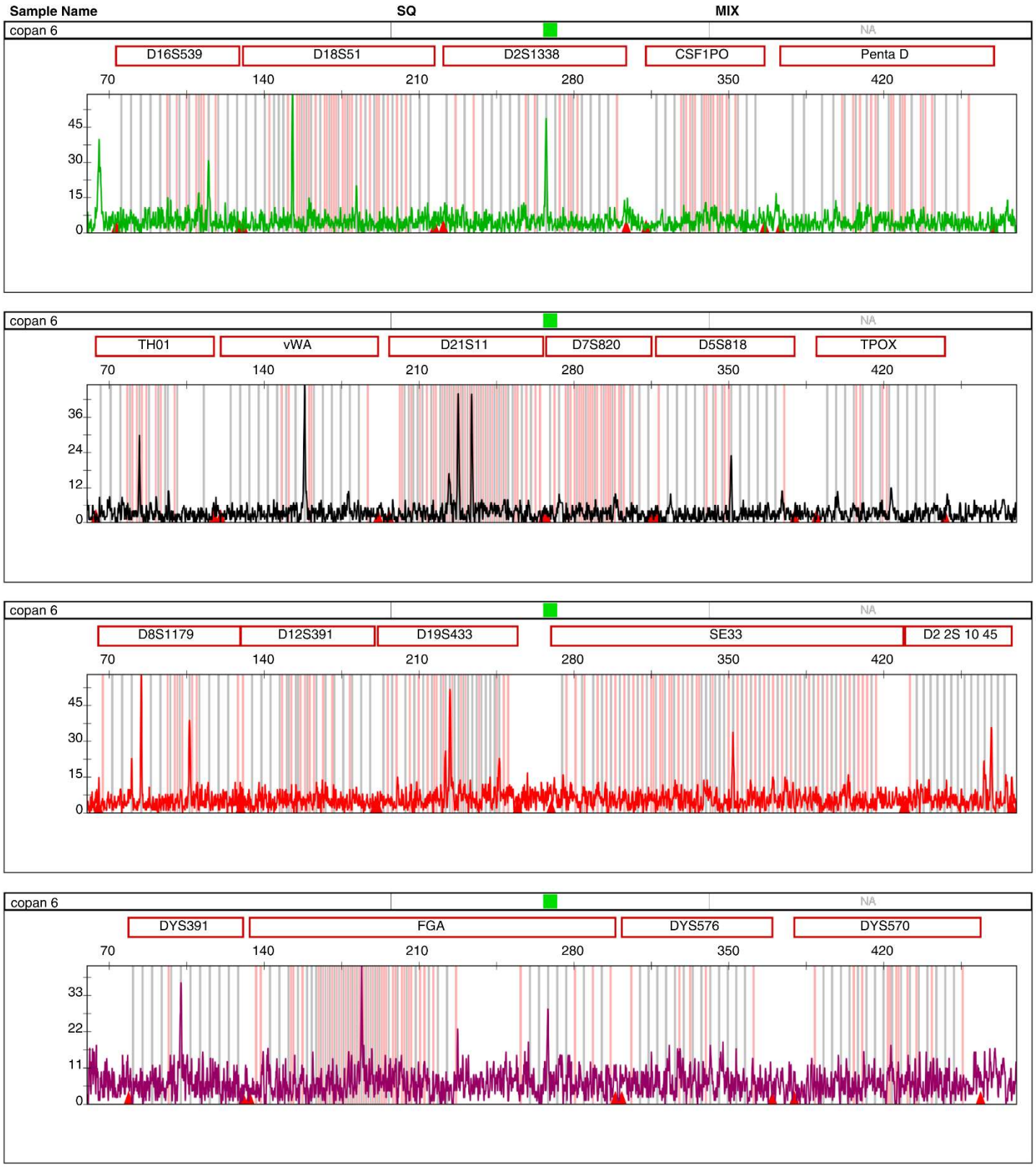




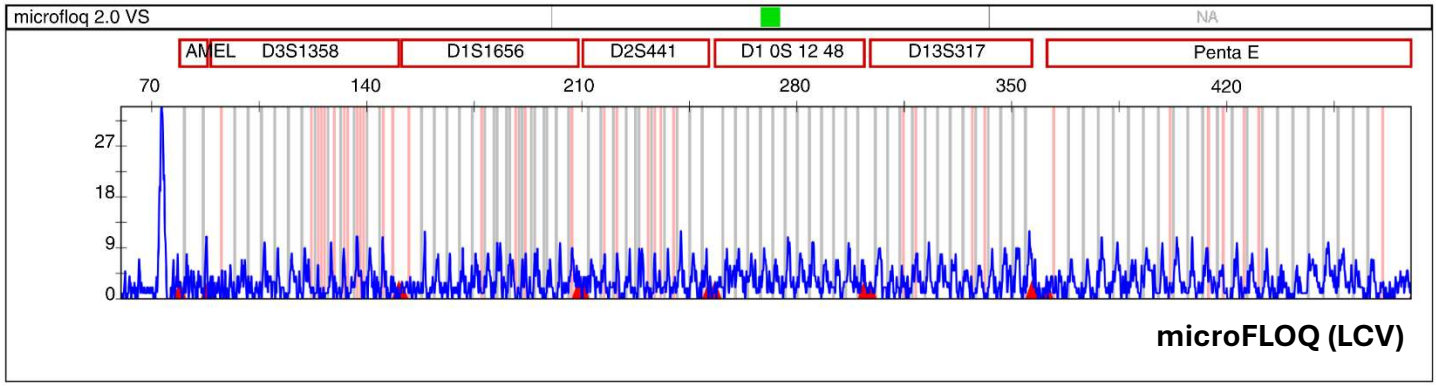




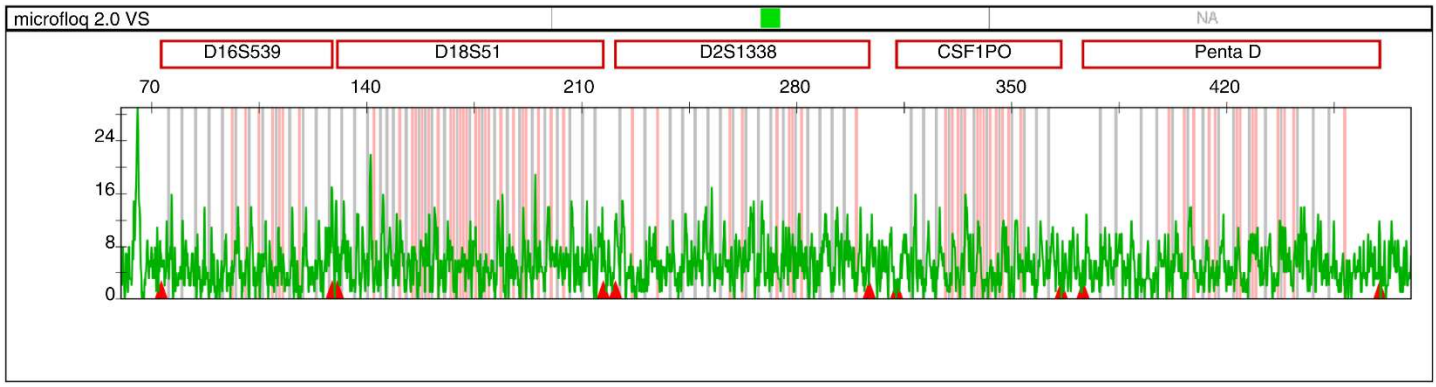

Sample Name
SQ
MIX
copan 4
NA
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
24
16
8
0
copan 4
NA
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
24
16
8
0
copan 5
NA
Tampone floccato Copan (AB)
copan 5
NA
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
30
20
10
0

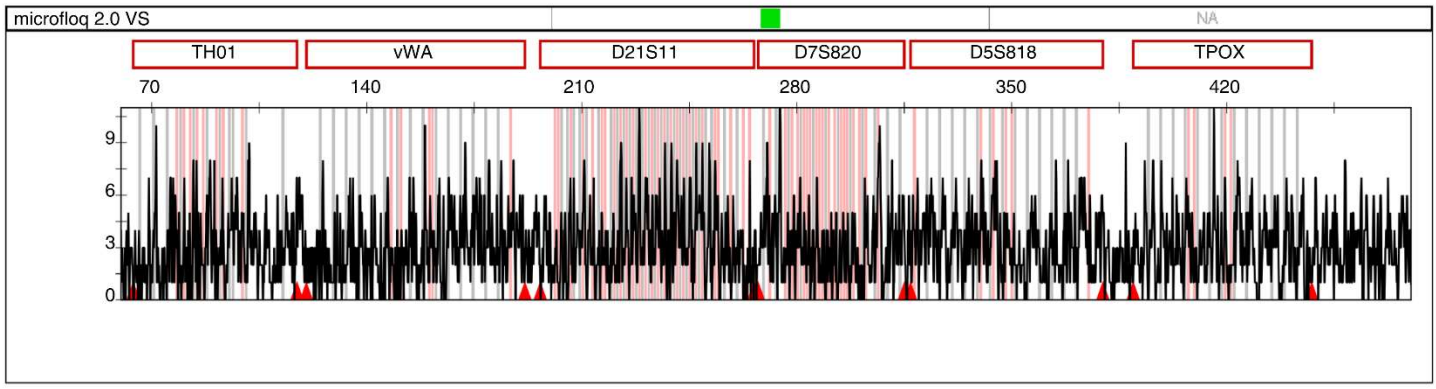

Sample Name
SQ
MIX
copan 6
NA
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
45
30
15
0
copan 6
NA
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
36
24
12
0
copan 6
NA
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
45
30
15
0
copan 6
NA
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
33
22
11
0

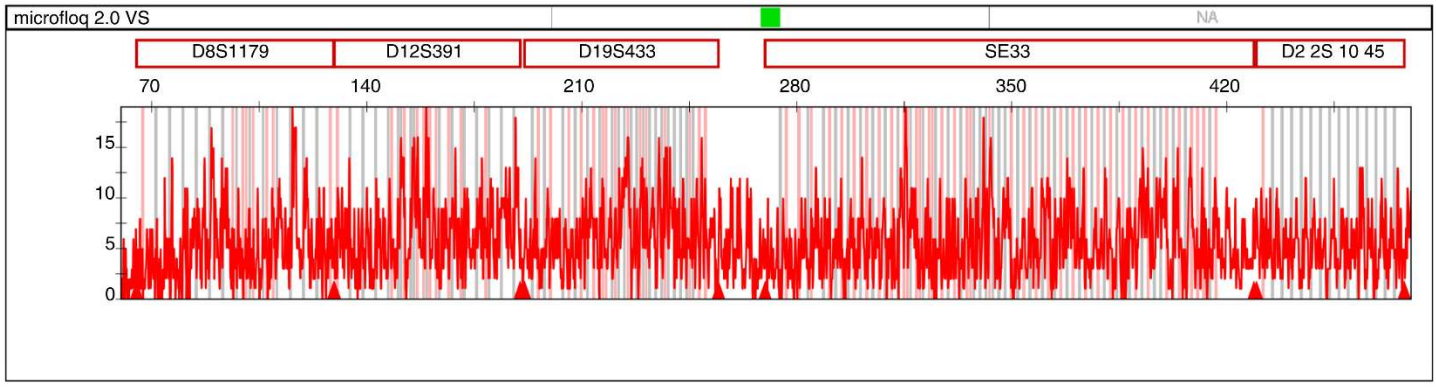
Sample Name **SQ** **MIX**



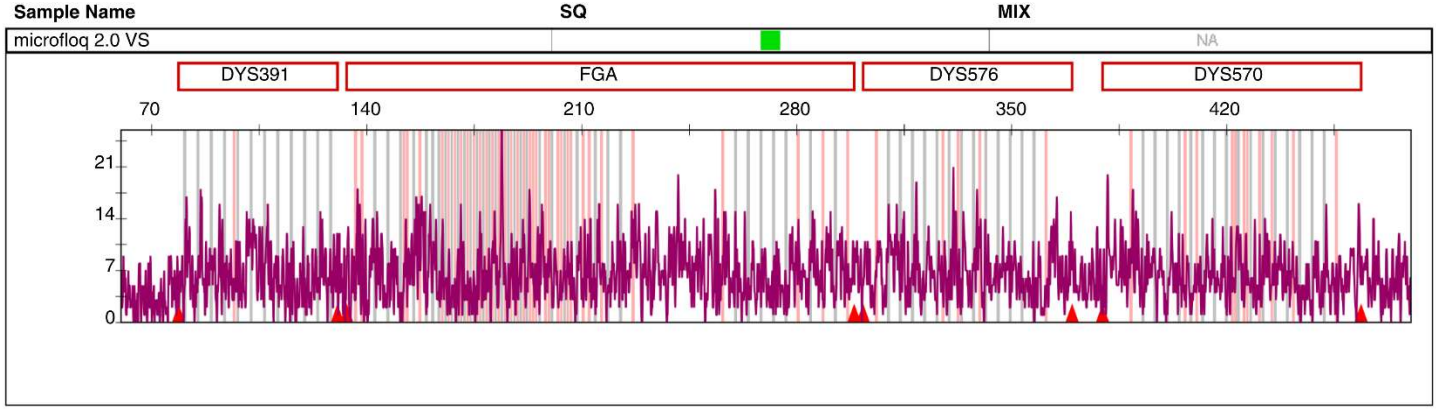
microFLOQ (LCV)

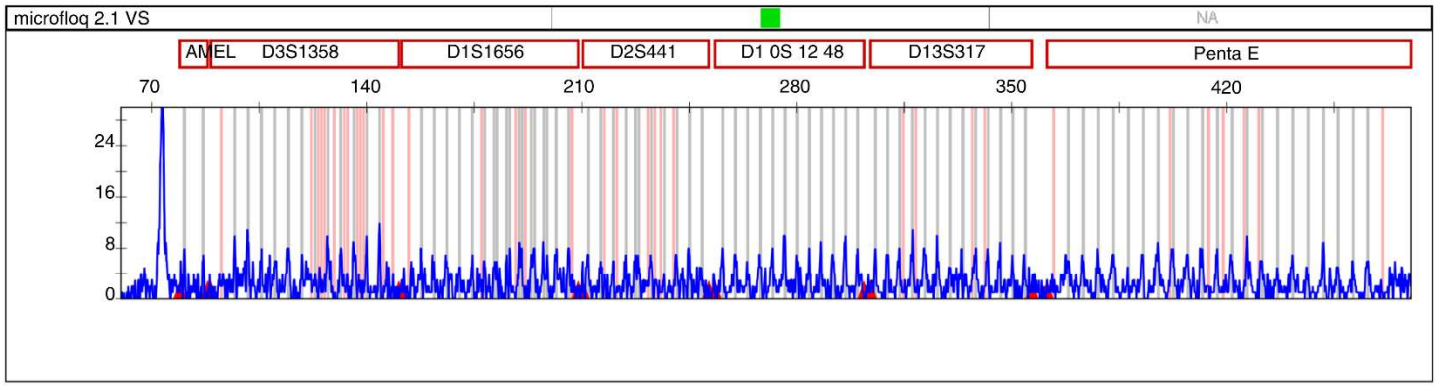


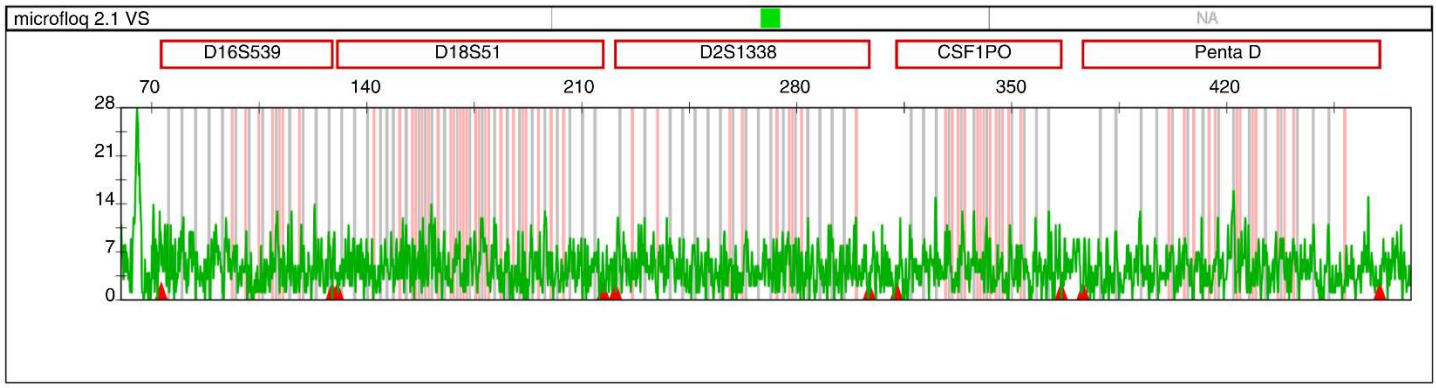


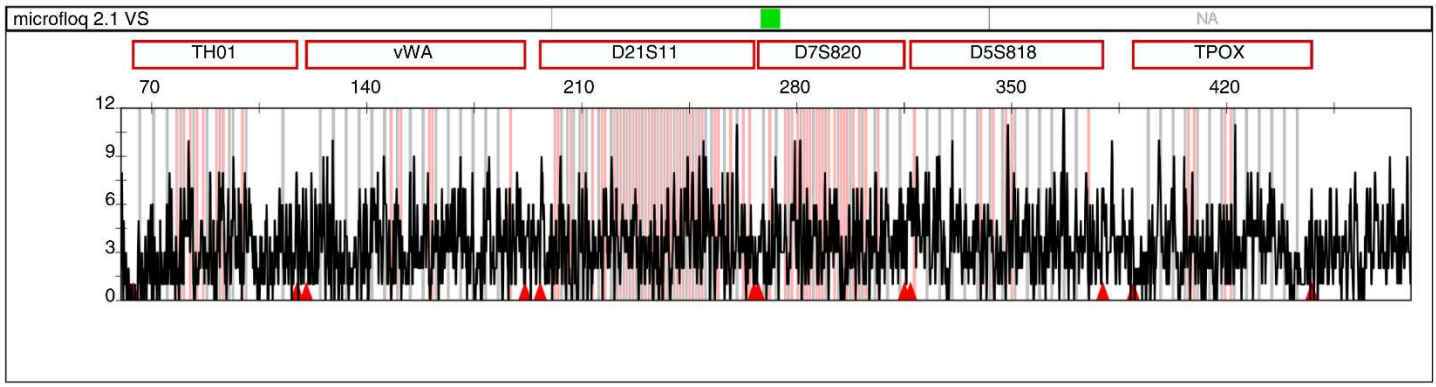


Sample Name **SQ** **MIX**

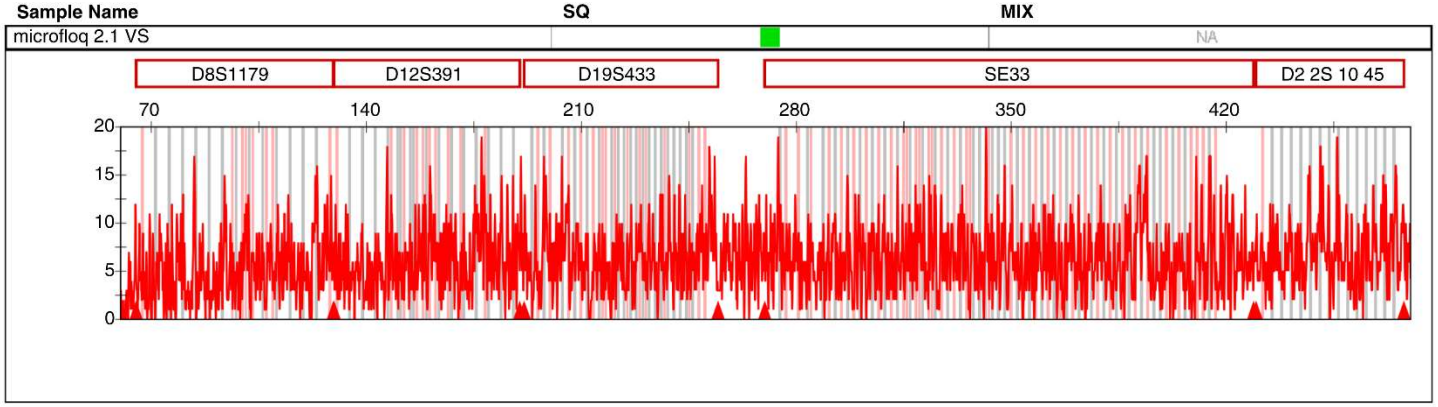


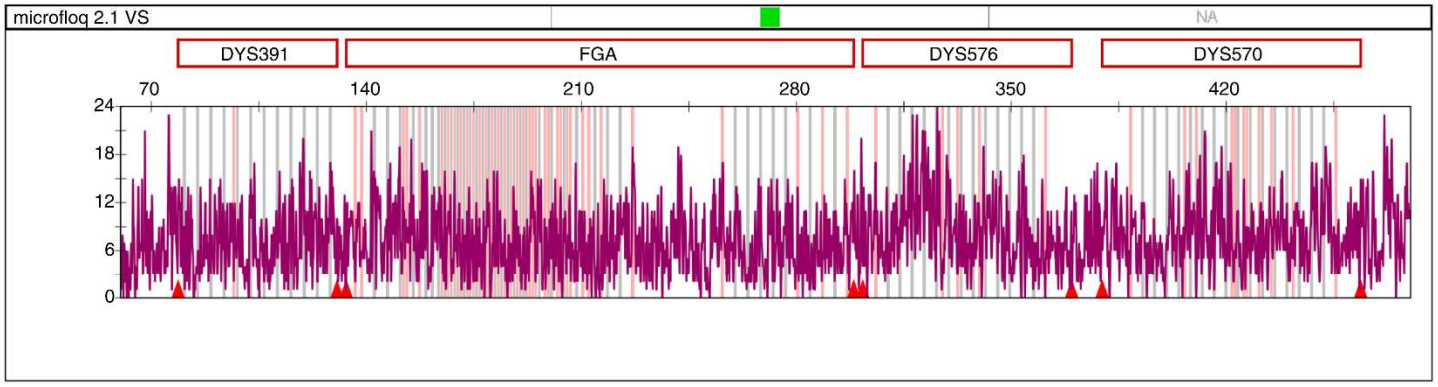


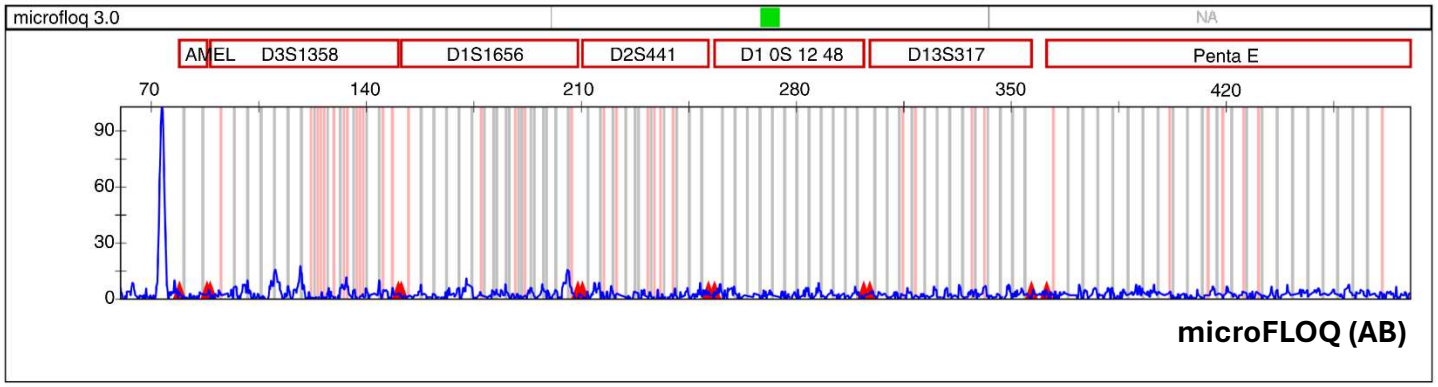


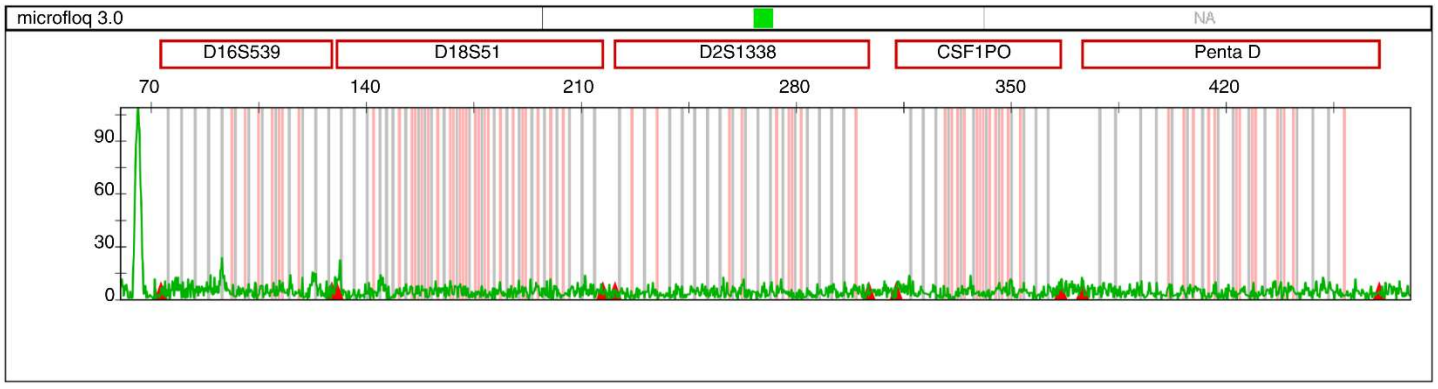


Sample Name **SQ** **MIX**

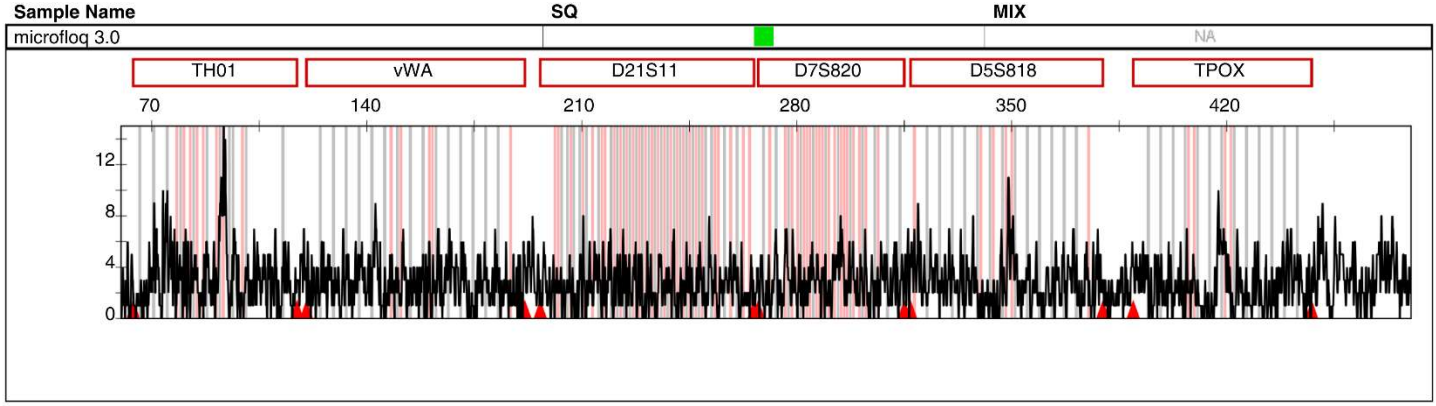


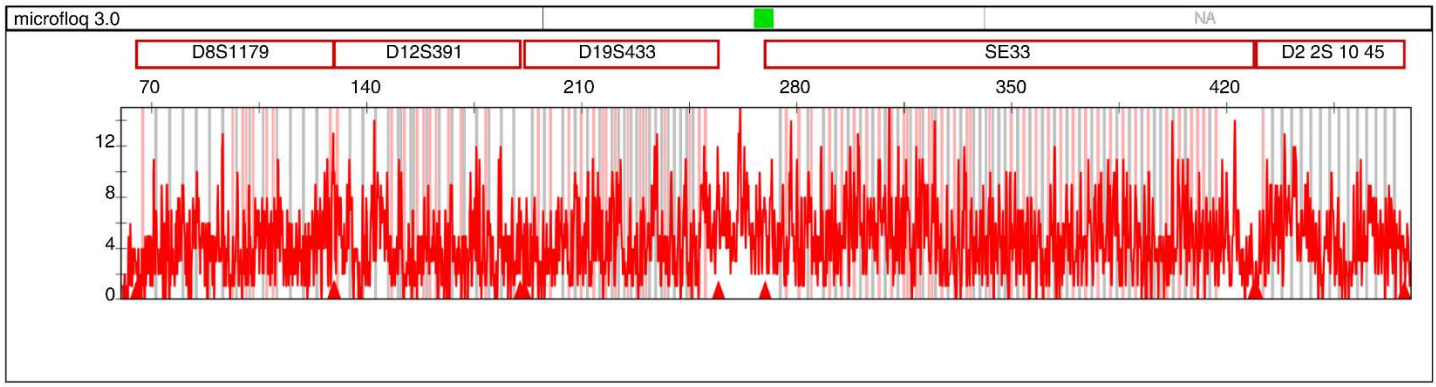


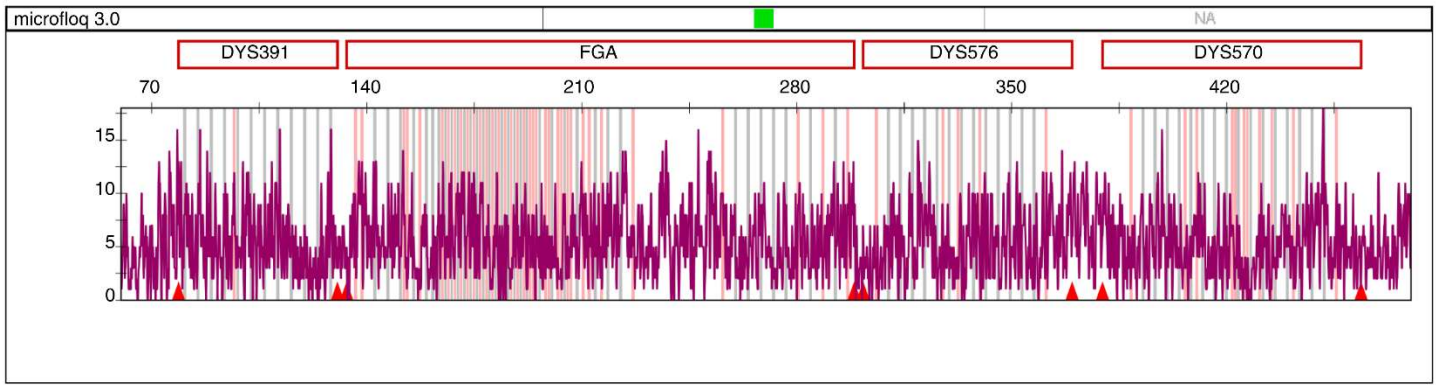


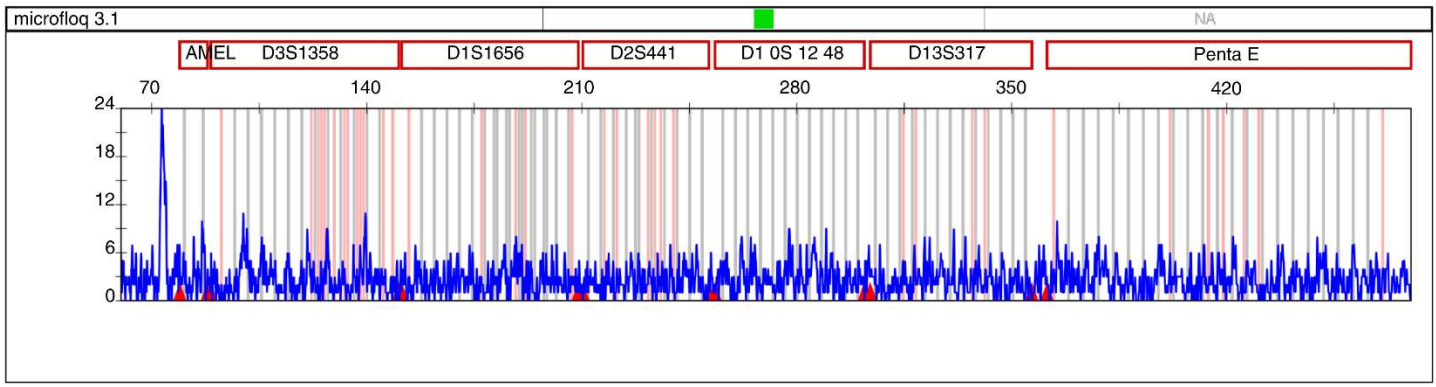


Sample Name **SQ** **MIX**

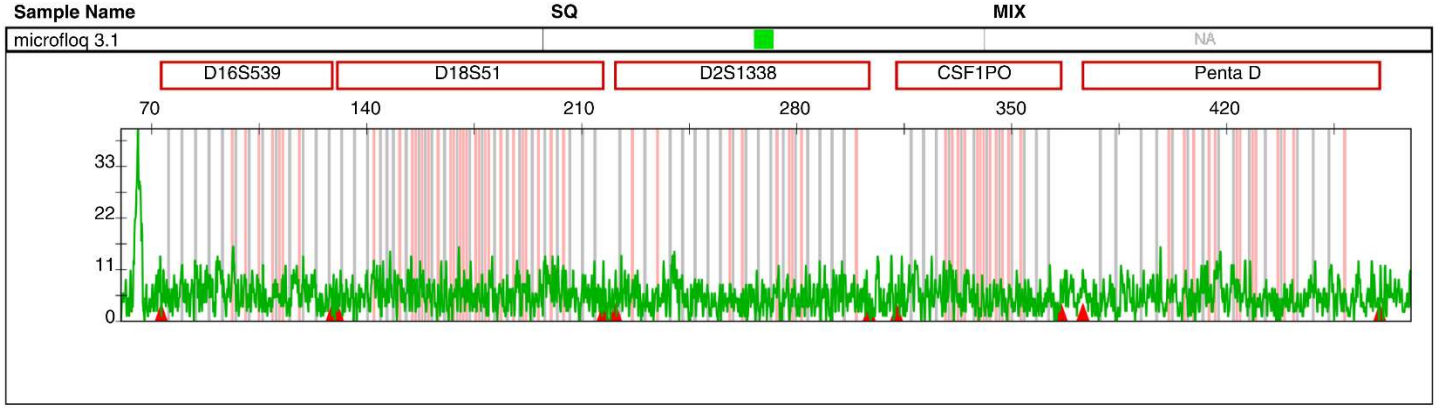


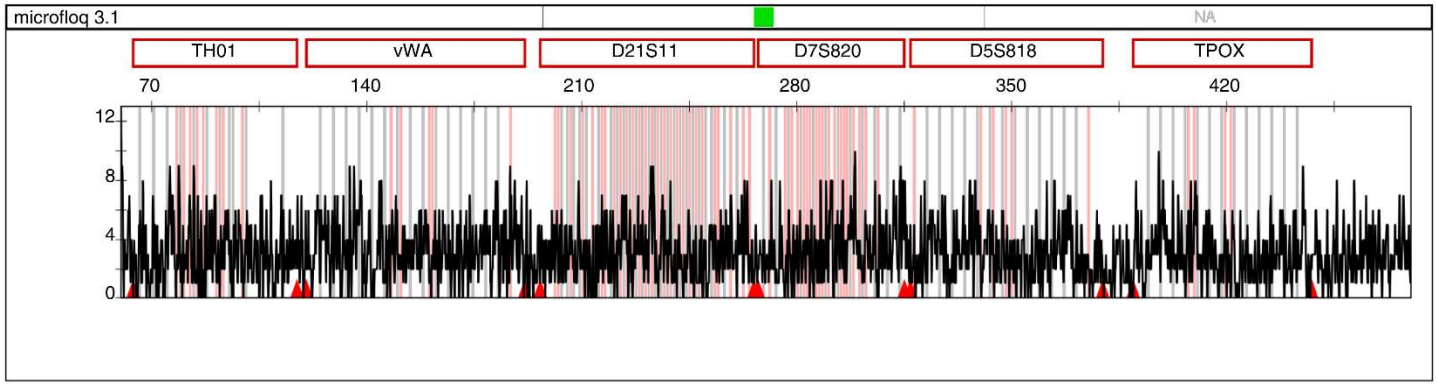


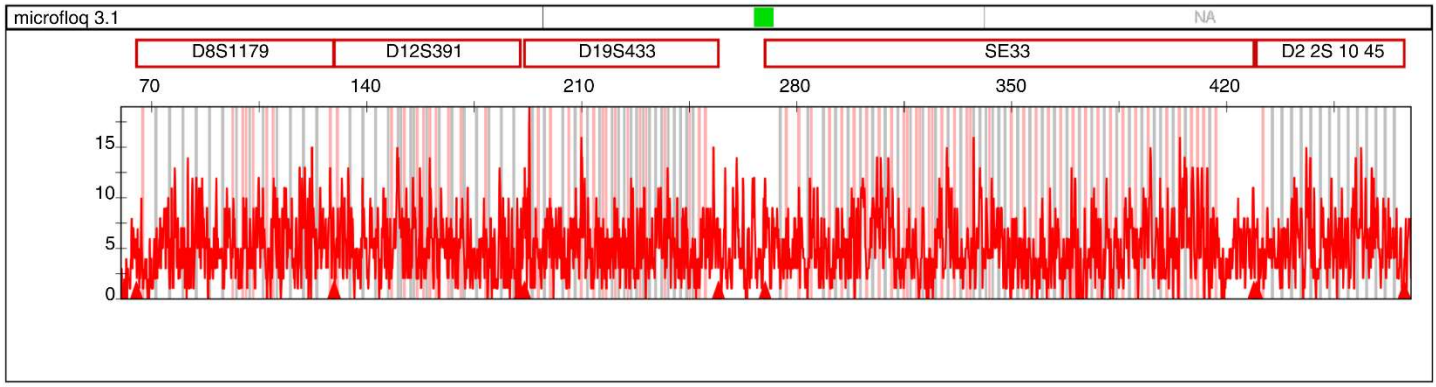


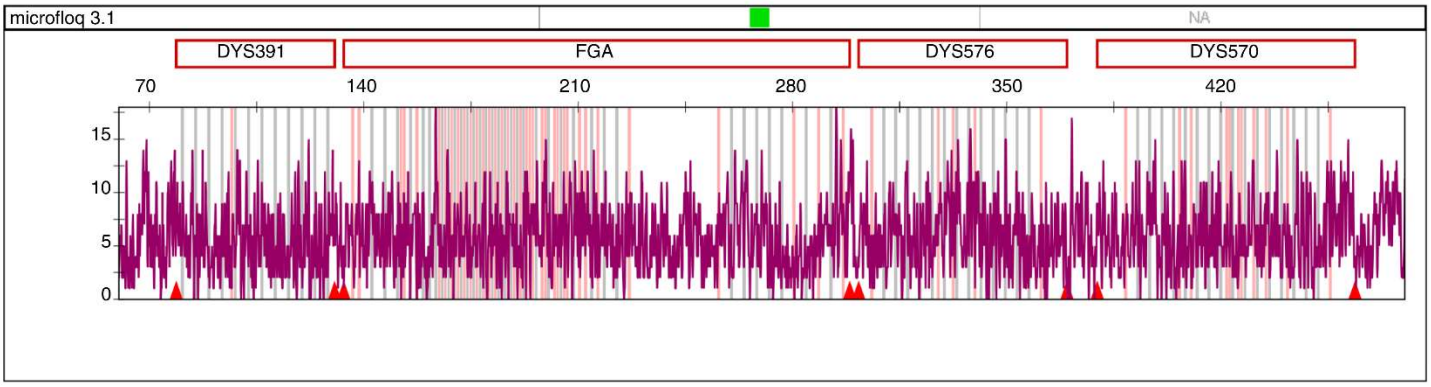


Sample Name **SQ** **MIX**

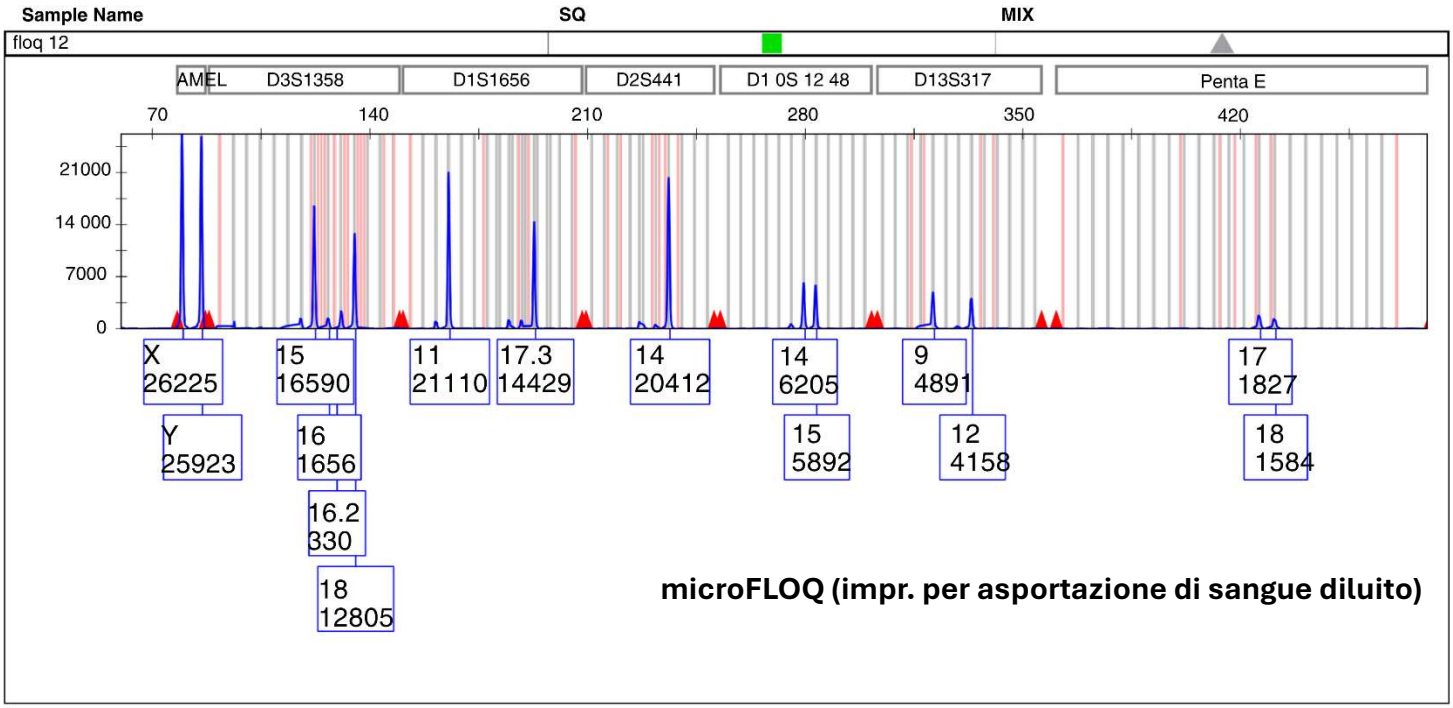


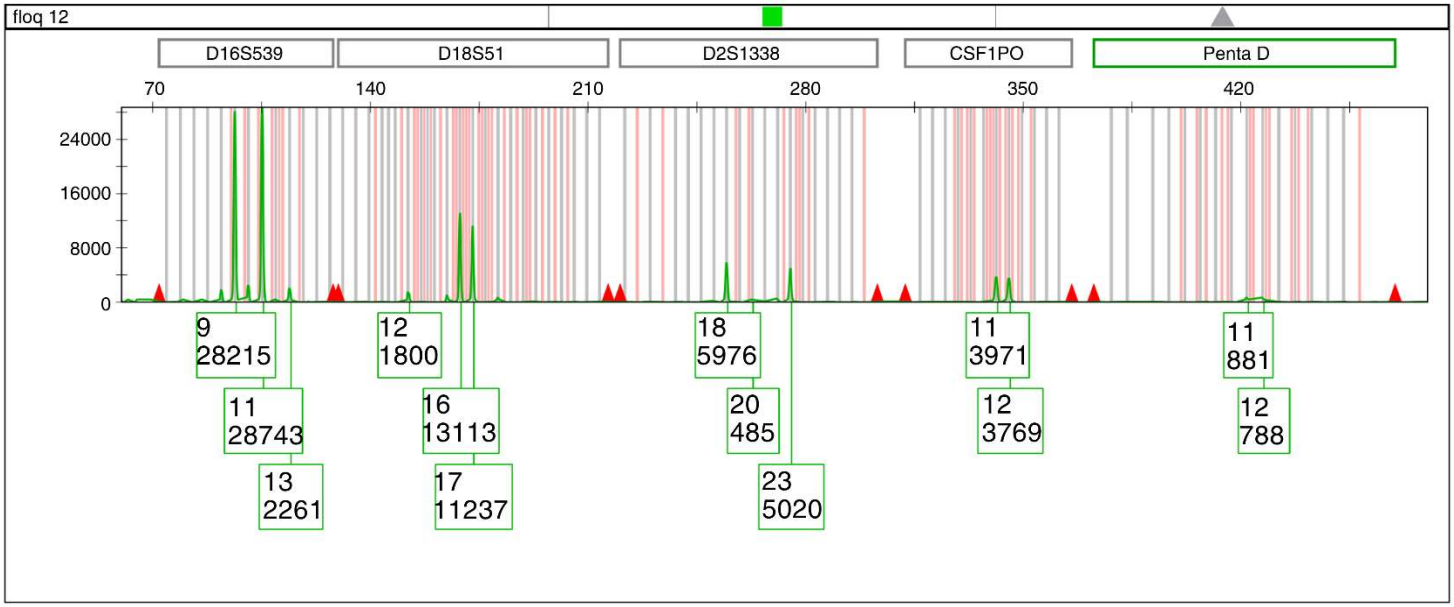


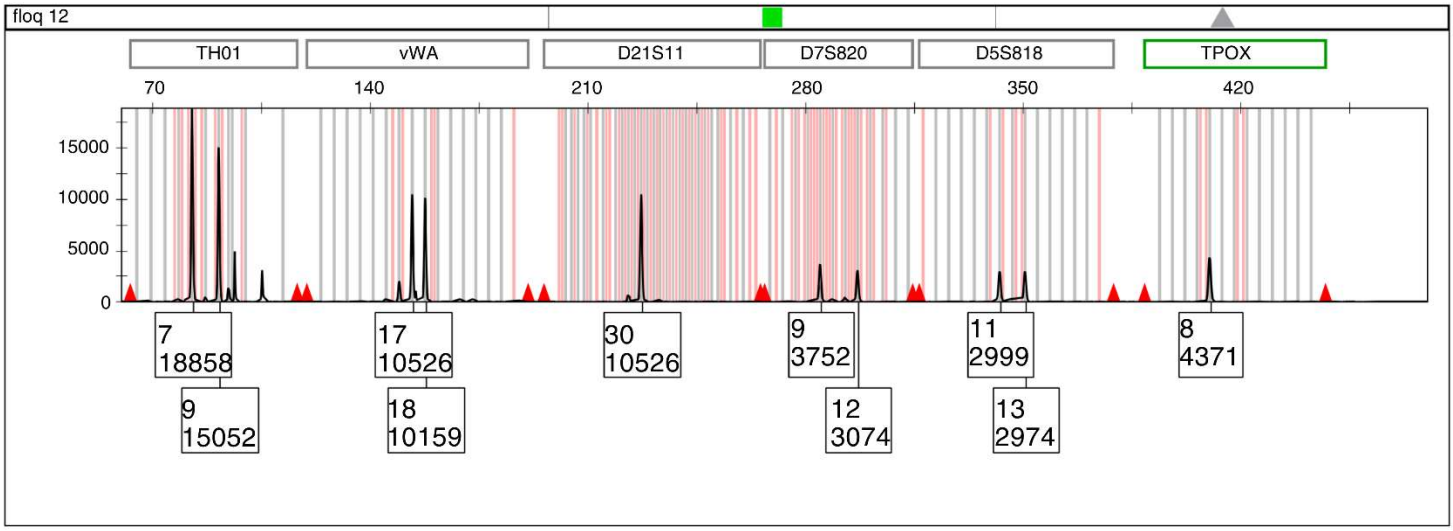


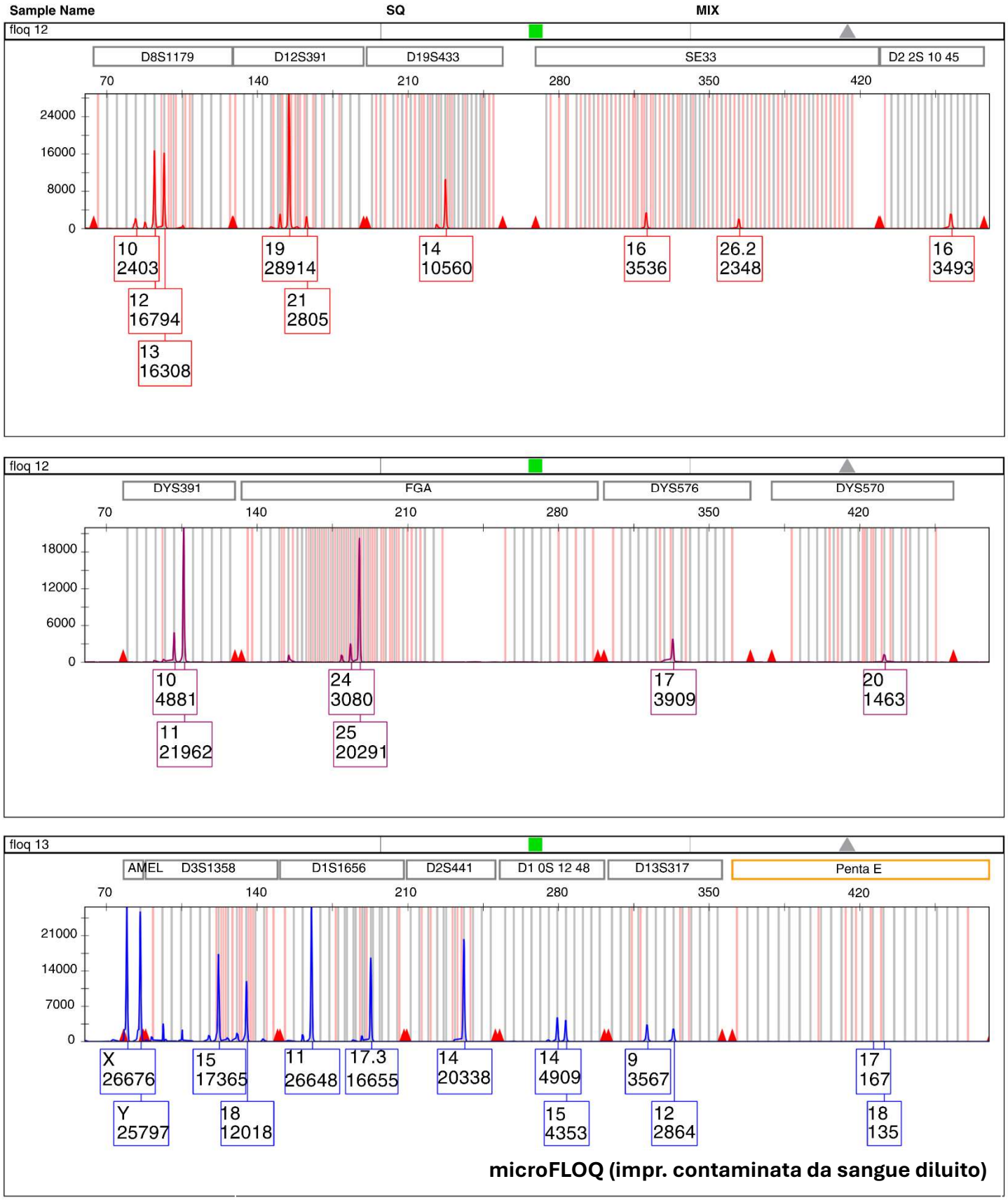


APPENDICE 6

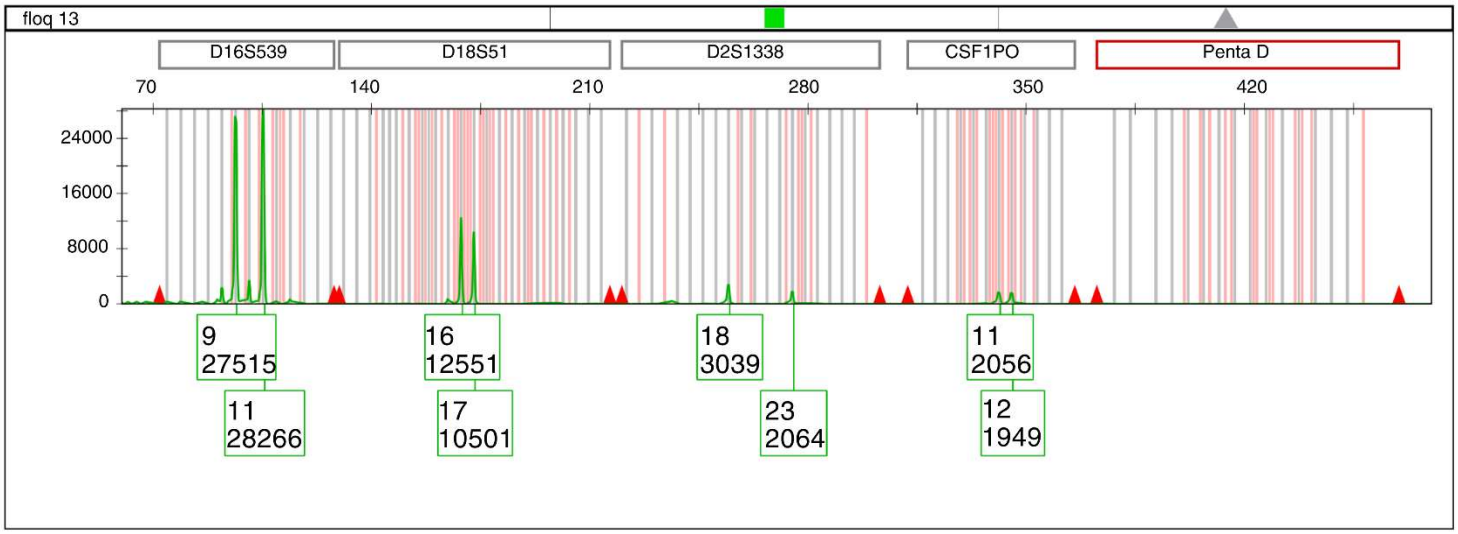

Sample Name
SQ
MIX
floq 12
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
21000
14 000
7000
0
X 26225
Y 25923
15 16590
16 1656
16.2 330
18 12805
11 21110
17.3 14429
14 20412
14 6205
15 5892
9 4891
12 4158
17 1827
18 1584
microFLOQ (impr. per asportazione di sangue diluito)

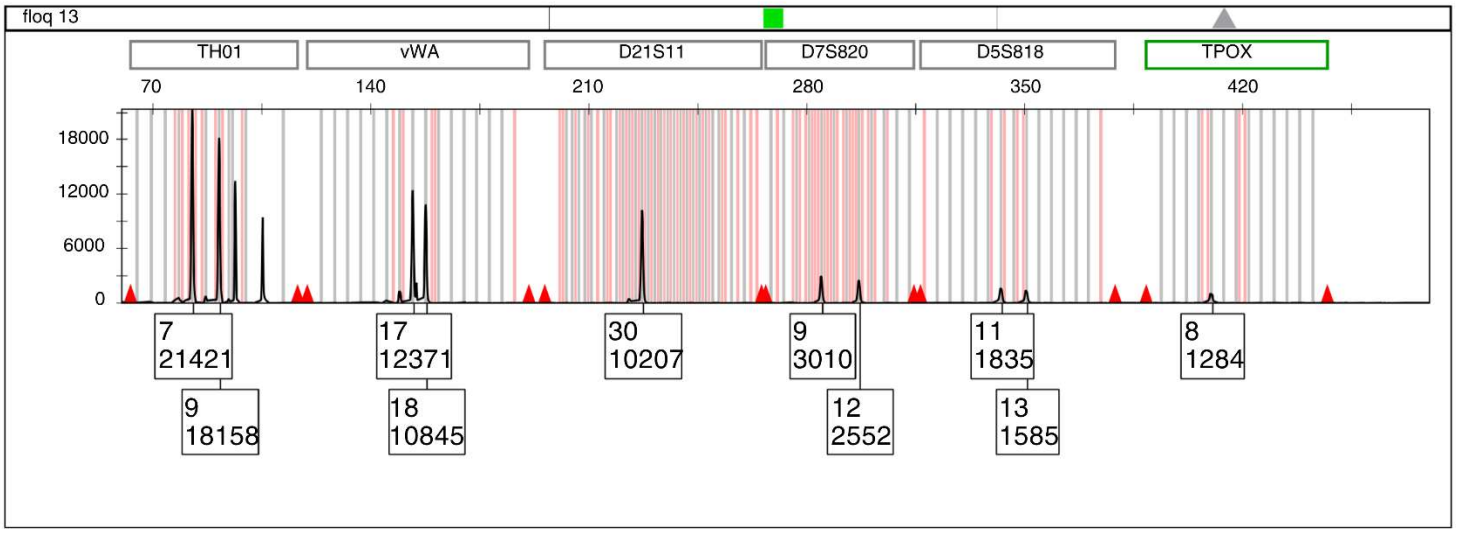

floq 12
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
24000
16000
8000
0
9 28215
11 28743
13 2261
12 1800
16 13113
17 11237
18 5976
20 485
23 5020
11 3971
12 3769
11 881
12 788

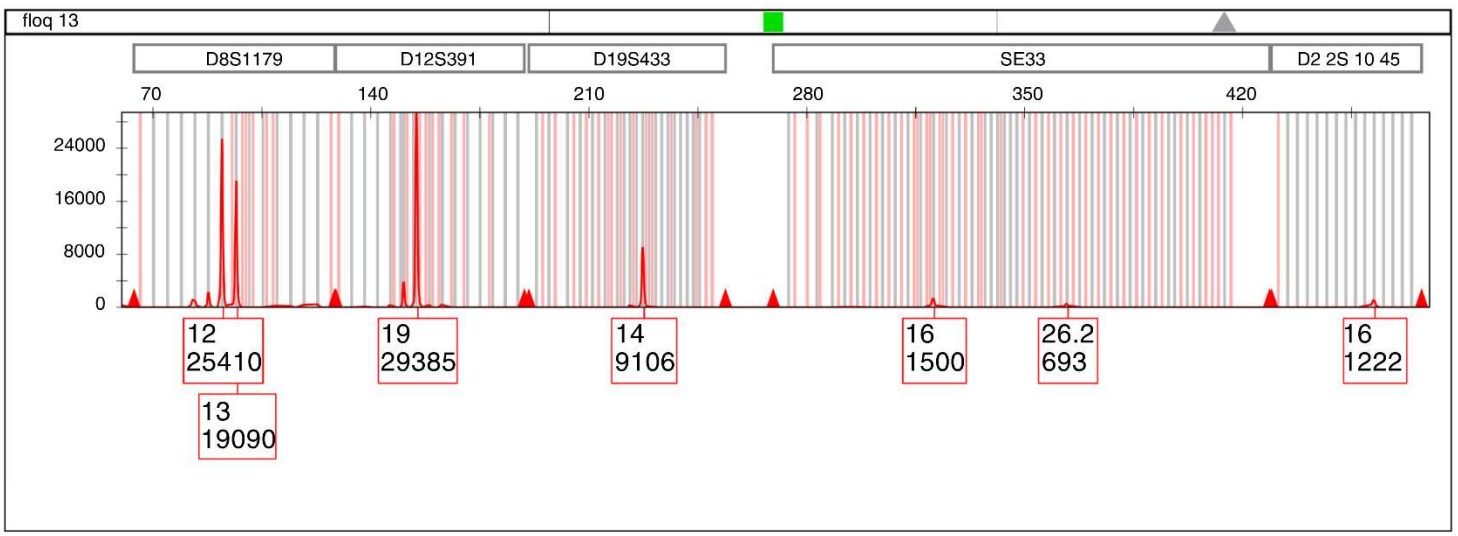

floq 12
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
15000
10000
5000
0
7 18858
9 15052
17 10526
18 10159
30 10526
9 3752
12 3074
11 2999
13 2974
8 4371

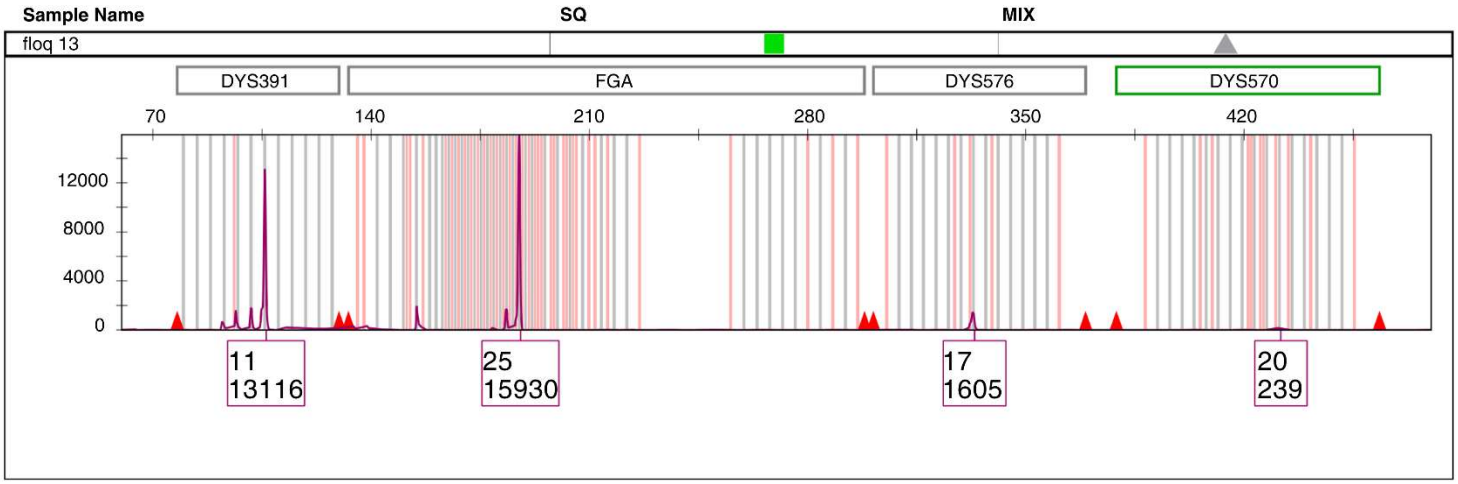

Sample Name
SQ
MIX
floq 12
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
24000
16000
8000
0
10
2403
12
16794
13
16308
19
28914
21
2805
14
10560
16
3536
26.2
2348
16
3493
floq 12
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
18000
12000
6000
0
10
4881
11
21962
24
3080
25
20291
17
3909
20
1463
floq 13
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
21000
14000
7000
0
X
26676
Y
25797
15
17365
18
12018
11
26648
17.3
16655
14
20338
14
4909
15
4353
9
3567
12
2864
17
167
18
135
microFLOQ (impr. contaminata da sangue diluito)

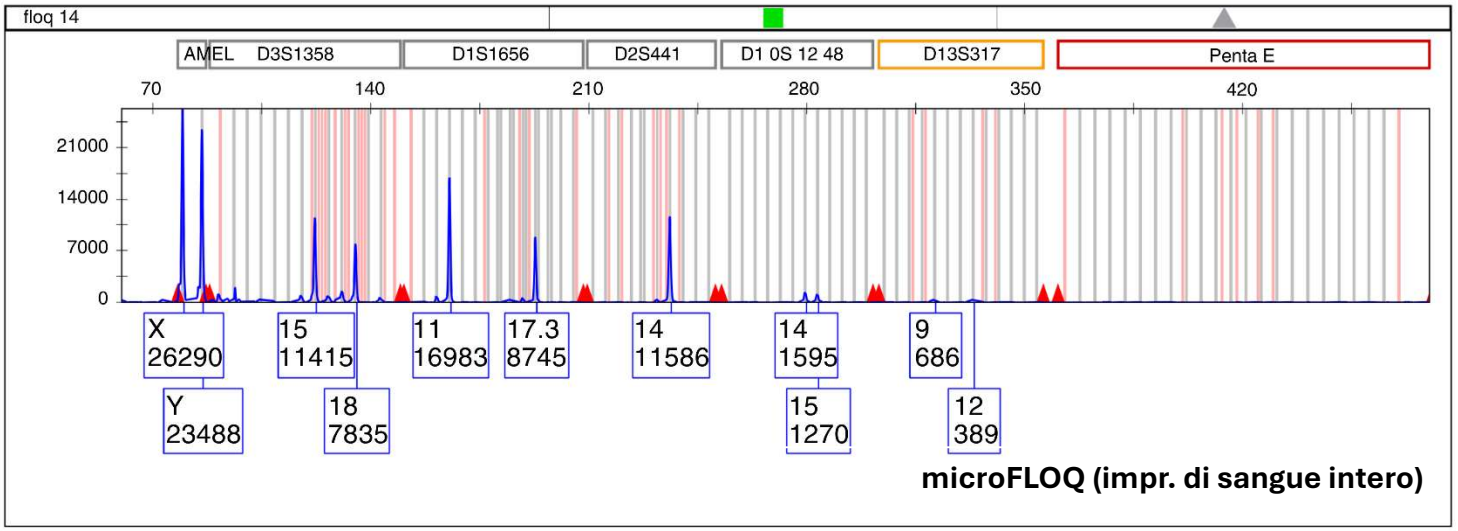
Sample Name **SQ** **MIX**

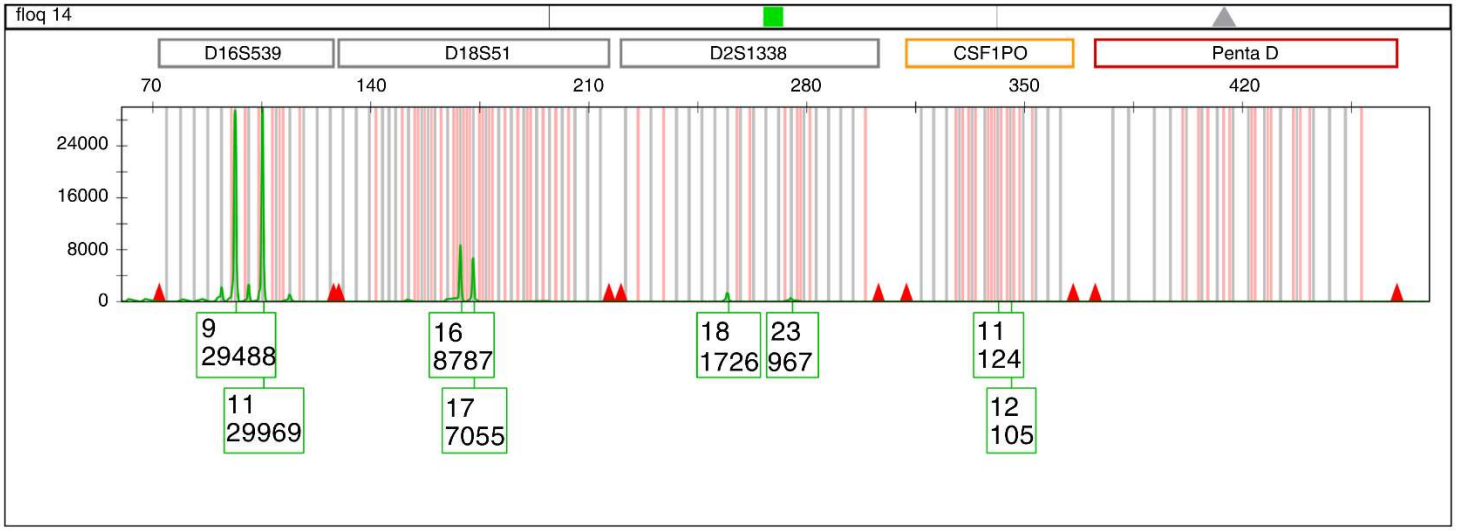


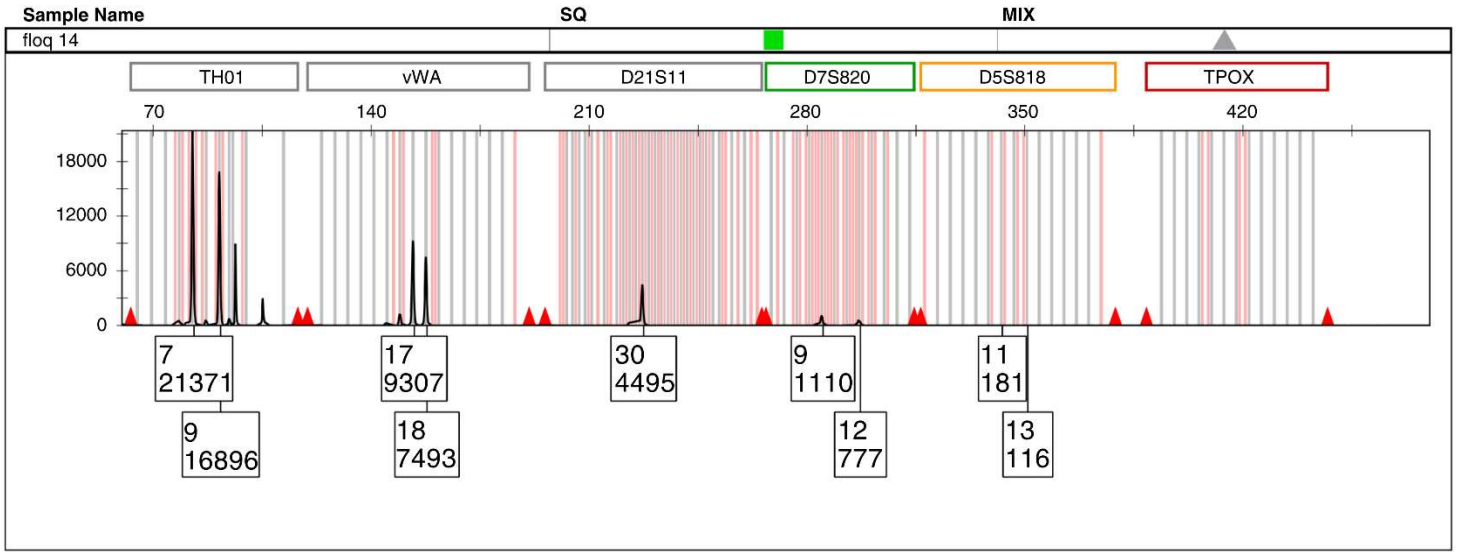


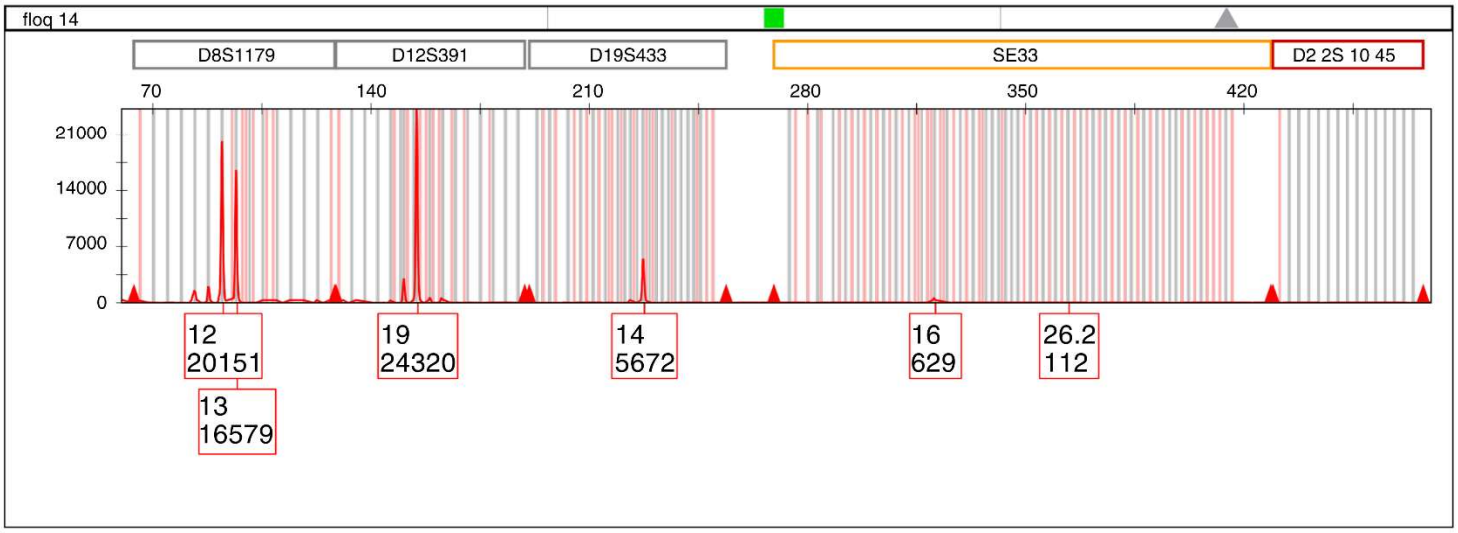


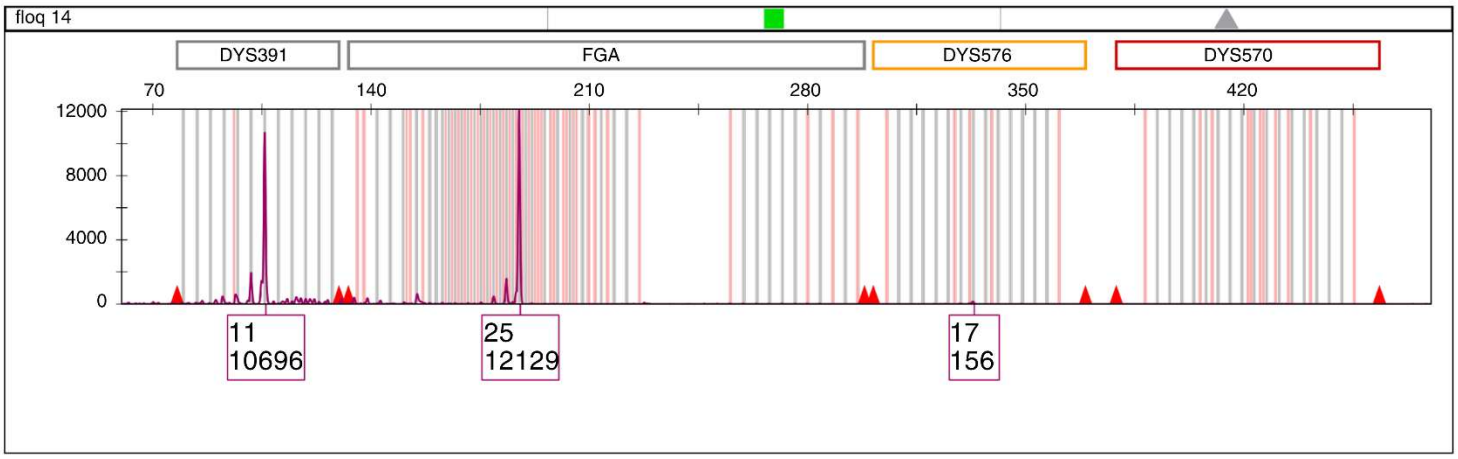

Sample Name
SQ
MIX
floq 13
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
12000
8000
4000
0
11
13116
25
15930
17
1605
20
239

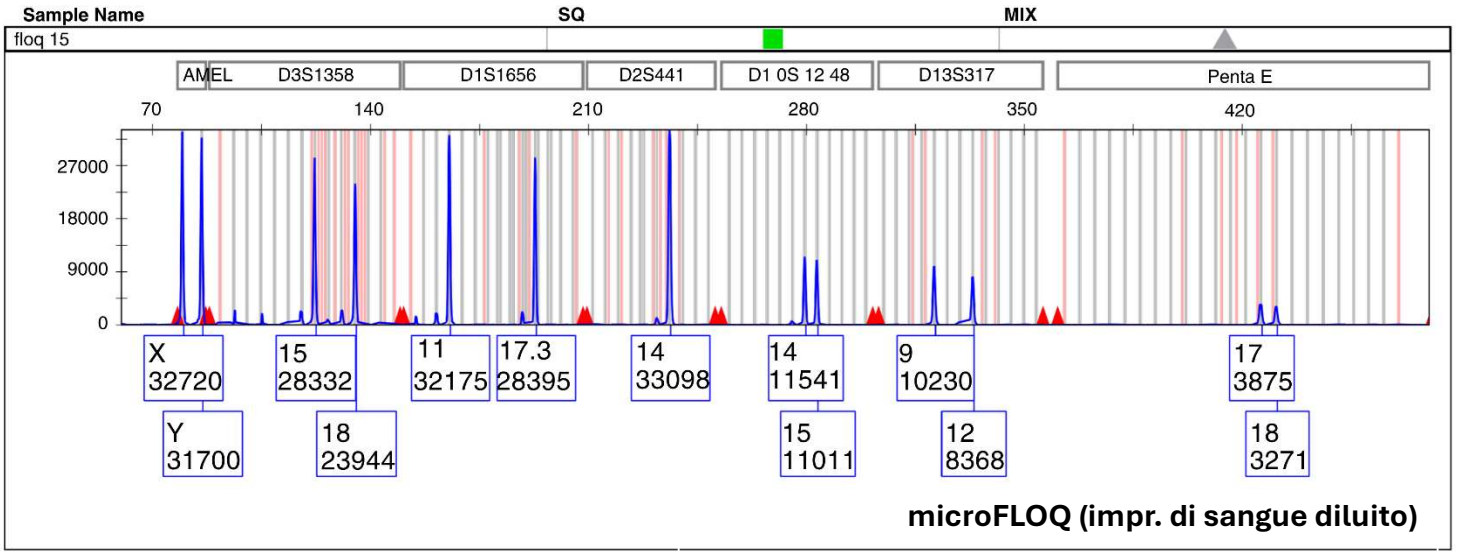

floq 14
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
21000
14000
7000
0
X
26290
Y
23488
15
11415
18
7835
11
16983
17.3
8745
14
11586
14
1595
15
1270
9
686
12
389
microFLOQ (impr. di sangue intero)

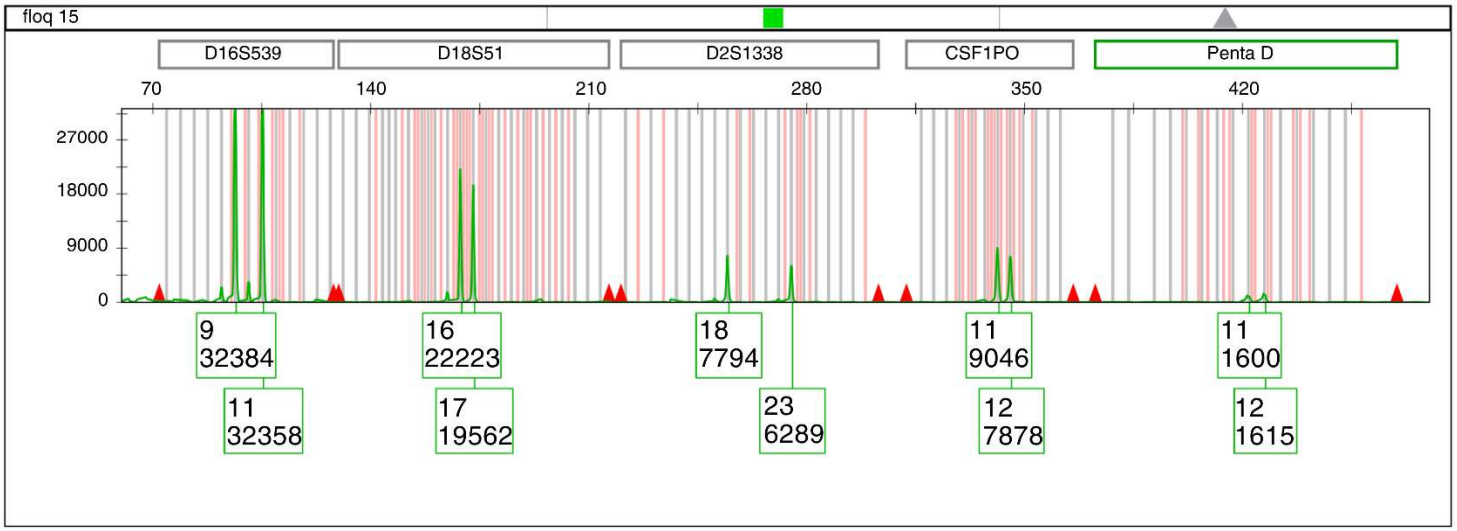

floq 14
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
24000
16000
8000
0
9
29488
11
29969
16
8787
17
7055
18
1726
23
967
11
124
12
105

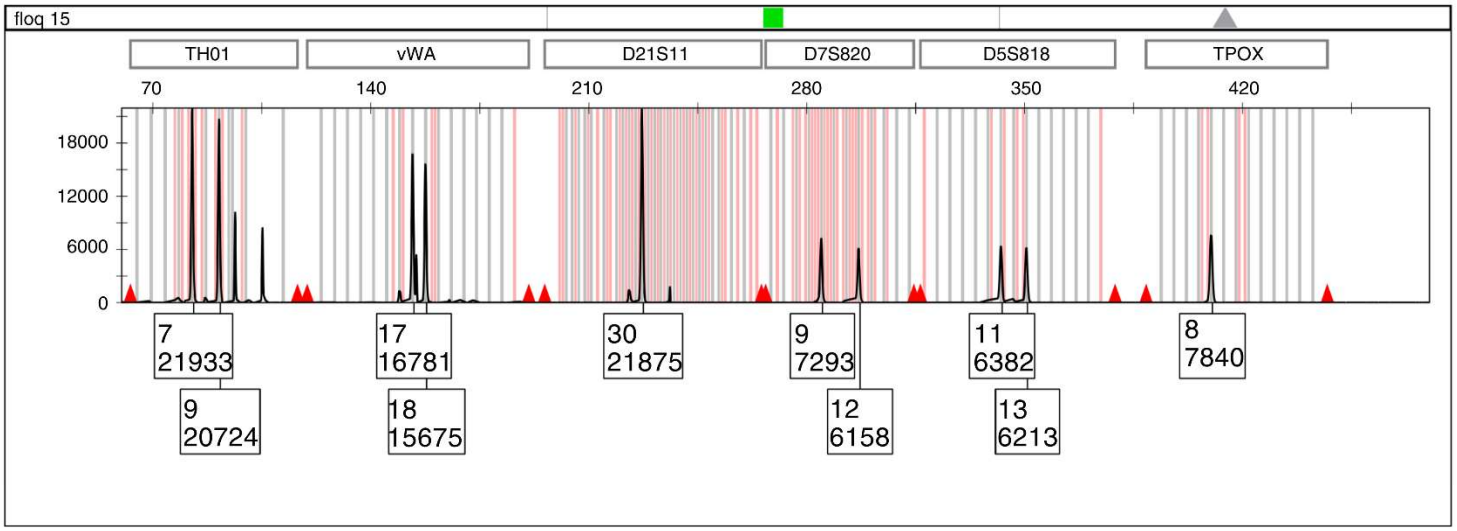

Sample Name
SQ
MIX
floq 14
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
18000
12000
6000
0
7
21371
9
16896
17
9307
18
7493
30
4495
9
1110
12
777
11
181
13
116

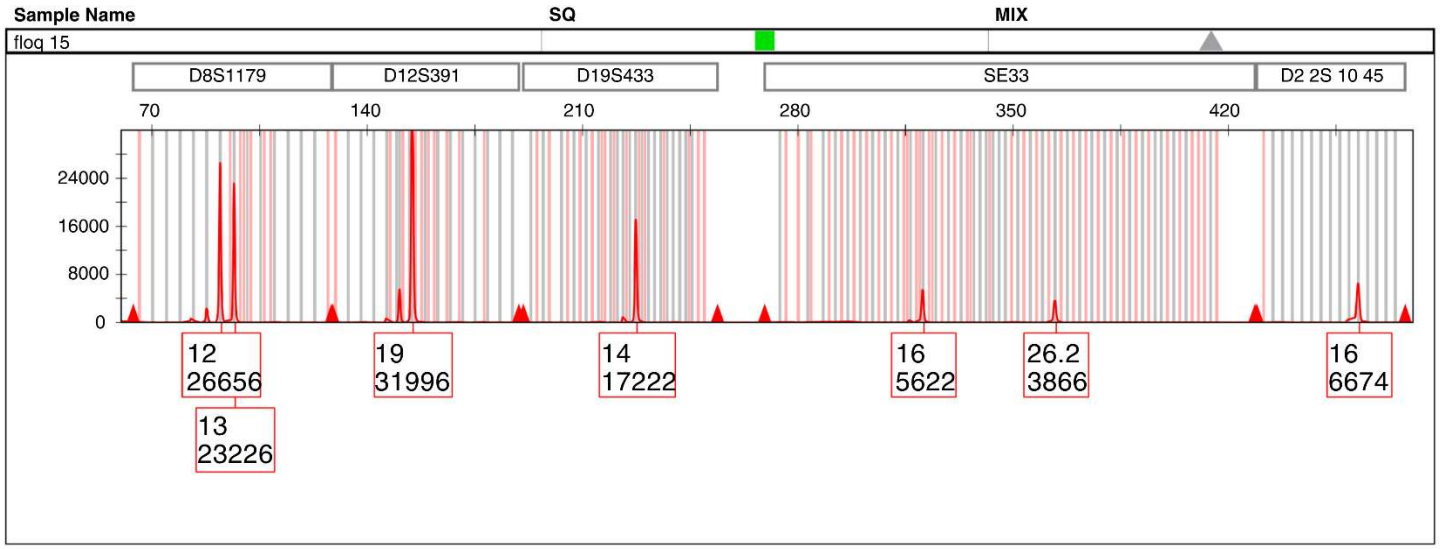

floq 14
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
21000
14000
7000
0
12
20151
13
16579
19
24320
14
5672
16
629
26.2
112

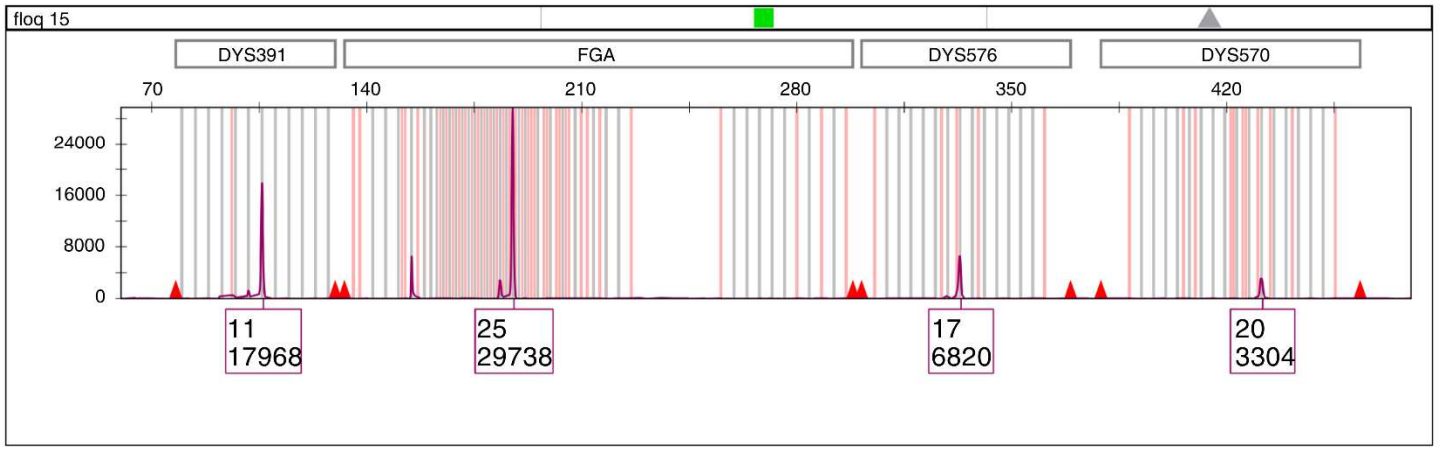

floq 14
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
12000
8000
4000
0
11
10696
25
12129
17
156

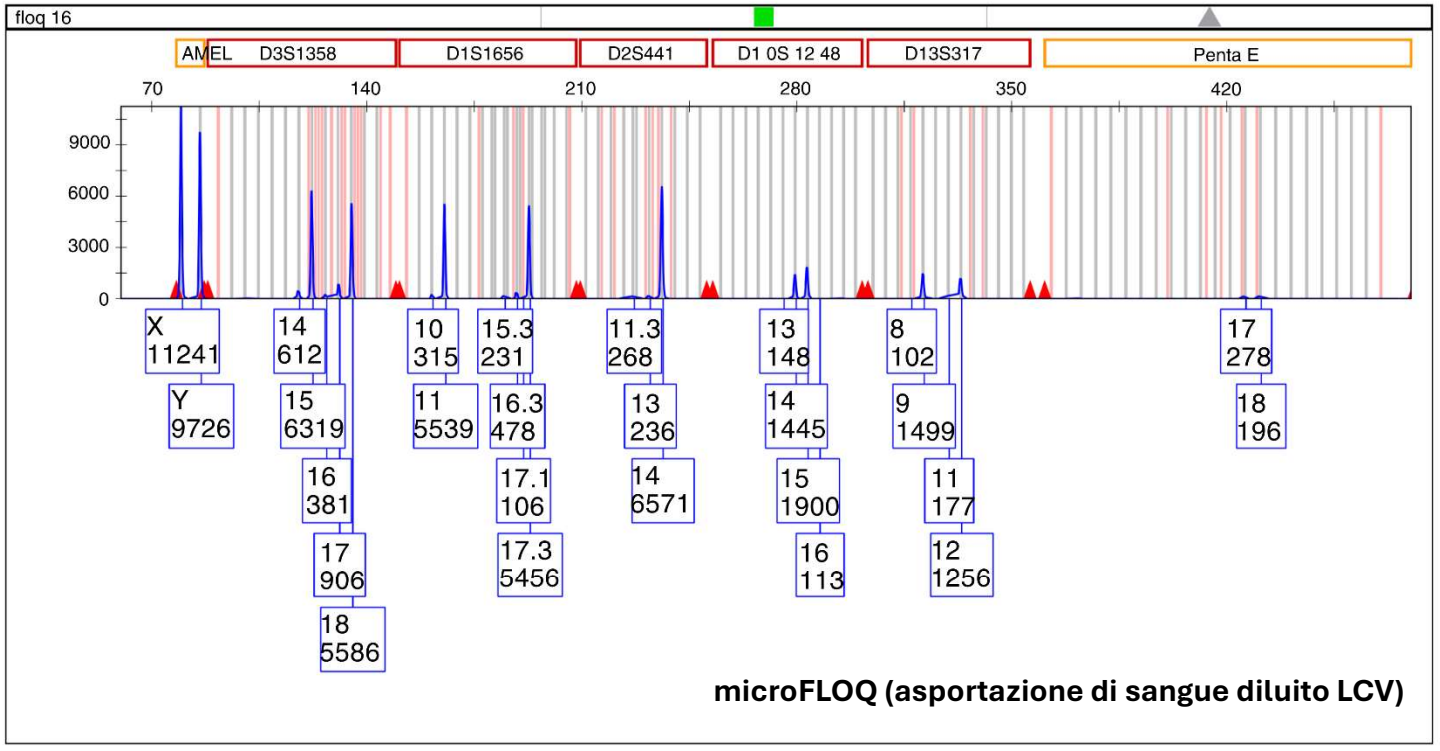

Sample Name
SQ
MIX
floq 15
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
27000
18000
9000
0
X 32720
Y 31700
15 28332
18 23944
11 32175
17.3 28395
14 33098
14 11541
15 11011
9 10230
12 8368
17 3875
18 3271
microFLOQ (impr. di sangue diluito)

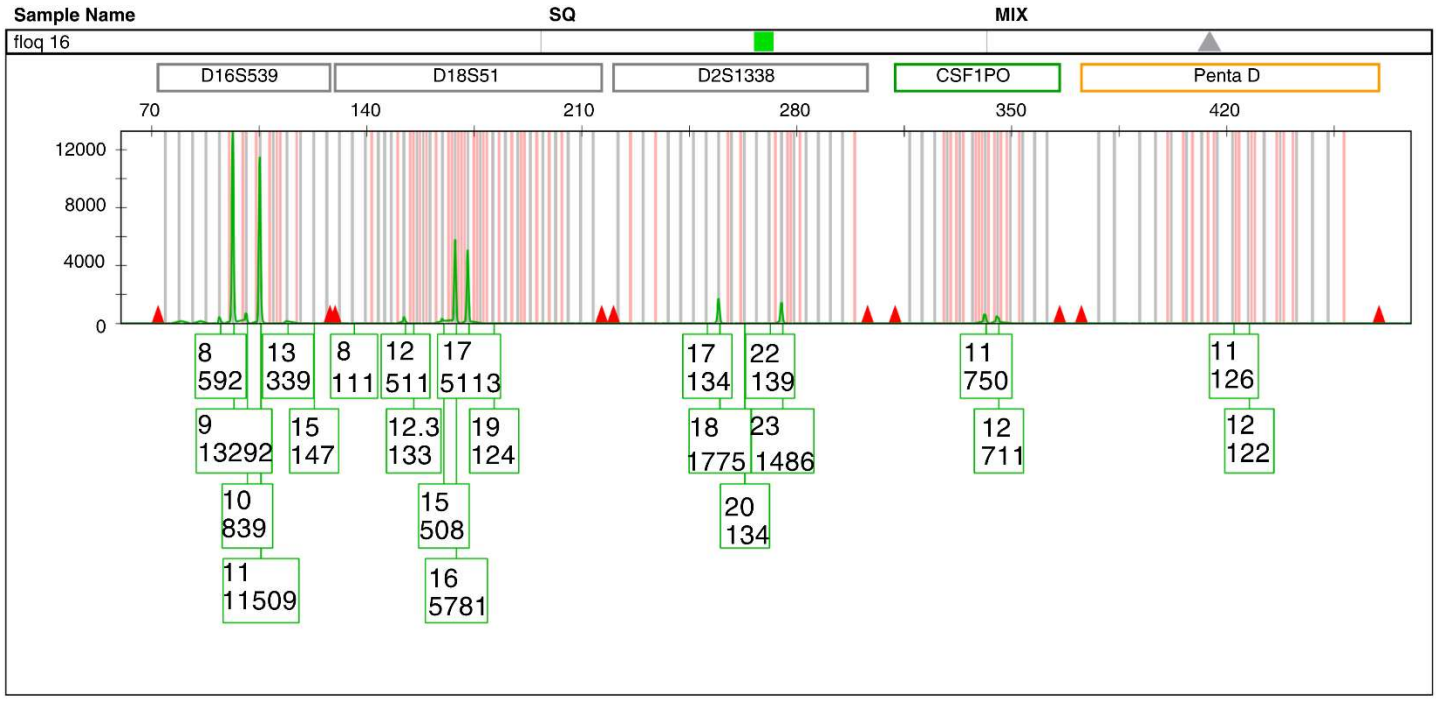

floq 15
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
27000
18000
9000
0
9 32384
11 32358
16 22223
17 19562
18 7794
23 6289
11 9046
12 7878
11 1600
12 1615

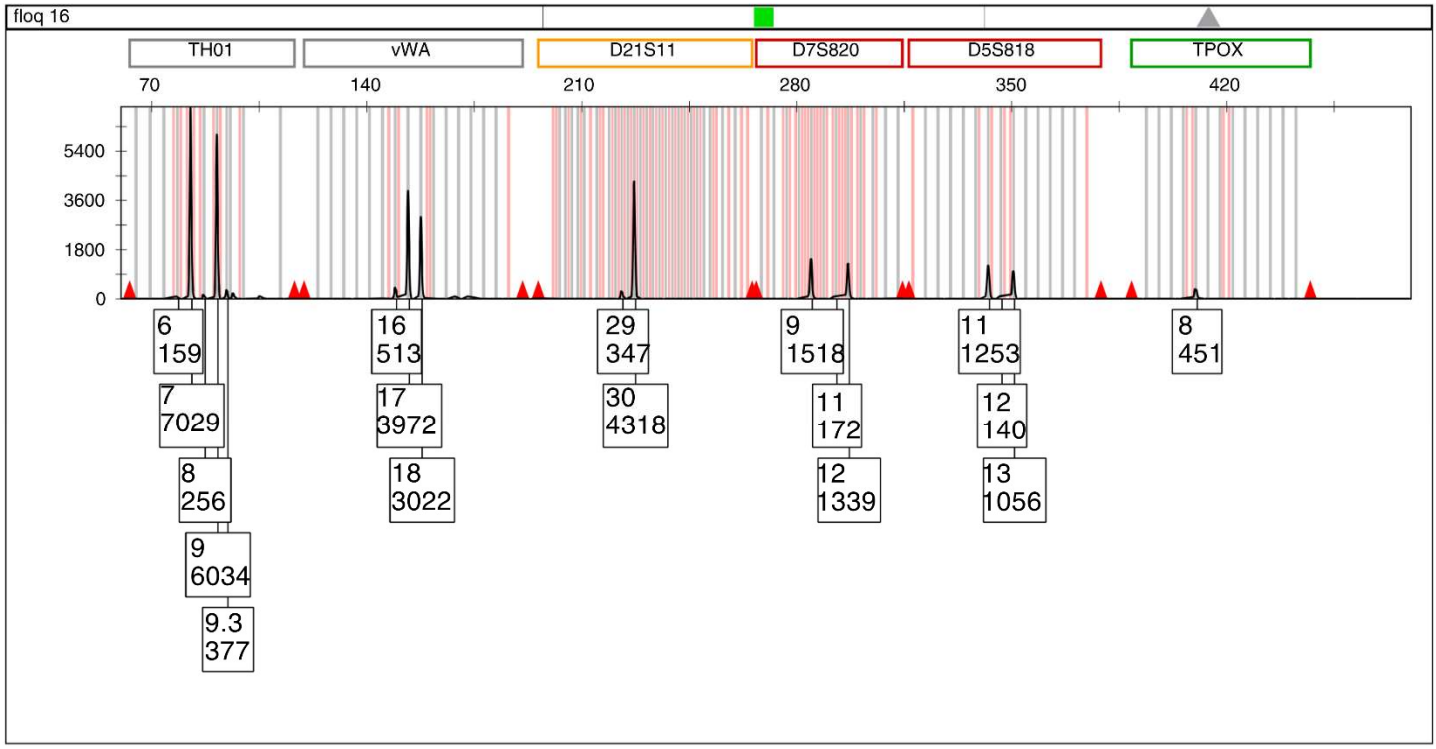

floq 15
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
18000
12000
6000
0
7 21933
9 20724
17 16781
18 15675
30 21875
9 7293
12 6158
11 6382
13 6213
8 7840

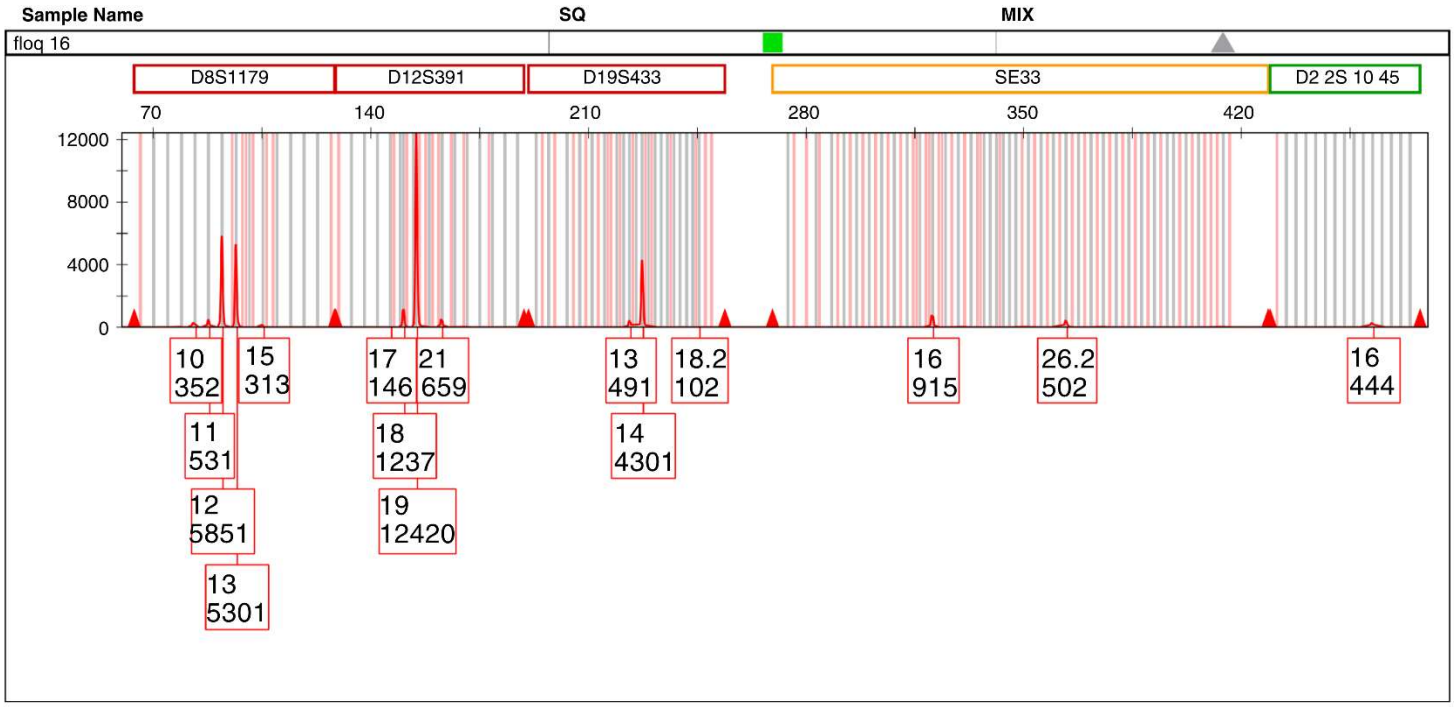

Sample Name
SQ
MIX
floq 15
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
24000
16000
8000
0
12
26656
13
23226
19
31996
14
17222
16
5622
26.2
3866
16
6674

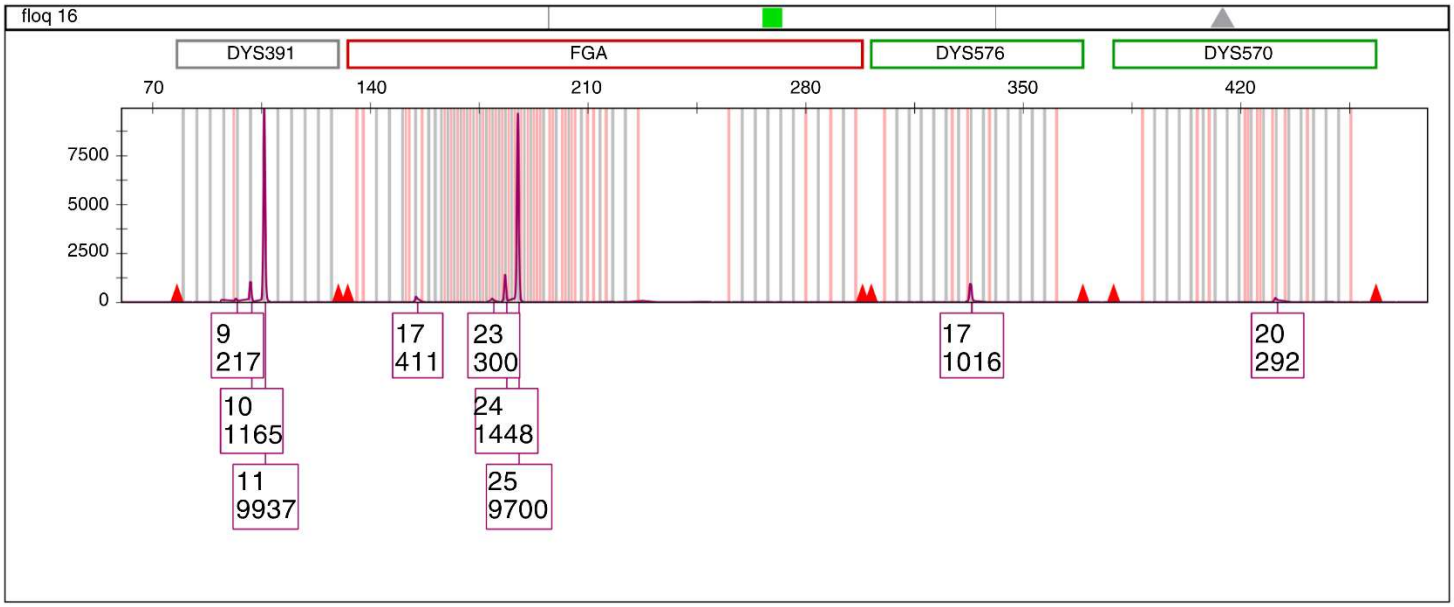

floq 15
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
24000
16000
8000
0
11
17968
25
29738
17
6820
20
3304

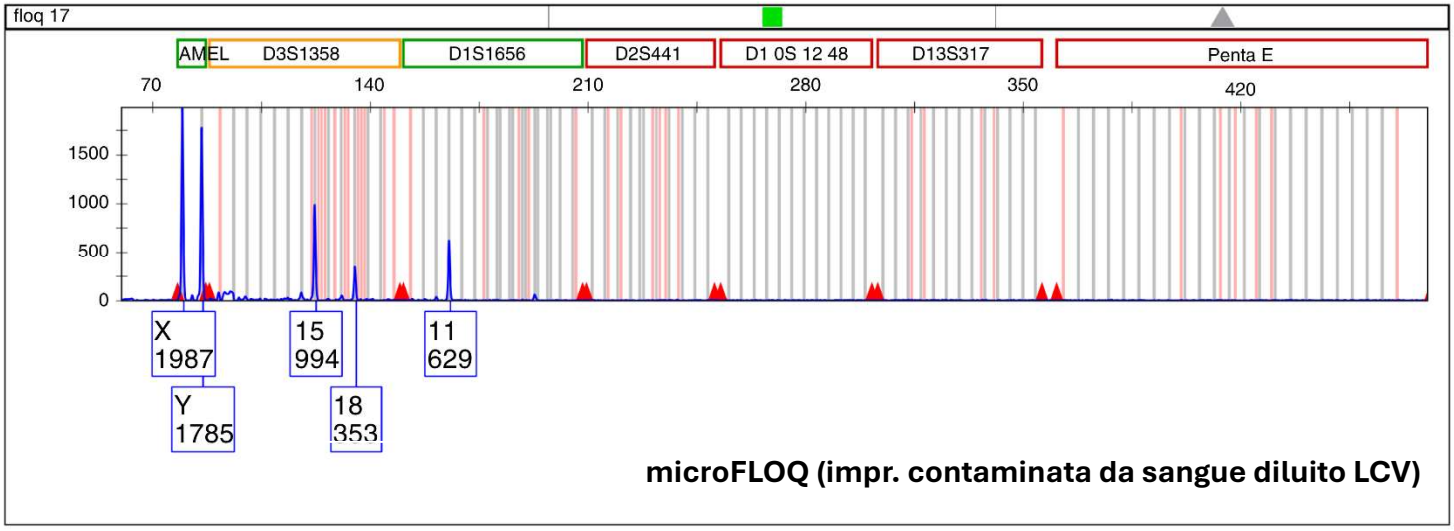

floq 16
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
9000
6000
3000
0
X
11241
Y
9726
14
612
15
6319
16
381
17
906
18
5586
10
315
11
5539
15.3
231
16.3
478
17.1
106
17.3
5456
11.3
268
13
236
14
6571
13
148
14
1445
15
1900
16
113
8
102
9
1499
11
177
12
1256
17
278
18
196
microFLOQ (asportazione di sangue diluito LCV)


Sample Name
SQ
MIX
floq 16
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
12000
8000
4000
0
8 592
13 339
8 111
12 511
17 5113
17 134
22 139
11 750
11 126
9 13292
15 147
12.3 133
19 124
18 1775
23 1486
12 711
12 122
10 839
15 508
20 134
11 11509
16 5781

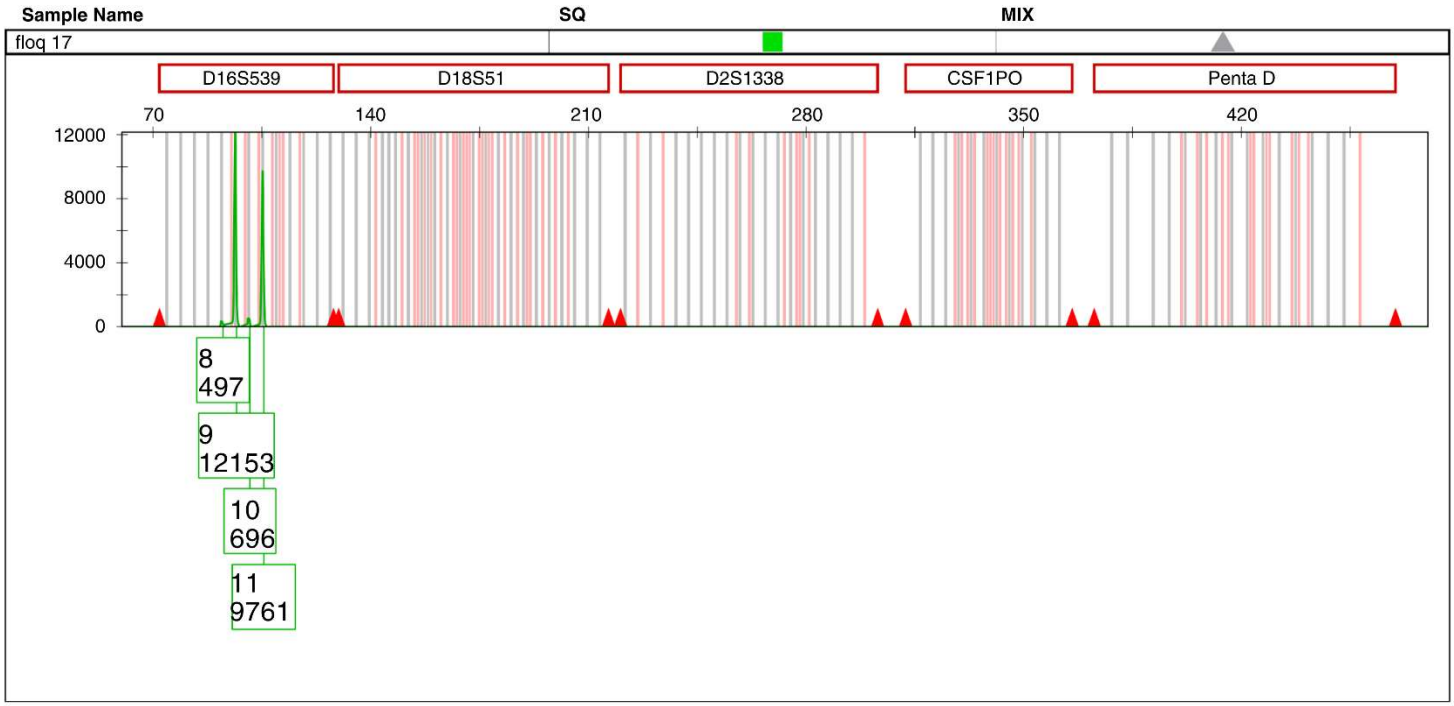

floq 16
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
5400
3600
1800
0
6 159
16 513
29 347
9 1518
11 1253
8 451
7 7029
17 3972
30 4318
11 172
12 140
8 256
18 3022
12 1339
13 1056
9 6034
9.3 377

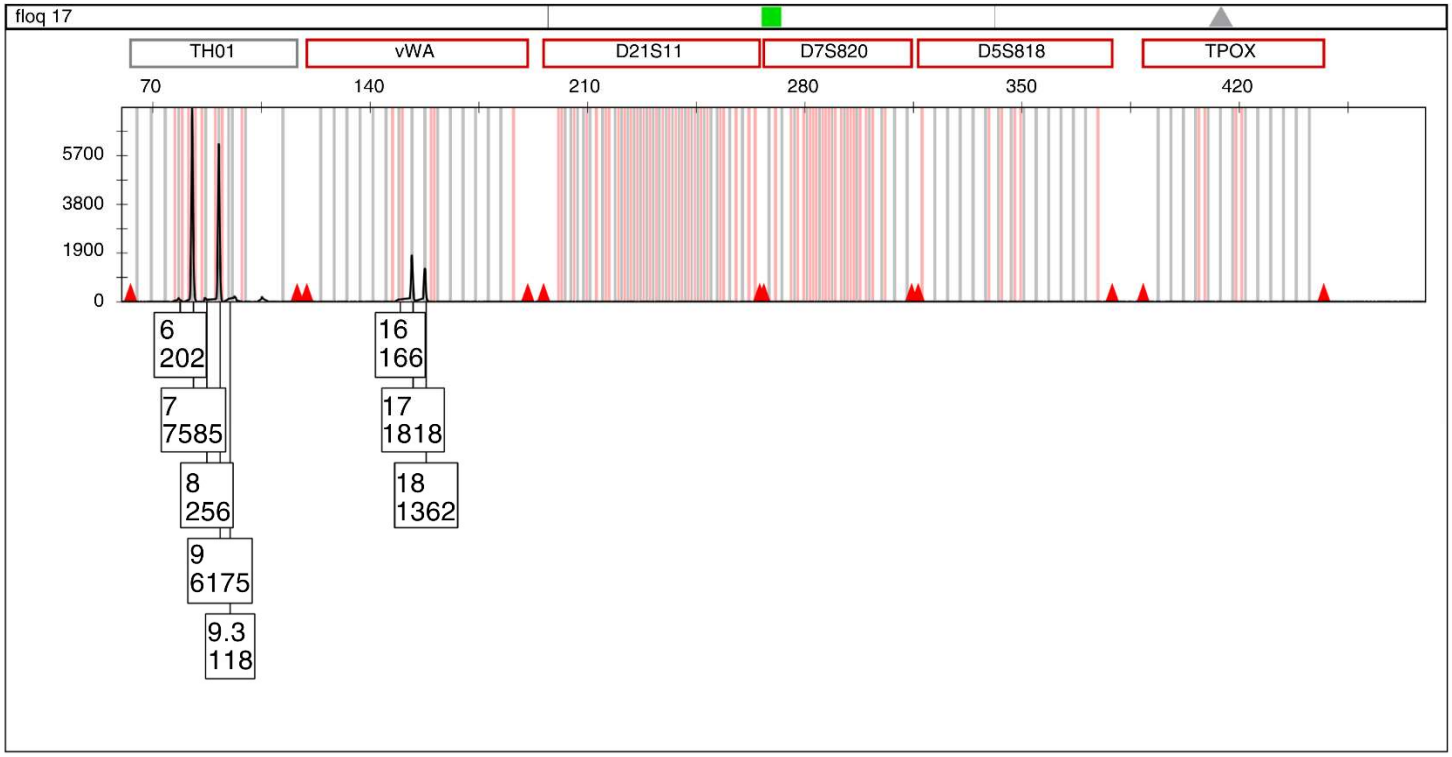




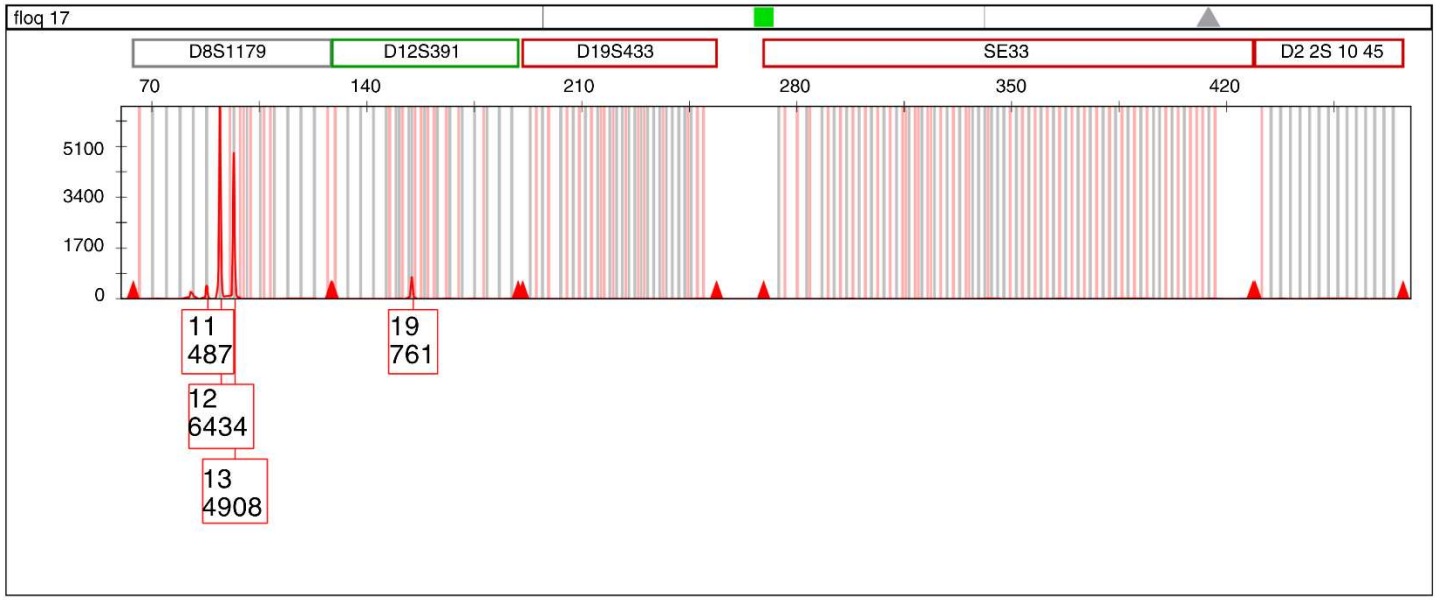


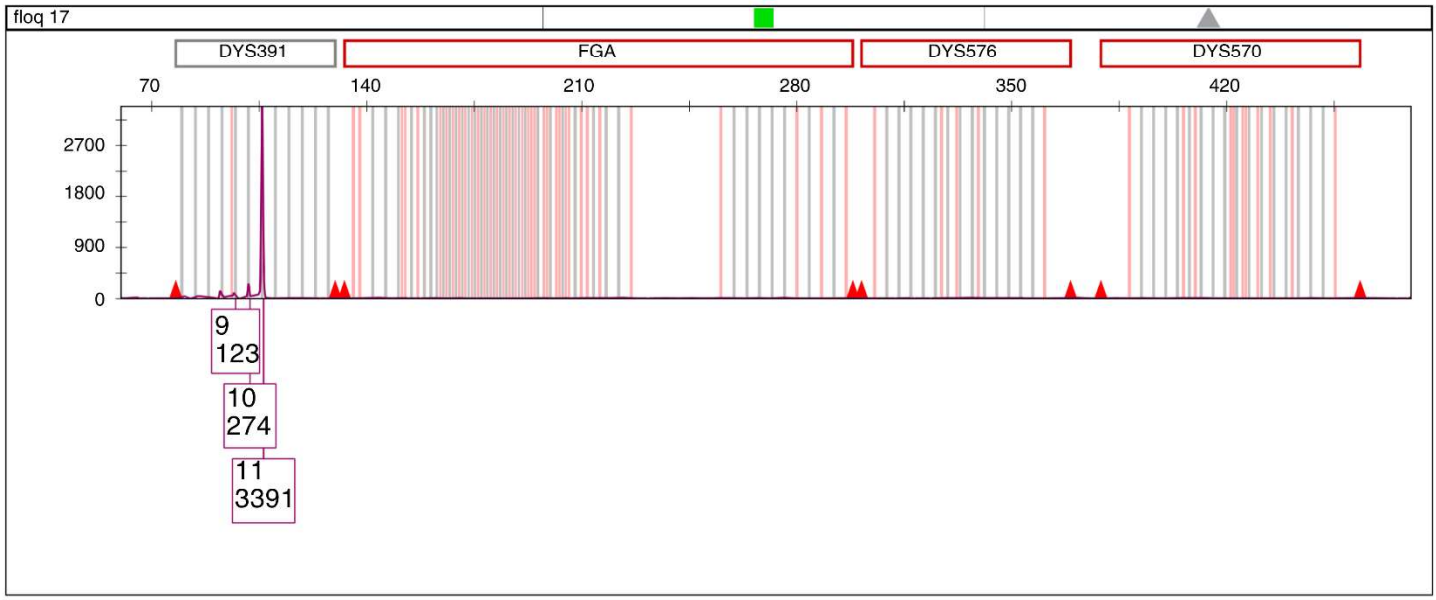
microFLOQ (impr. contaminata da sangue diluito LCV)

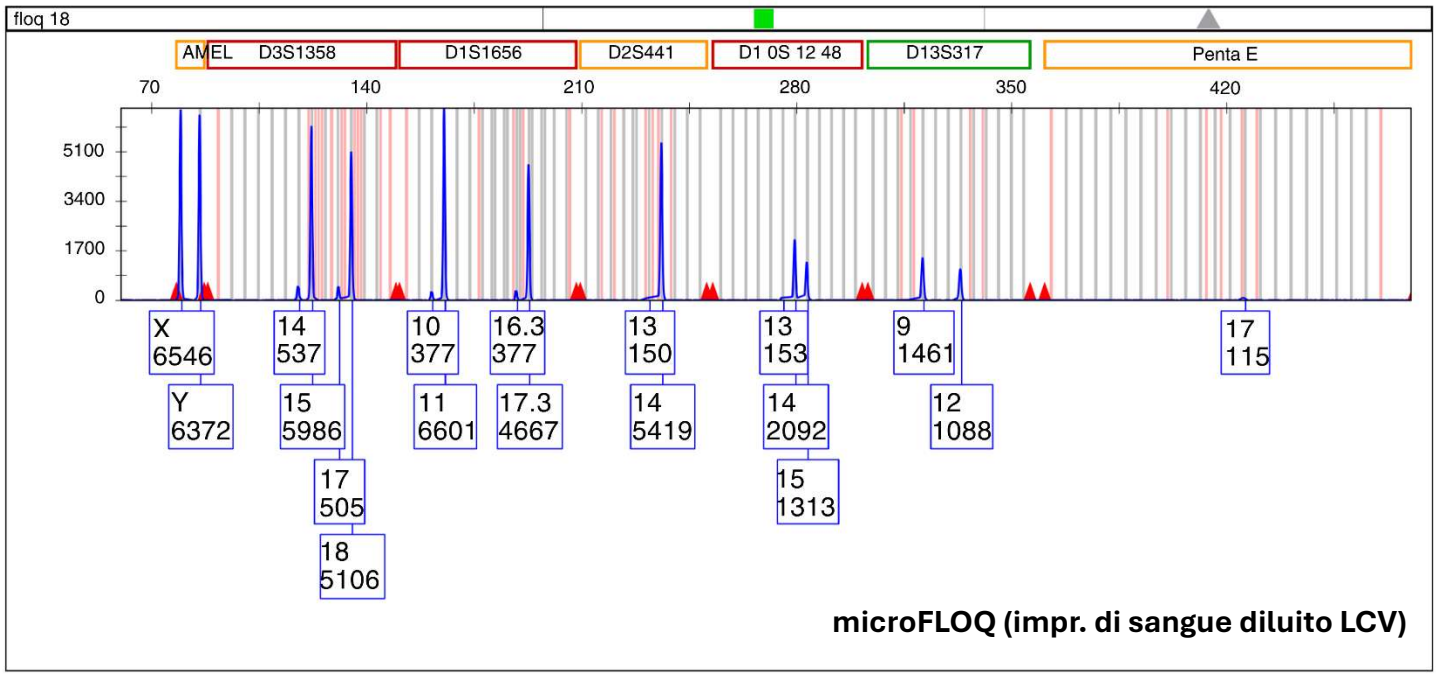

Sample Name
SQ
MIX
flog 17
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
12000
8000
4000
0
8
497
9
12153
10
696
11
9761


flog 17
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
5700
3800
1900
0
6
202
7
7585
8
256
9
6175
9.3
118
16
166
17
1818
18
1362

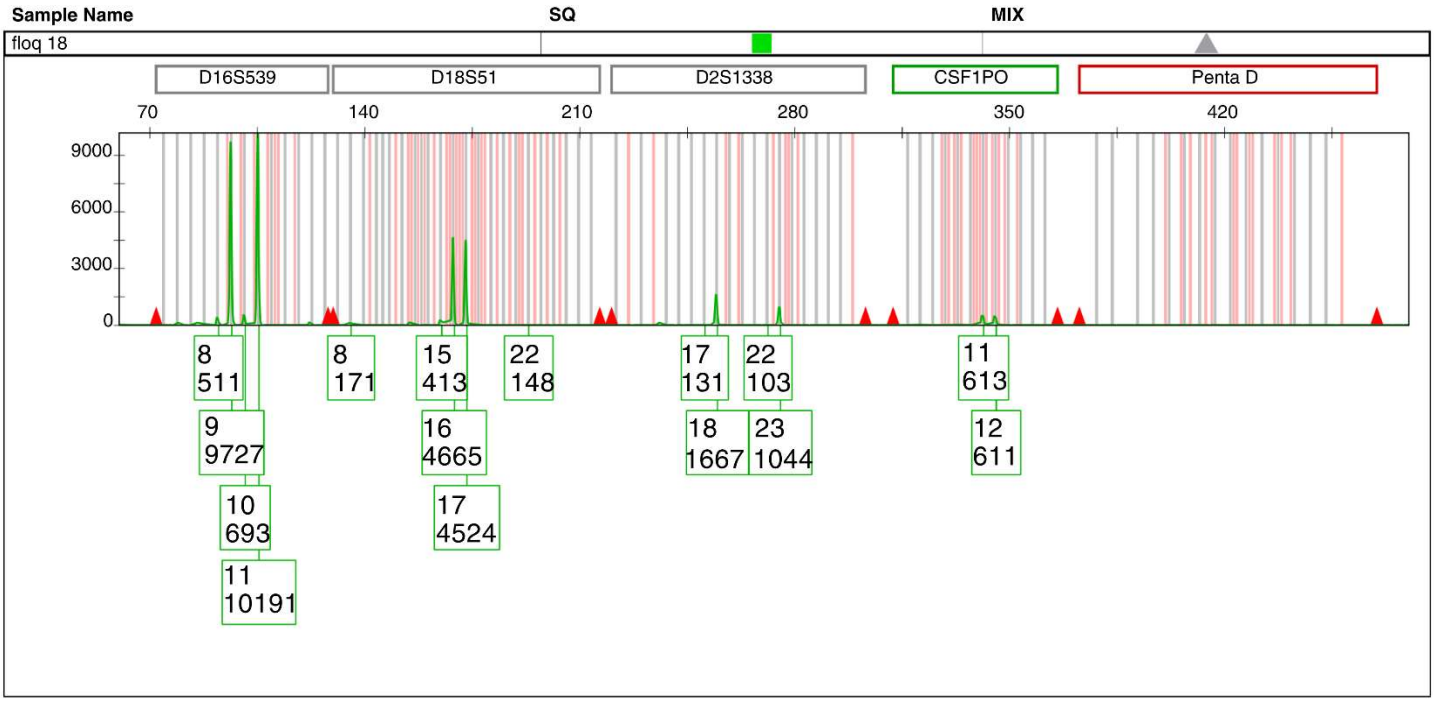
Sample Name **SQ** **MIX**

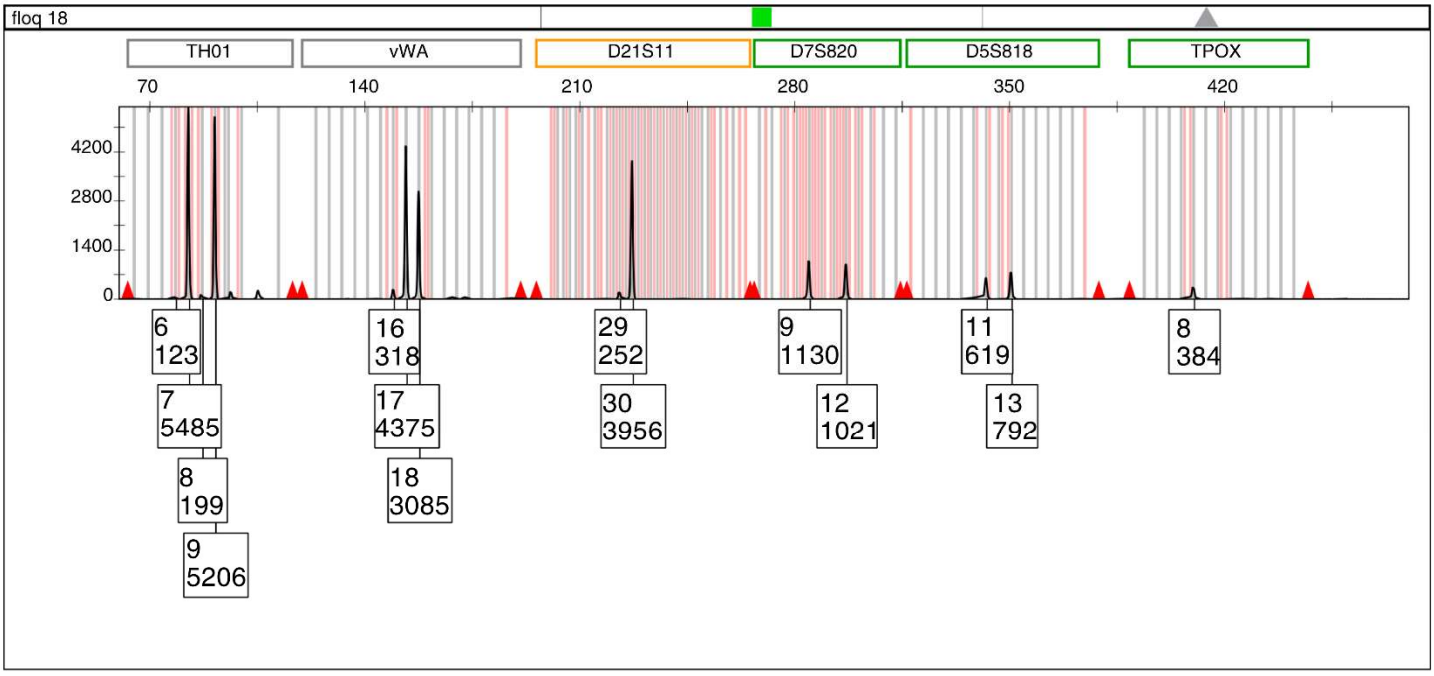


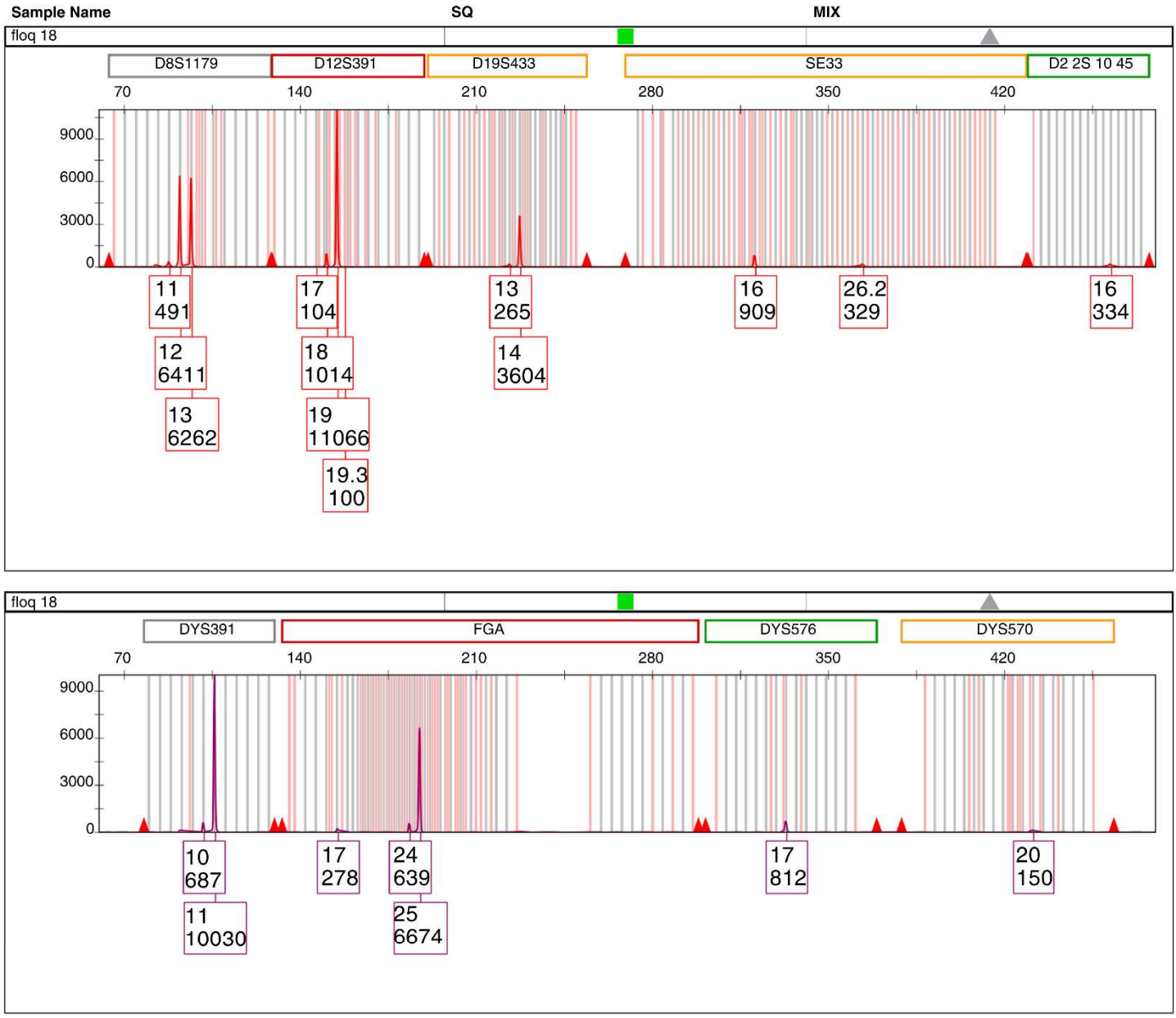


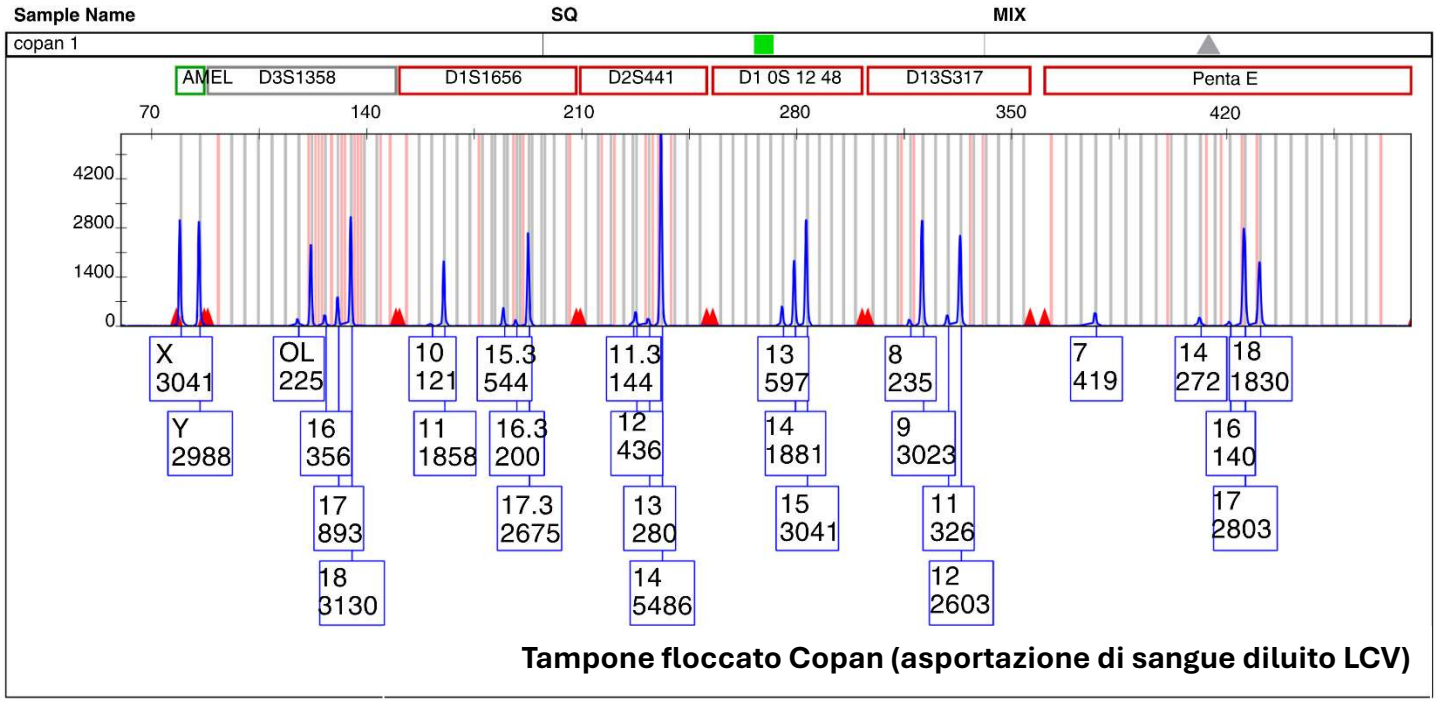


microFLOQ (impr. di sangue diluito LCV)

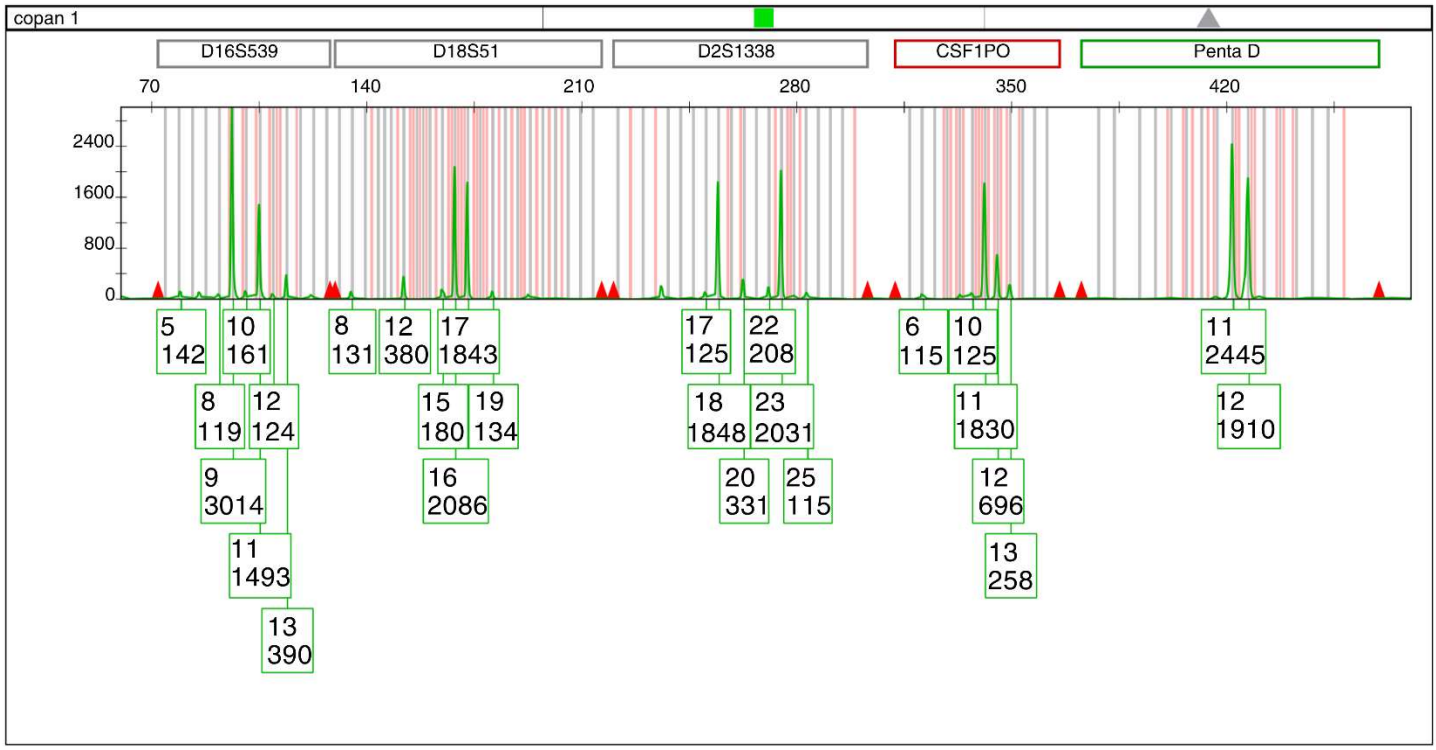

Sample Name
SQ
MIX
floq 18
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
9000
6000
3000
0
8
511
9
9727
10
693
11
10191
8
171
15
413
16
4665
17
4524
22
148
17
131
18
1667
22
103
23
1044
11
613
12
611


floq 18
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
4200
2800
1400
0
6
123
7
5485
8
199
9
5206
16
318
17
4375
18
3085
29
252
30
3956
9
1130
12
1021
11
619
13
792
8
384

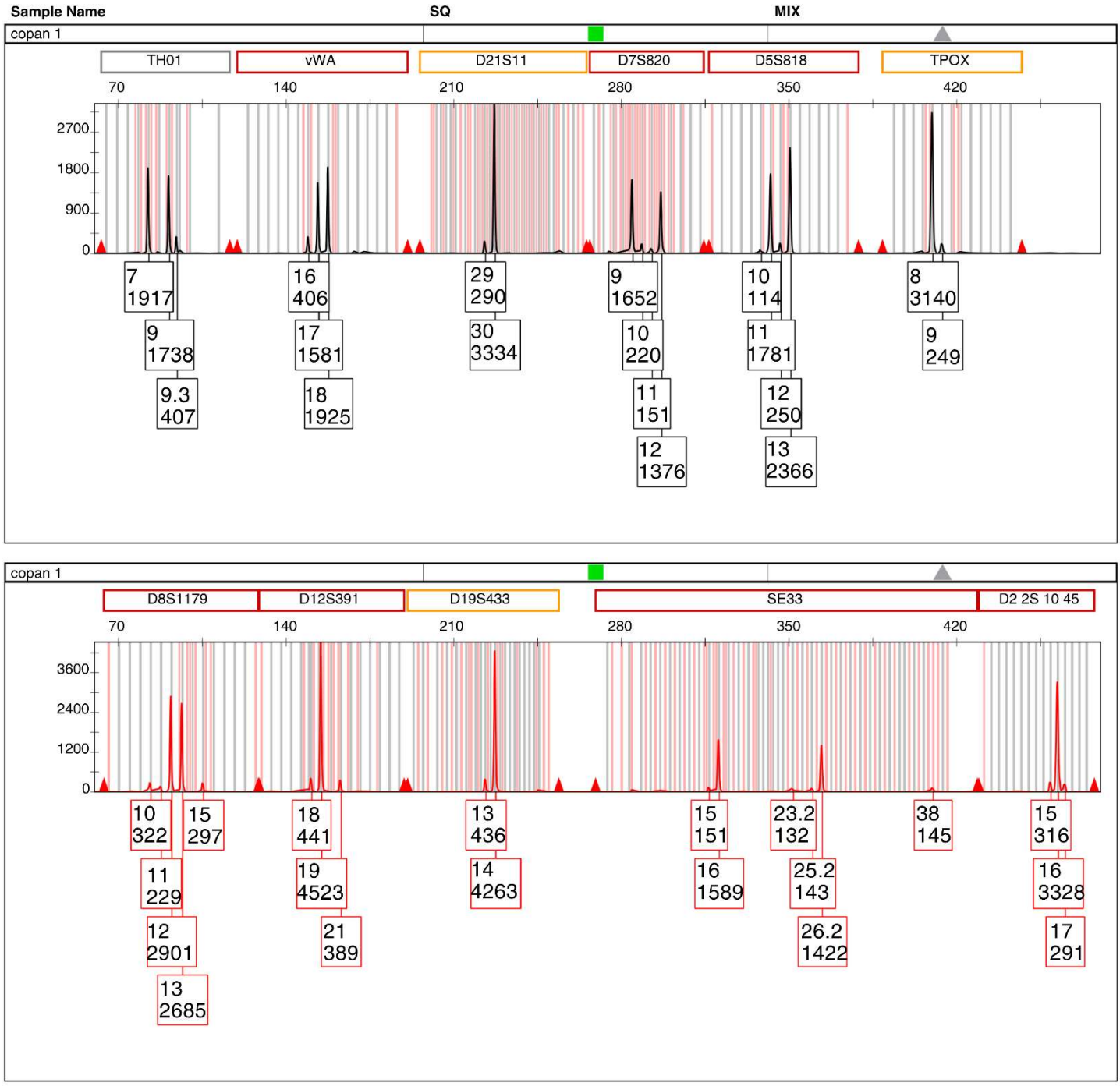

Sample Name
SQ
MIX
floq 18
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
9000
6000
3000
0
11
491
12
6411
13
6262
17
104
18
1014
19
11066
19.3
100
13
265
14
3604
16
909
26.2
329
16
334
floq 18
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
9000
6000
3000
0
10
687
11
10030
17
278
24
639
25
6674
17
812
20
150

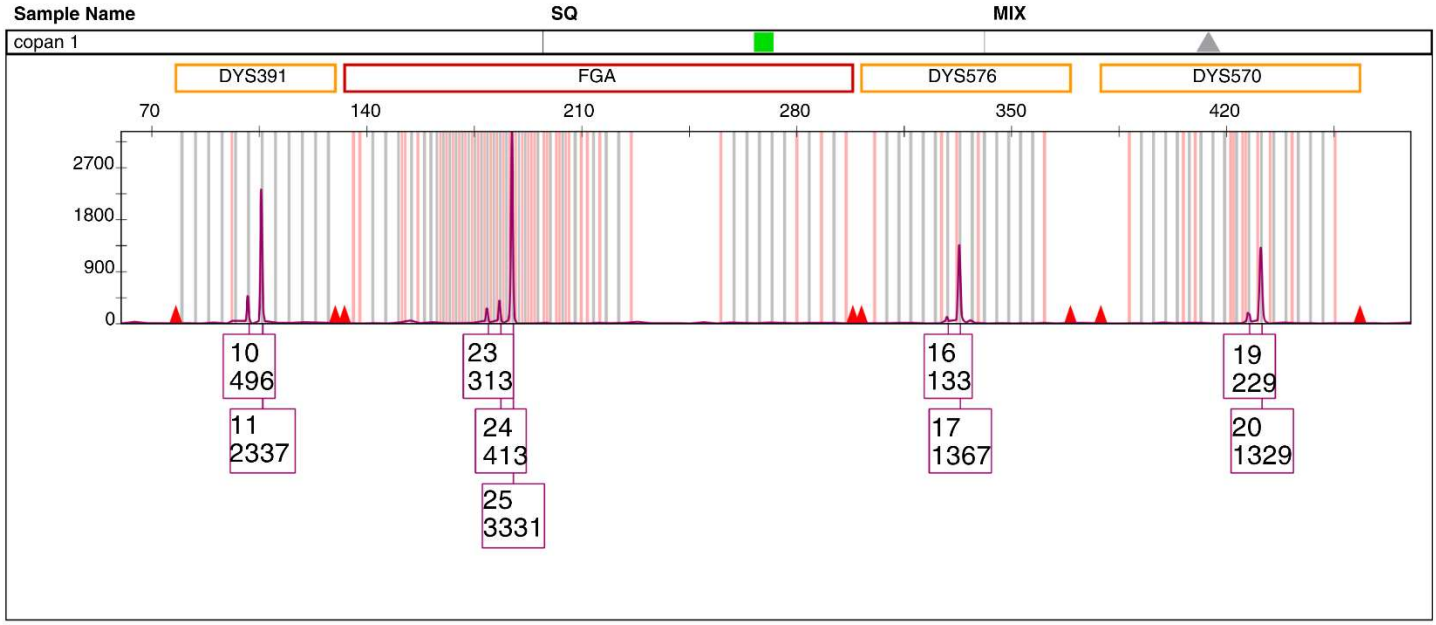


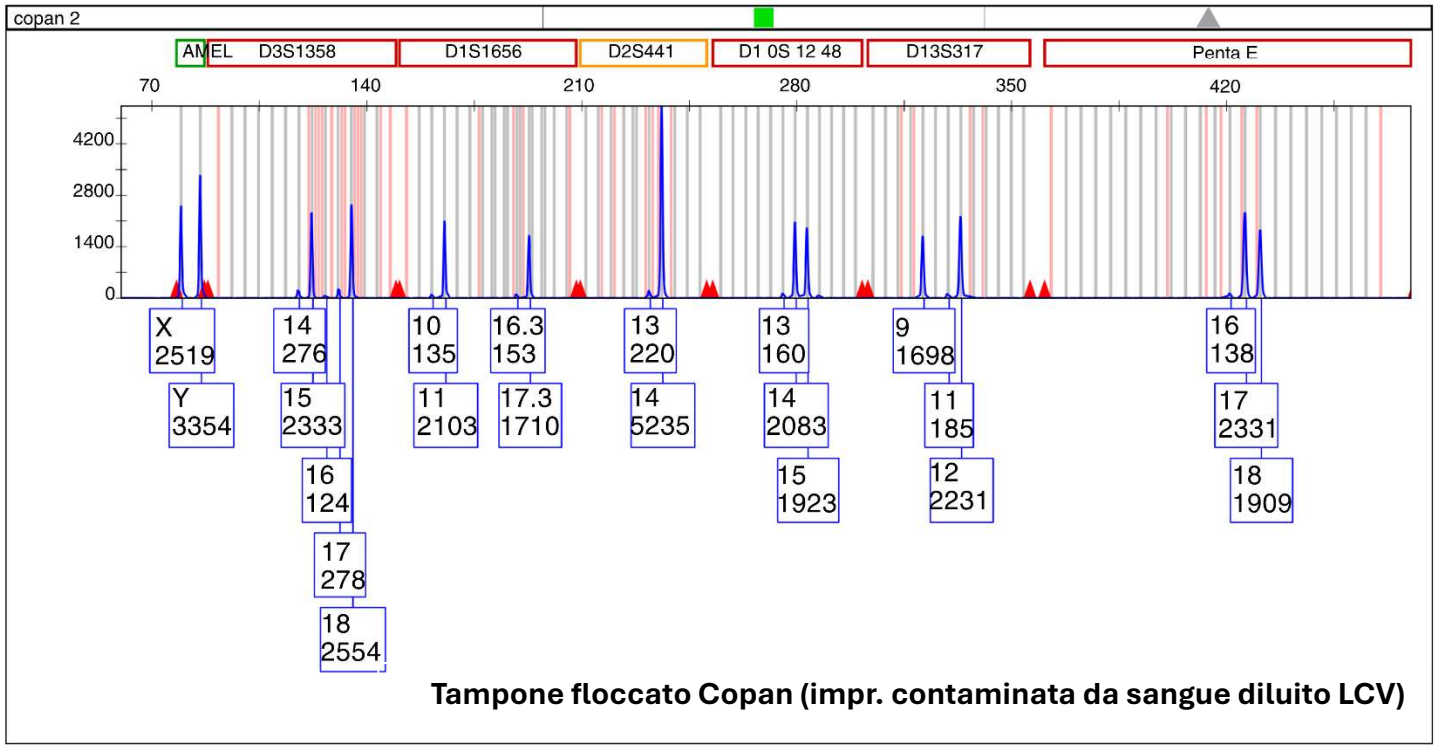
Tampone floccato Copan (asportazione di sangue diluito LCV)



GeneMapper™ ID-X 1.6

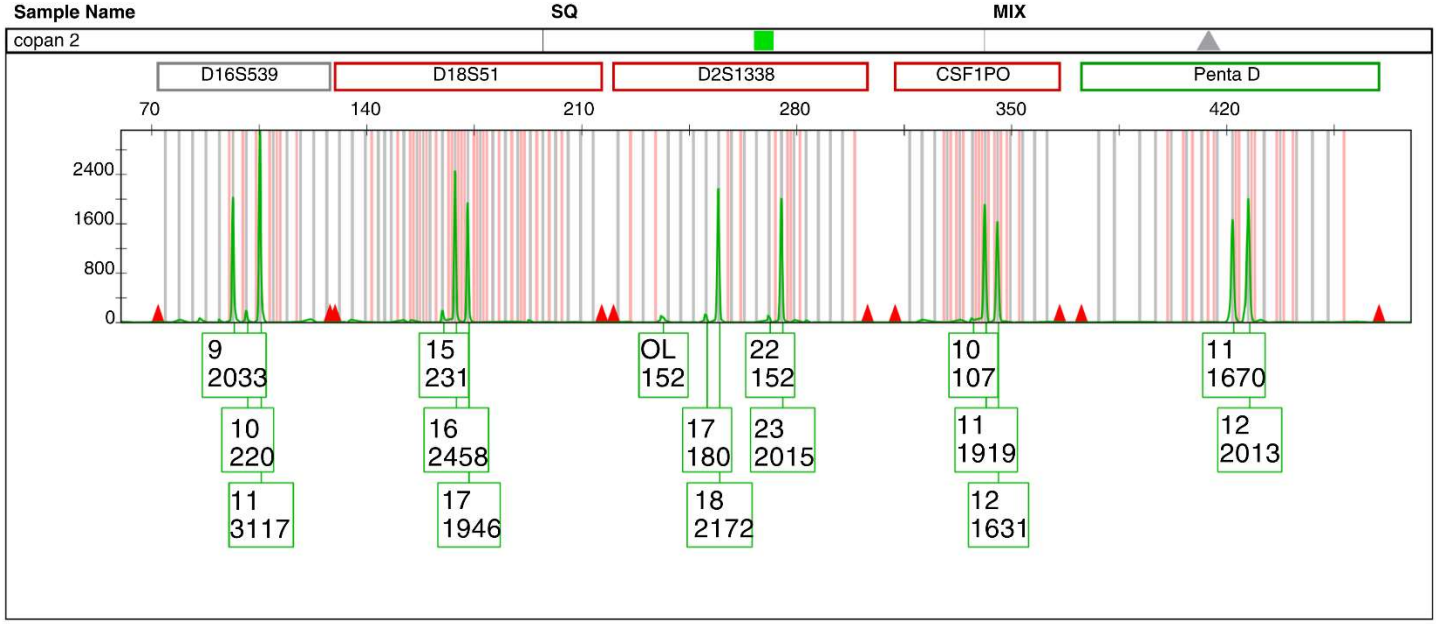


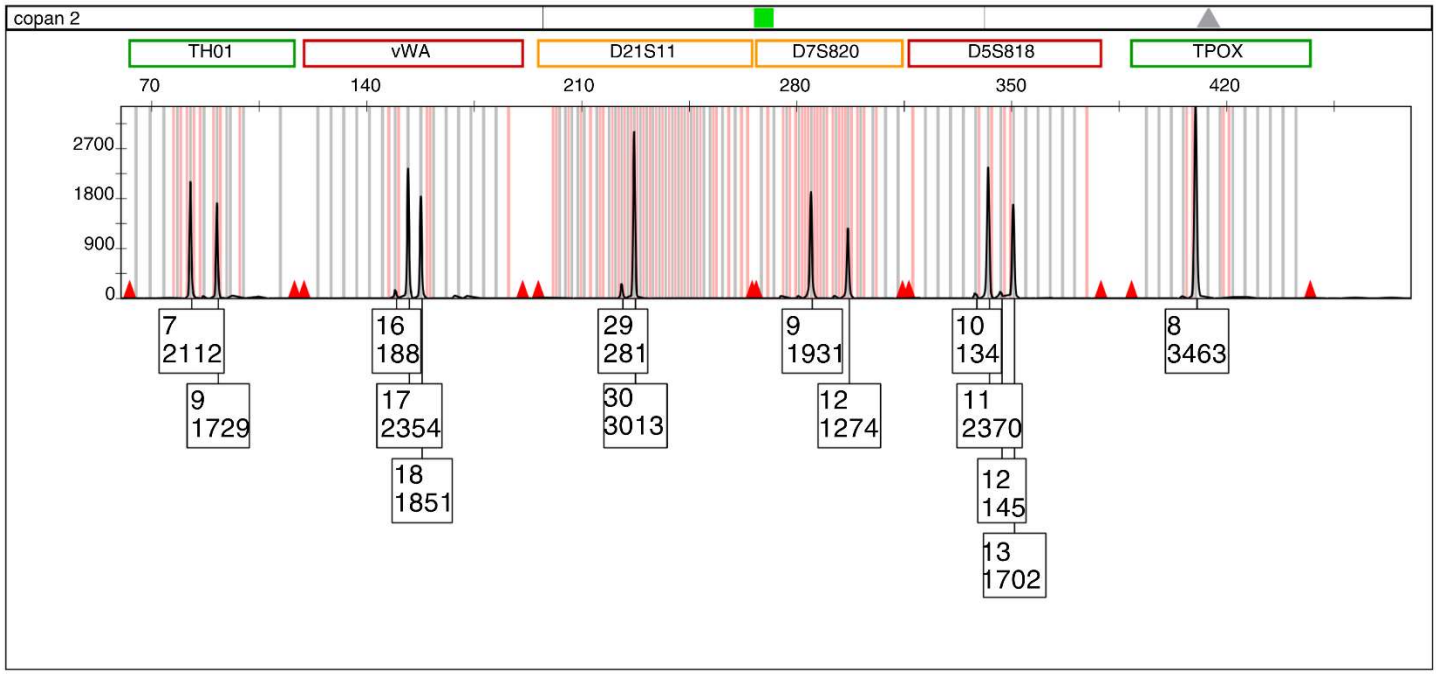


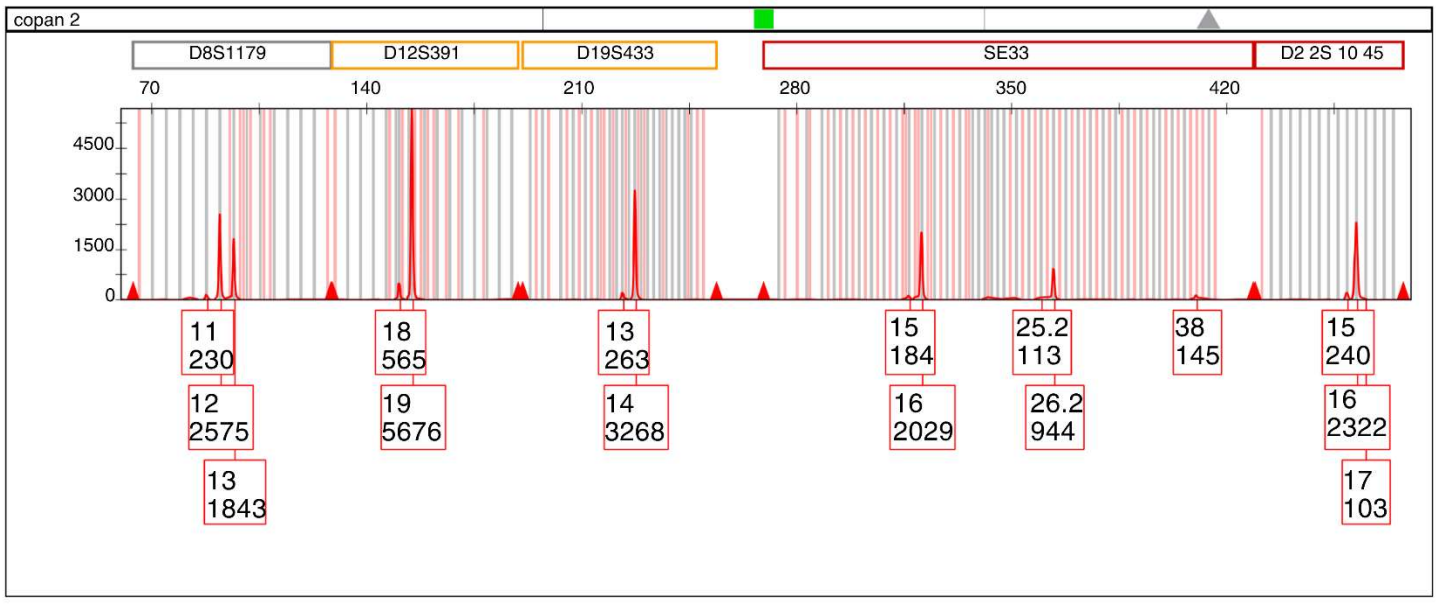


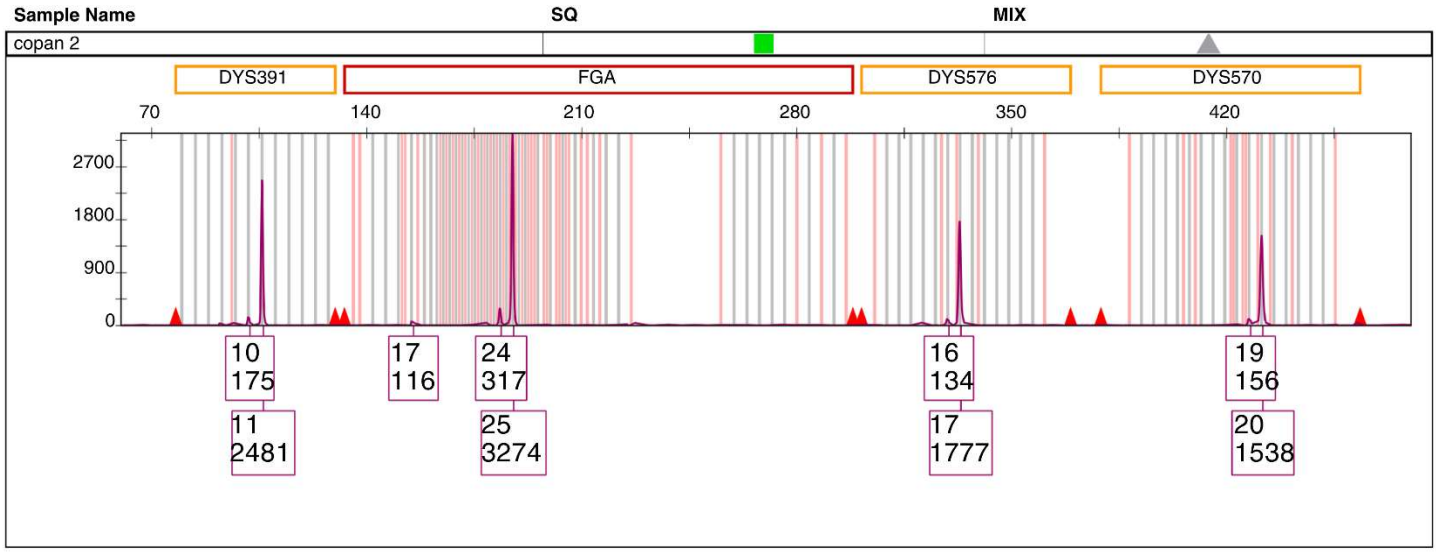
Tampone floccato Copan (impr. contaminata da sangue diluito LCV)

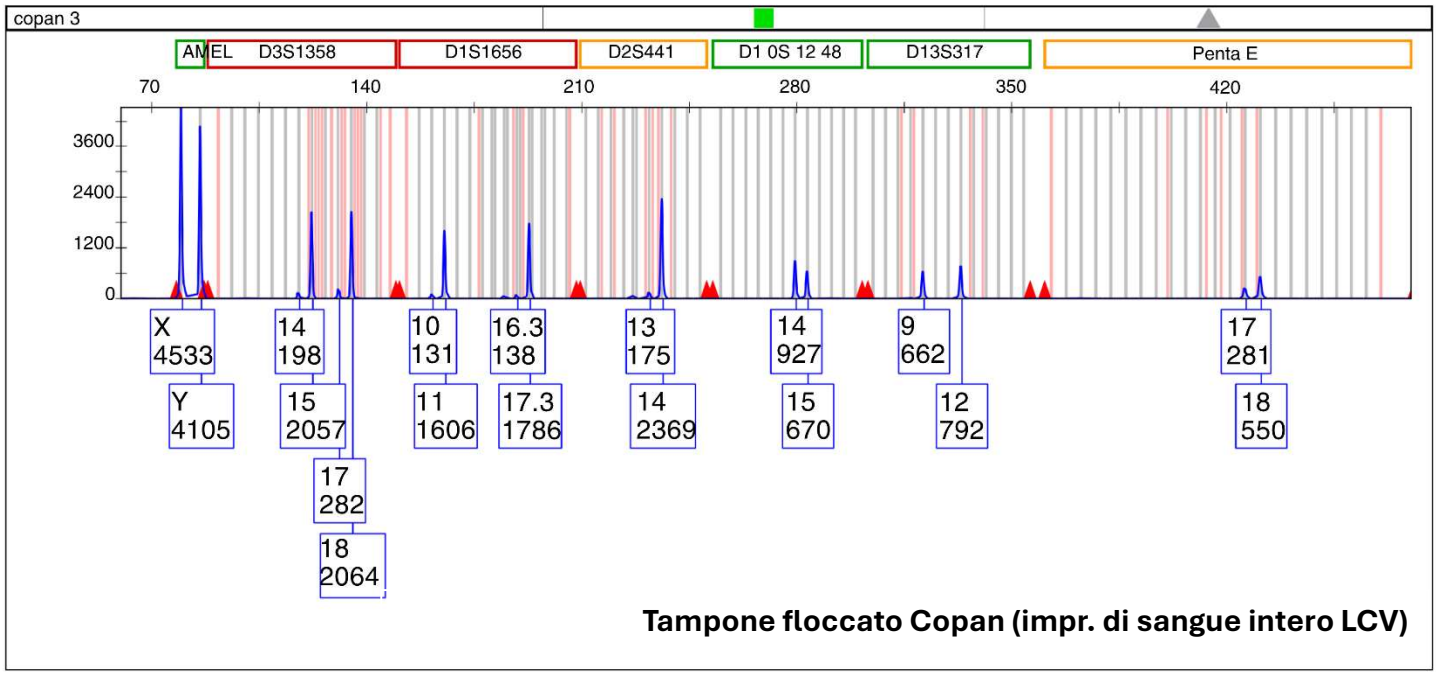
Sample Name **SQ** **MIX**



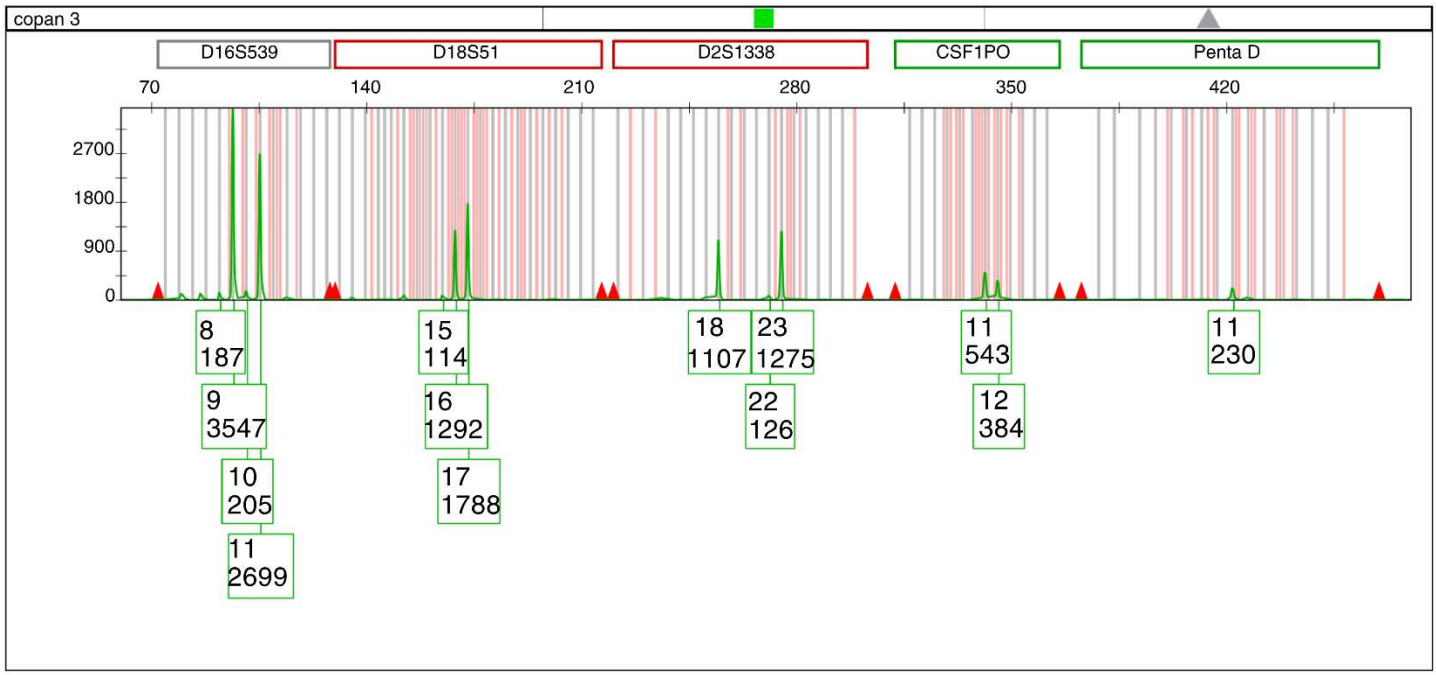




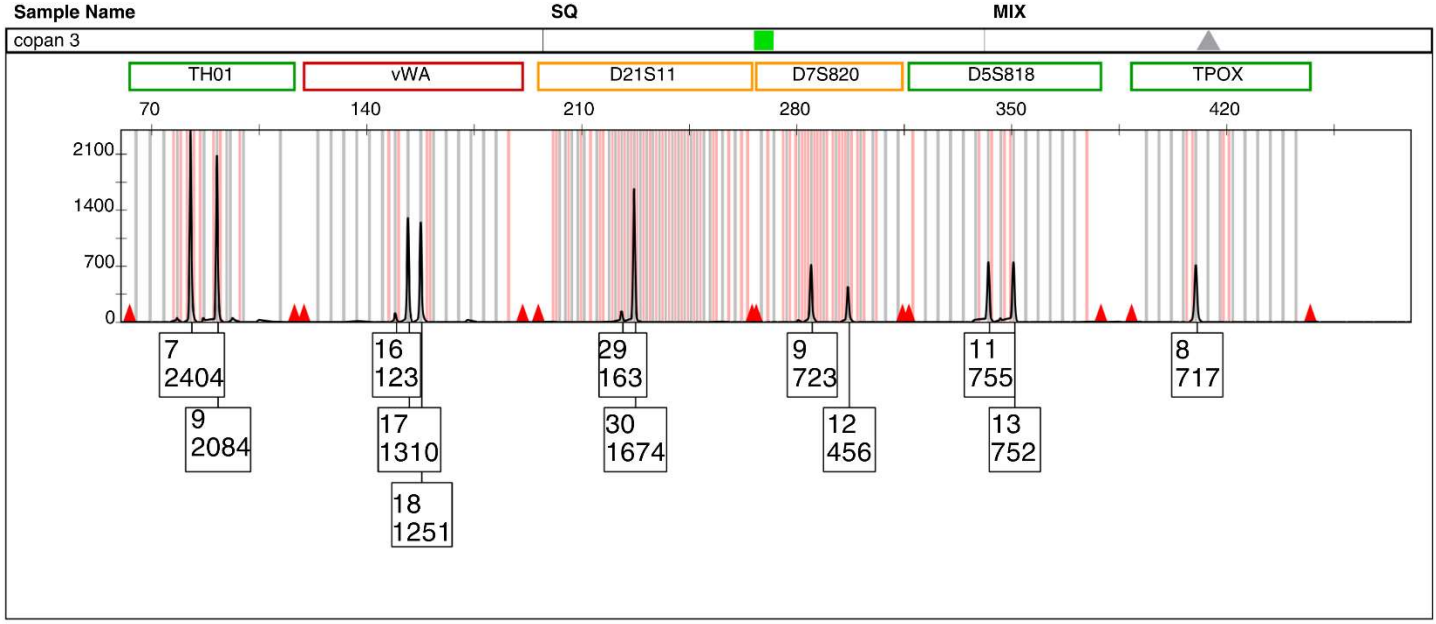


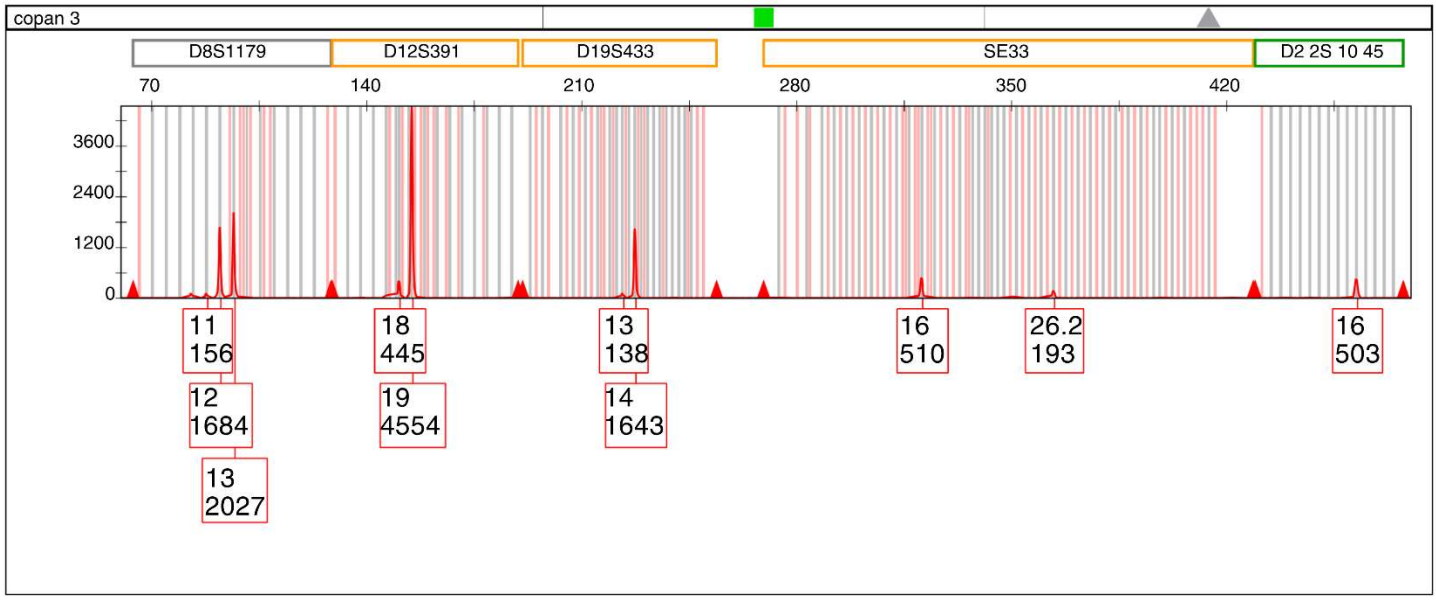


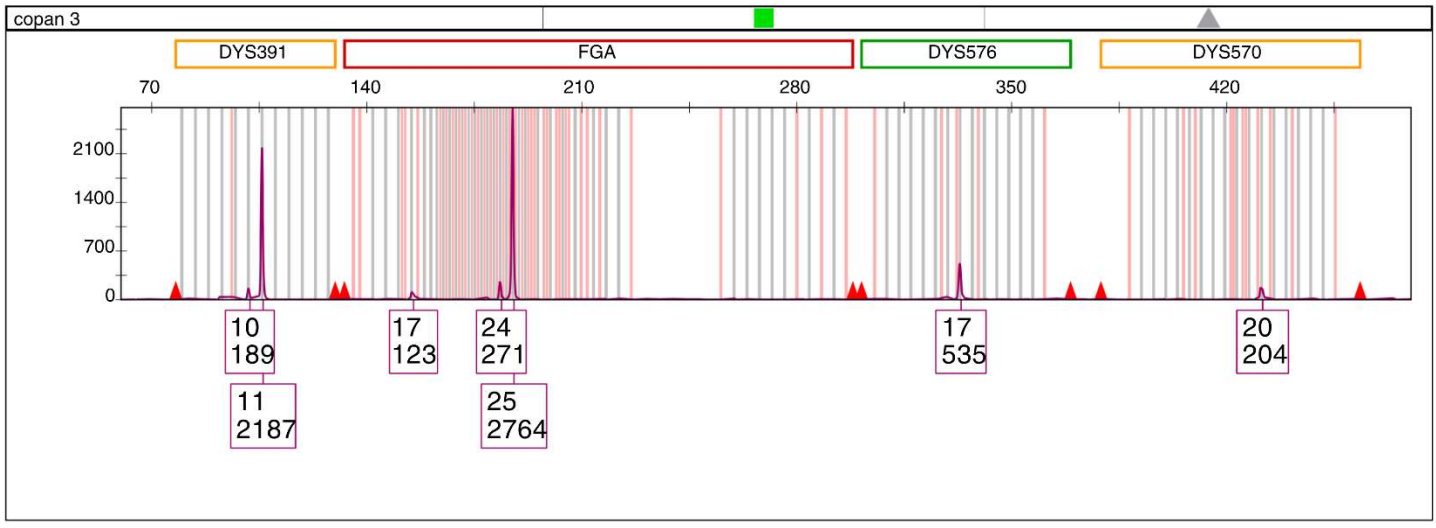
Tampone floccato Copan (impr. di sangue intero LCV)

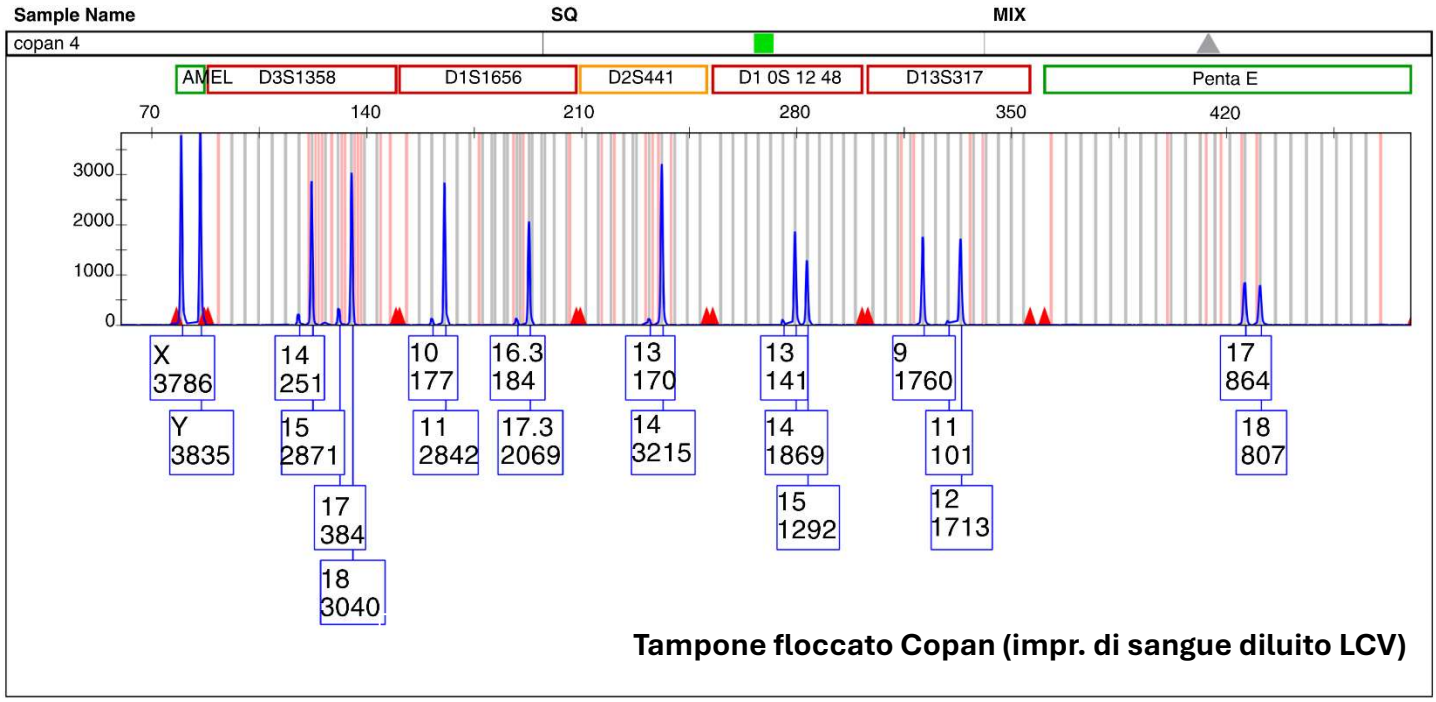


Sample Name **SQ** **MIX**

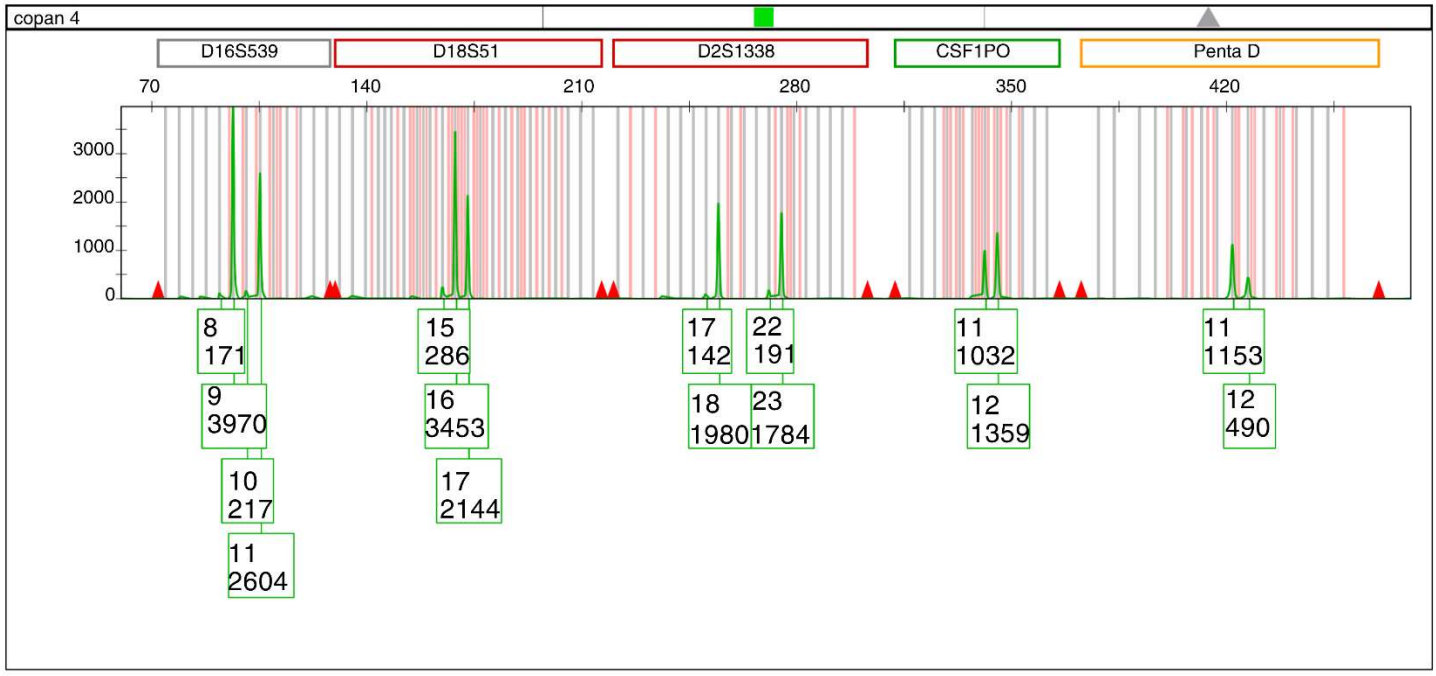




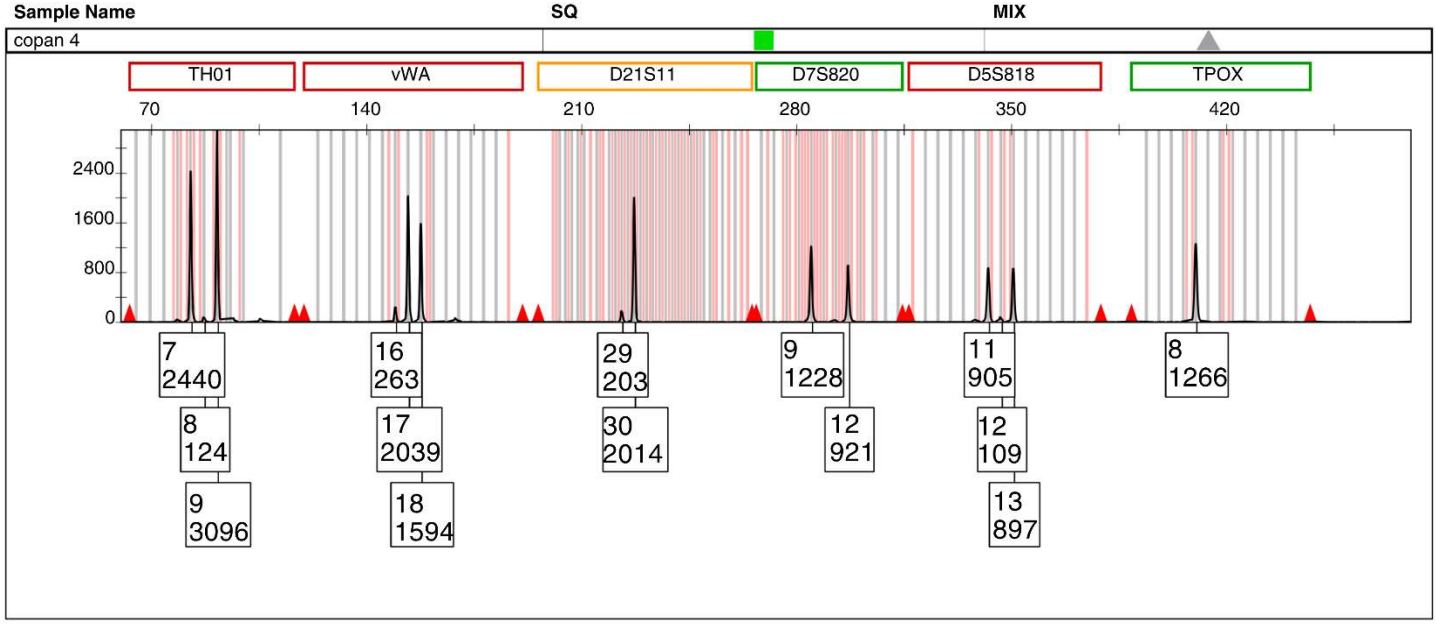


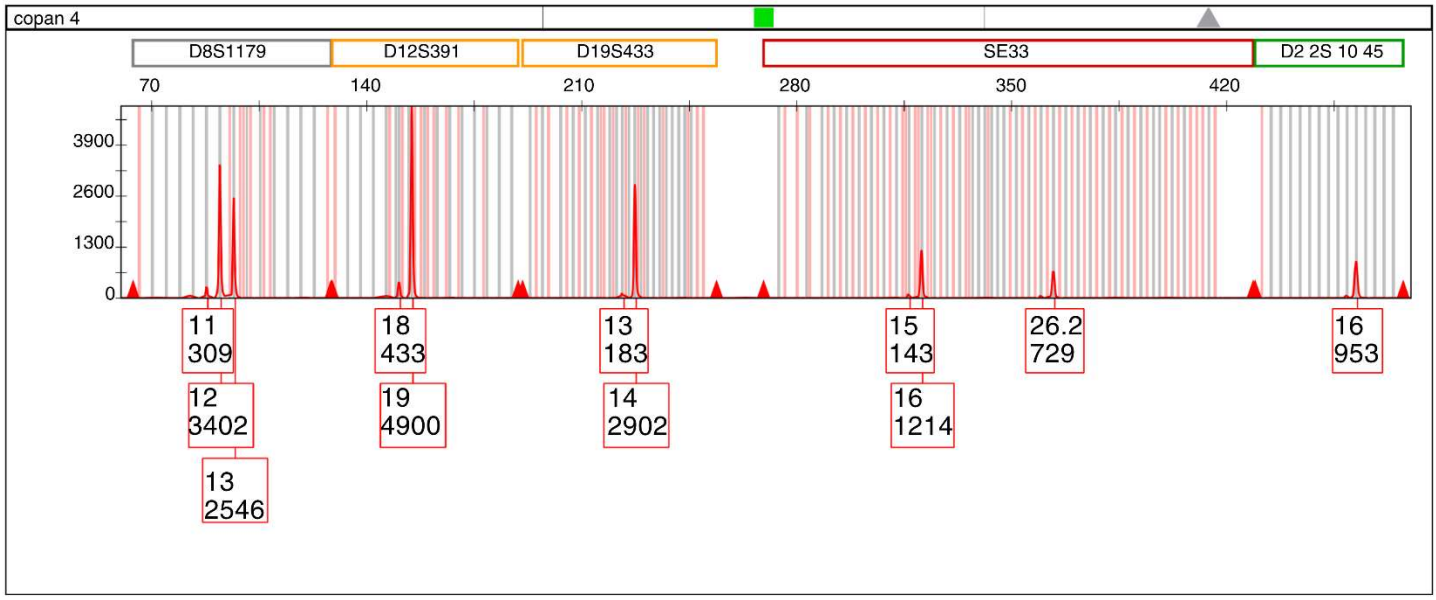


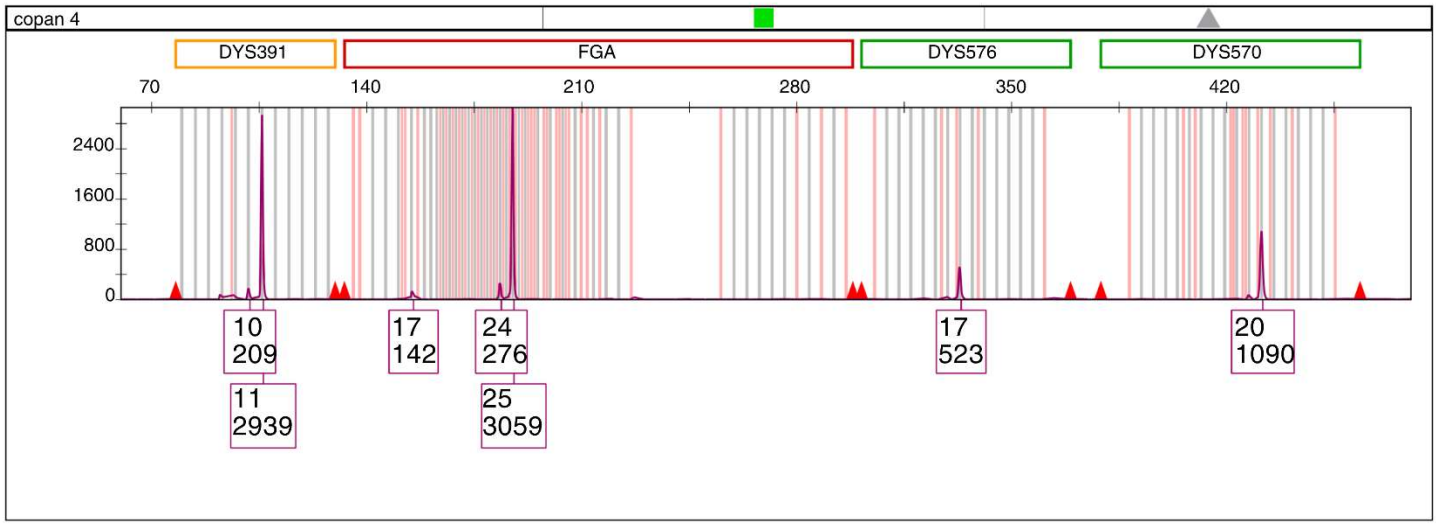
Tampone floccato Copan (impr. di sangue diluito LCV)



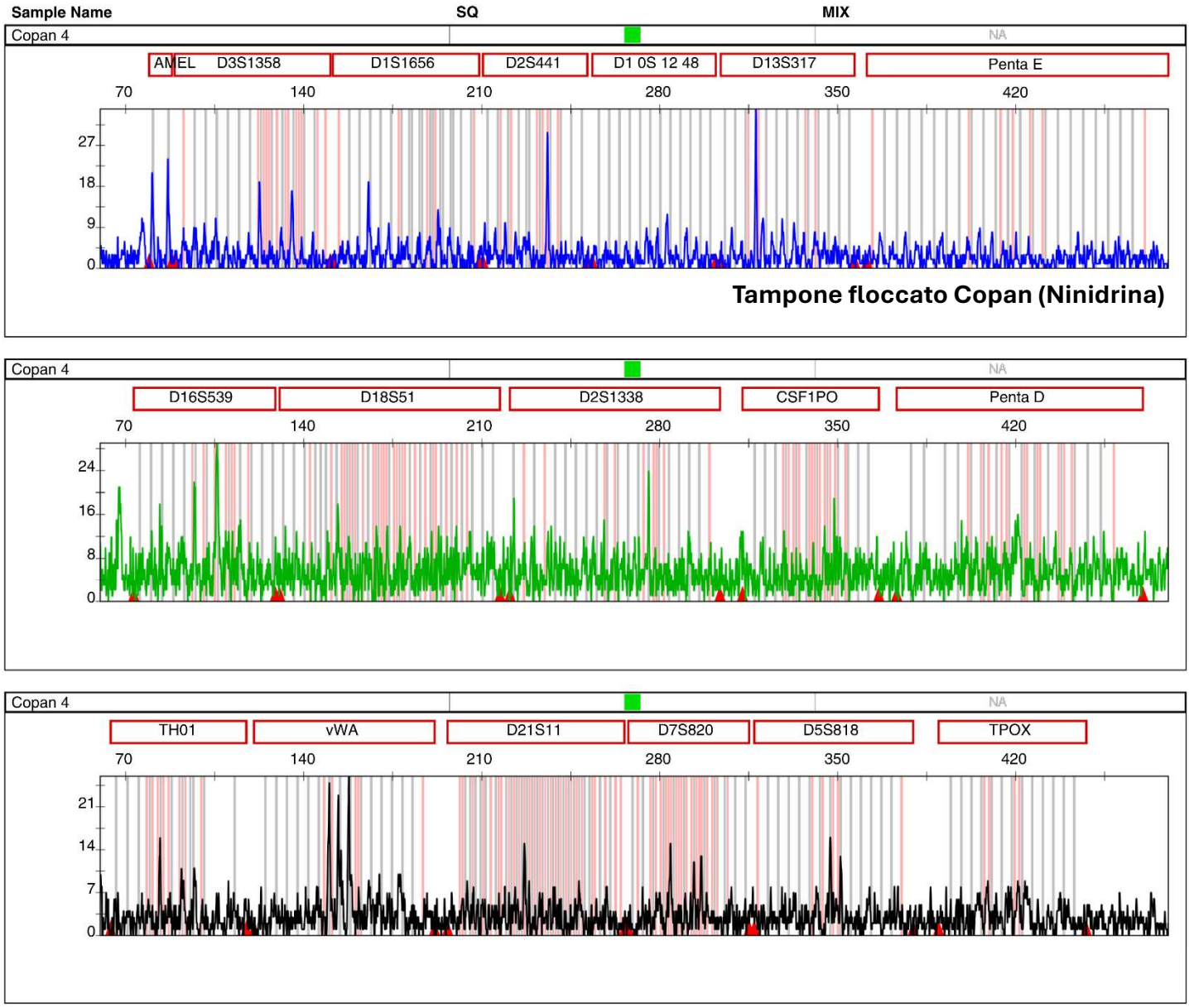
Sample Name **SQ** **MIX**



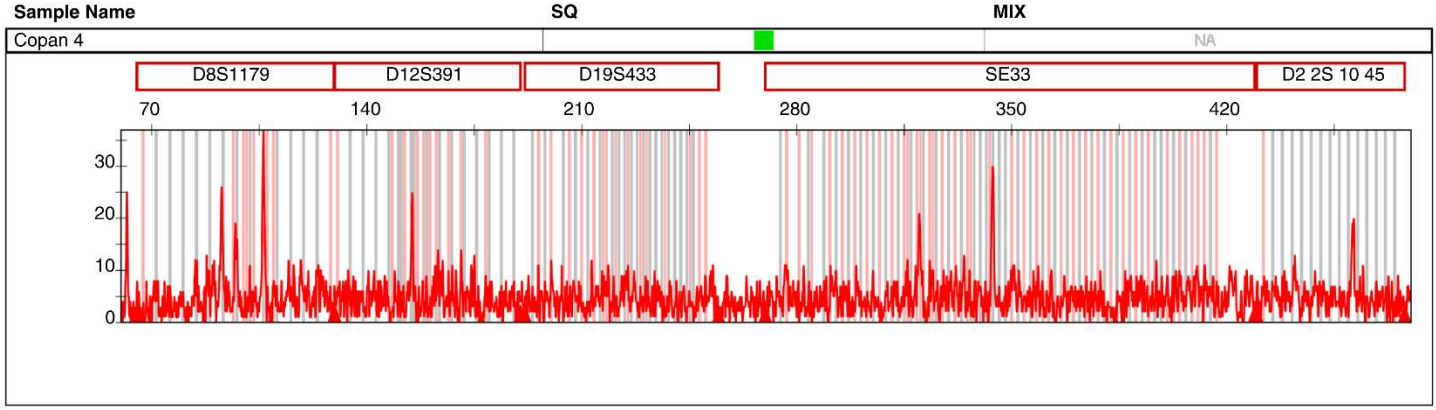


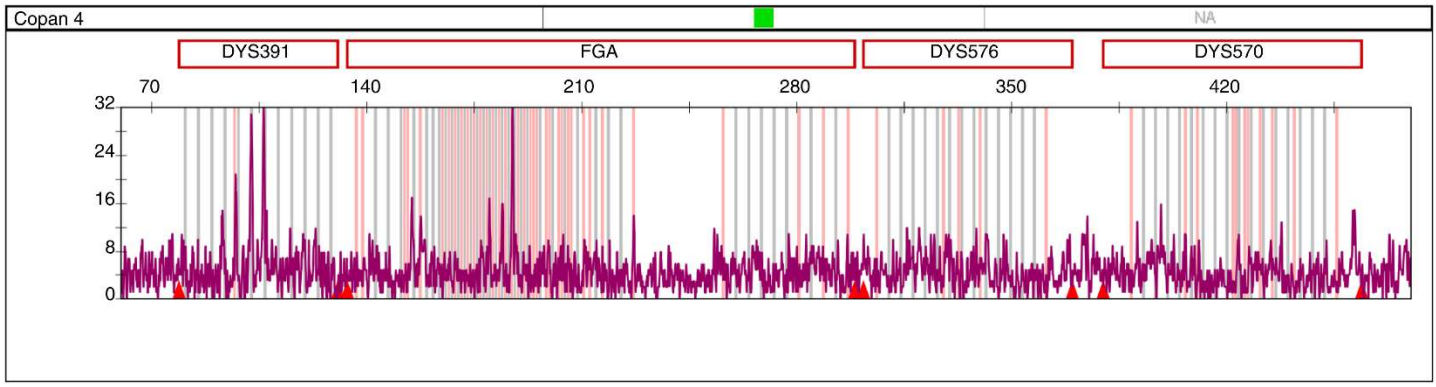


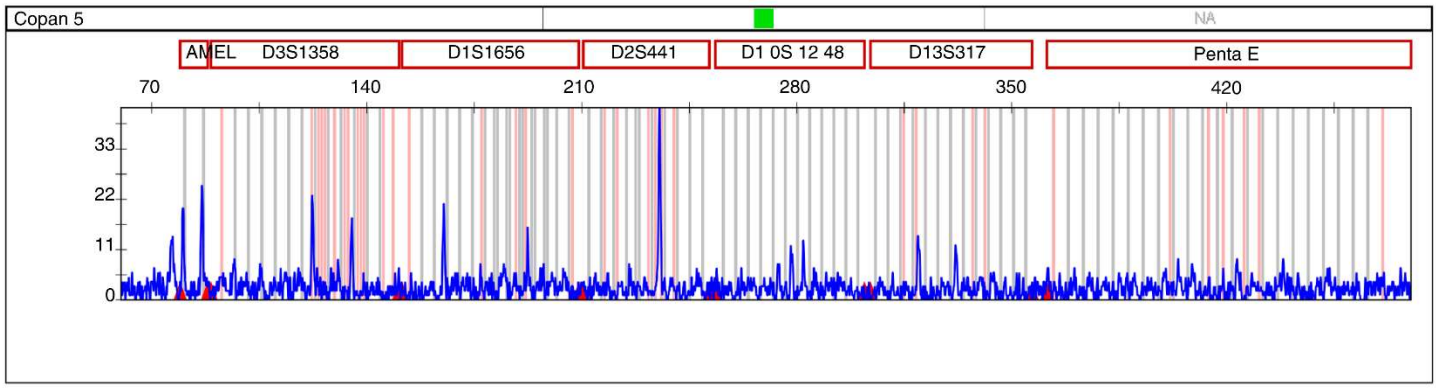
APPENDICE 7

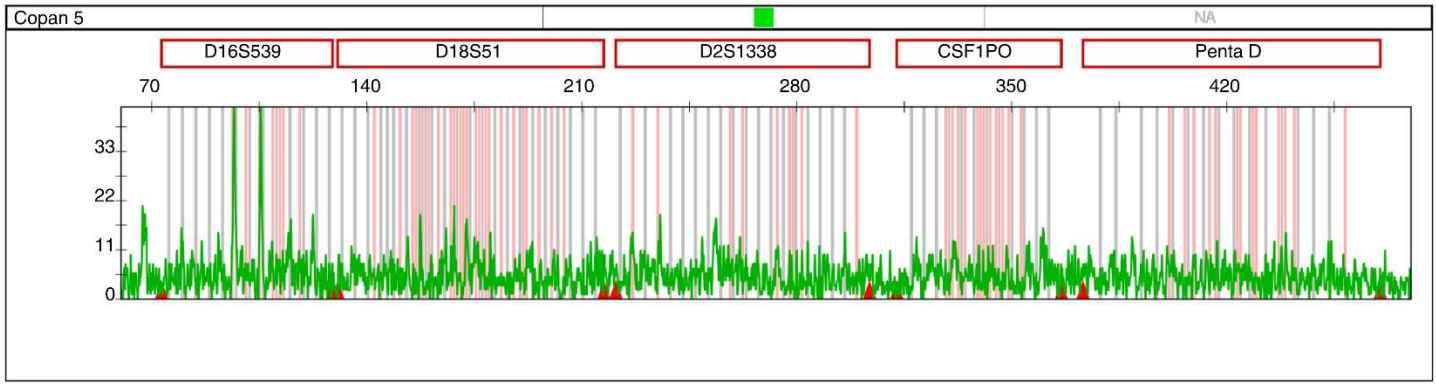

Sample Name
SQ
MIX
Copan 4
NA
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
27
18
9
0
Tampone floccato Copan (Ninidrina)
Copan 4
NA
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
24
16
8
0
Copan 4
NA
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
21
14
7
0

Sample Name **SQ** **MIX**

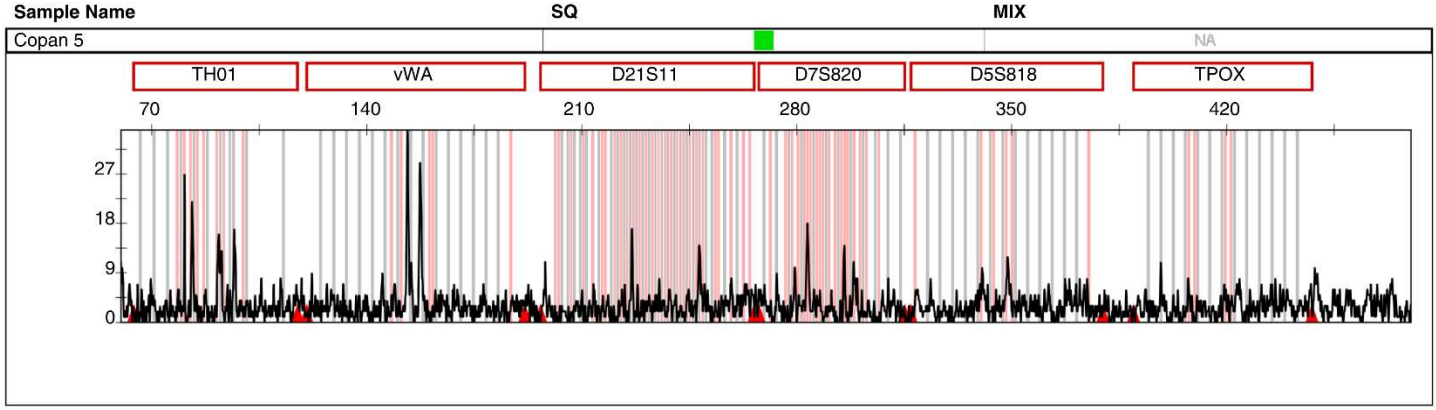


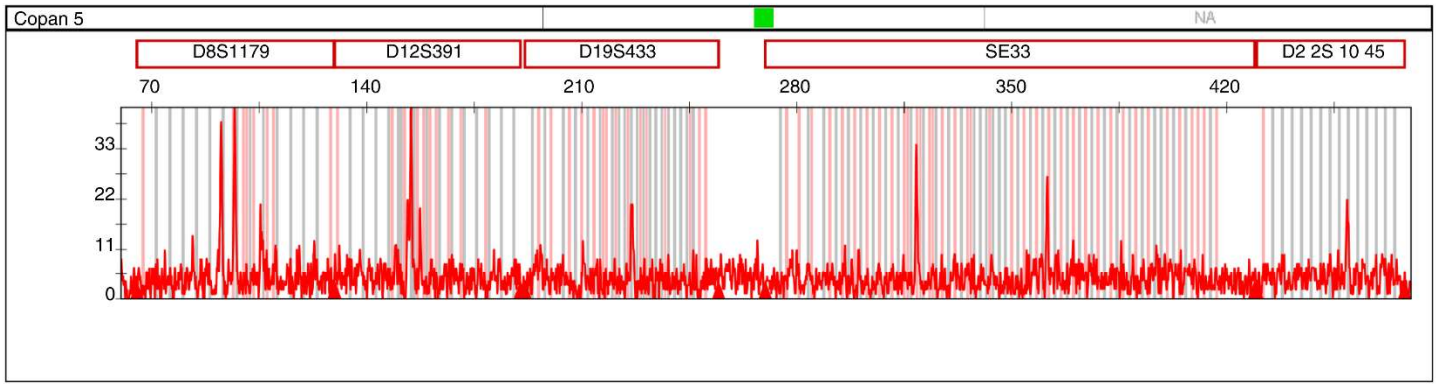


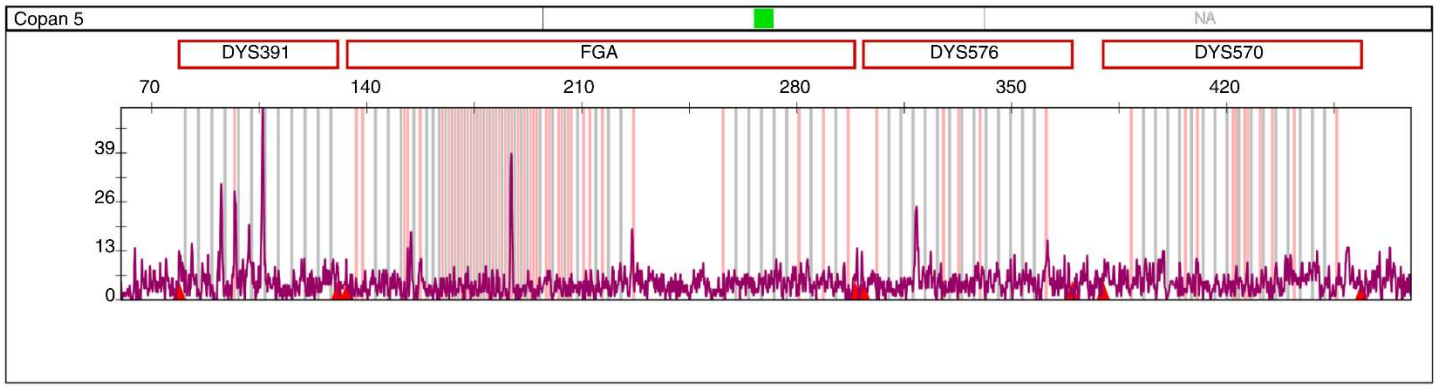


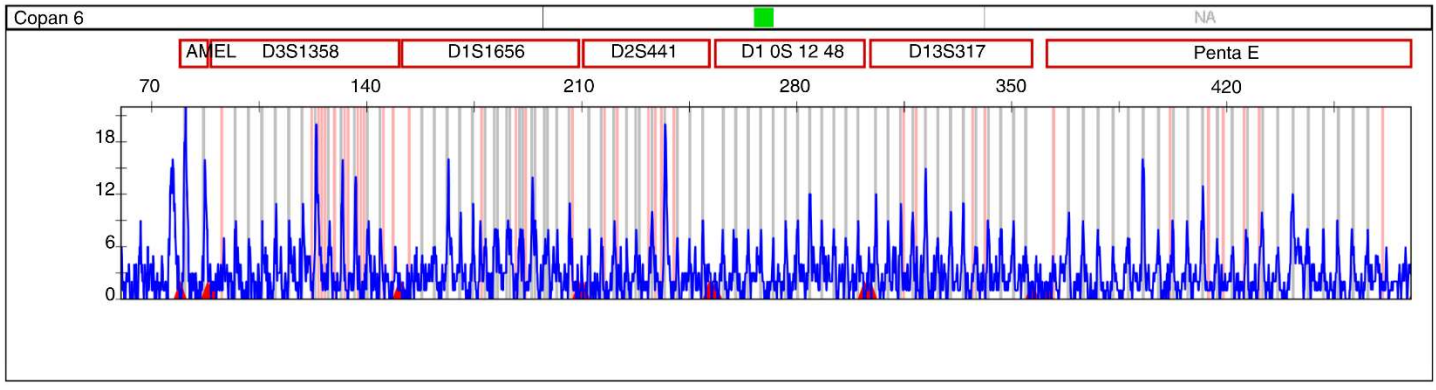


Sample Name **SQ** **MIX**

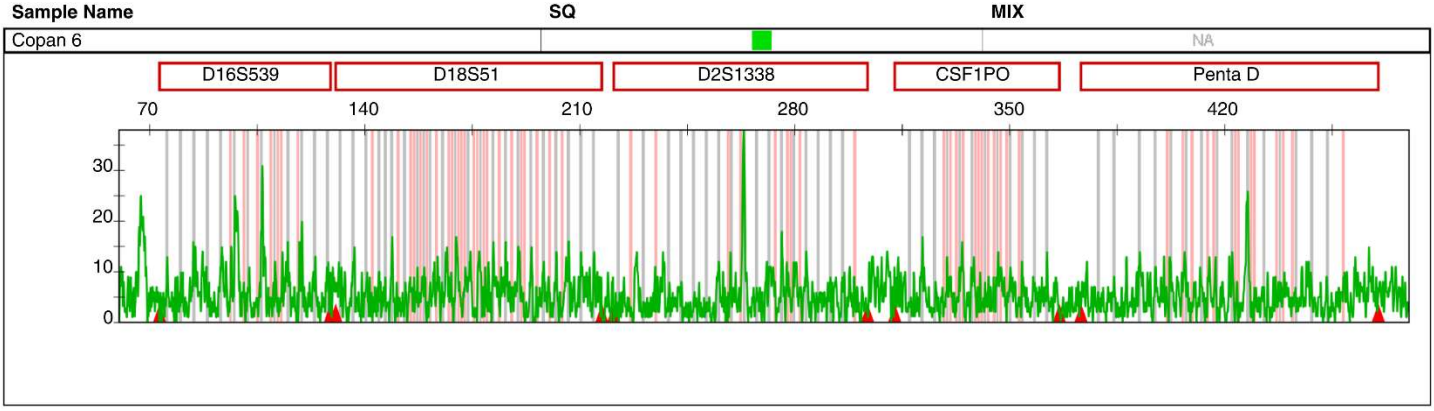


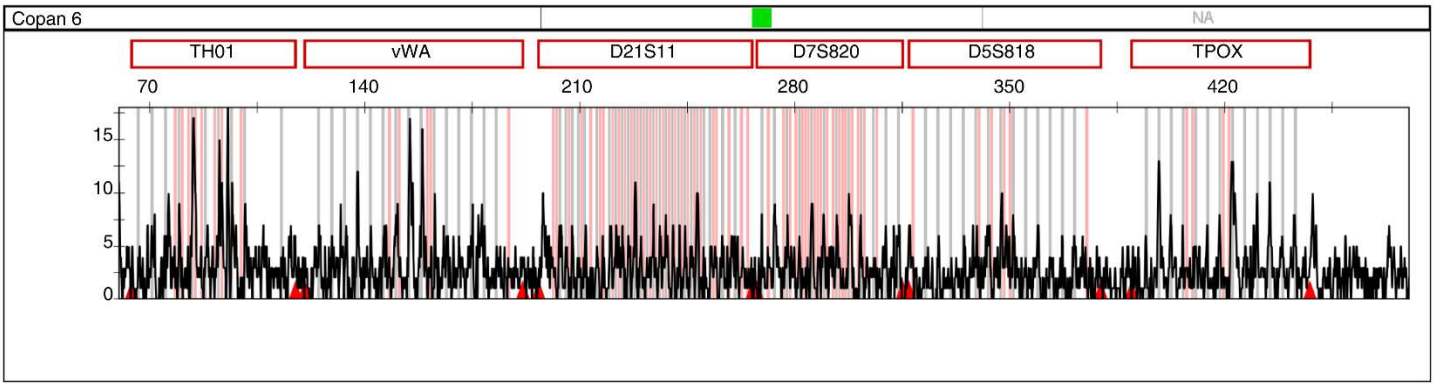


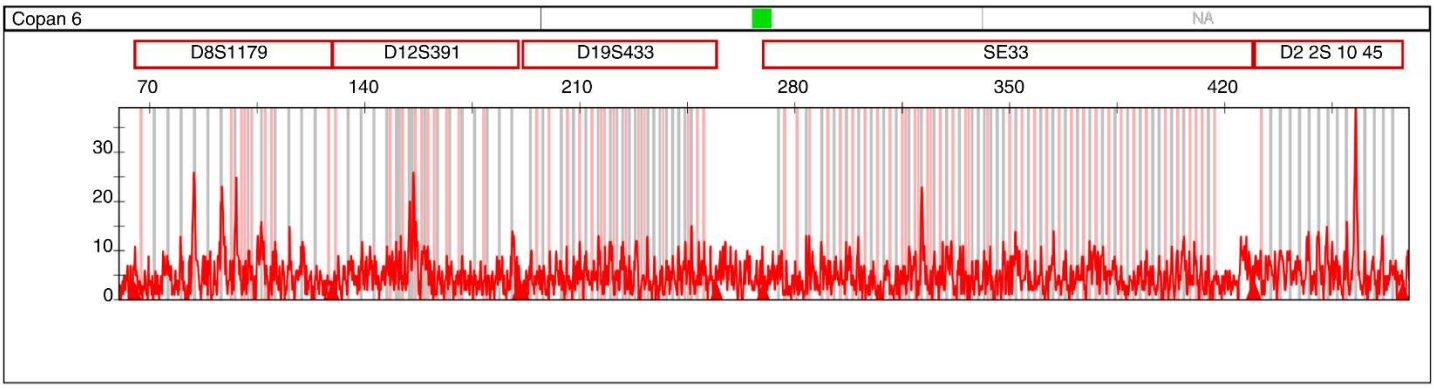


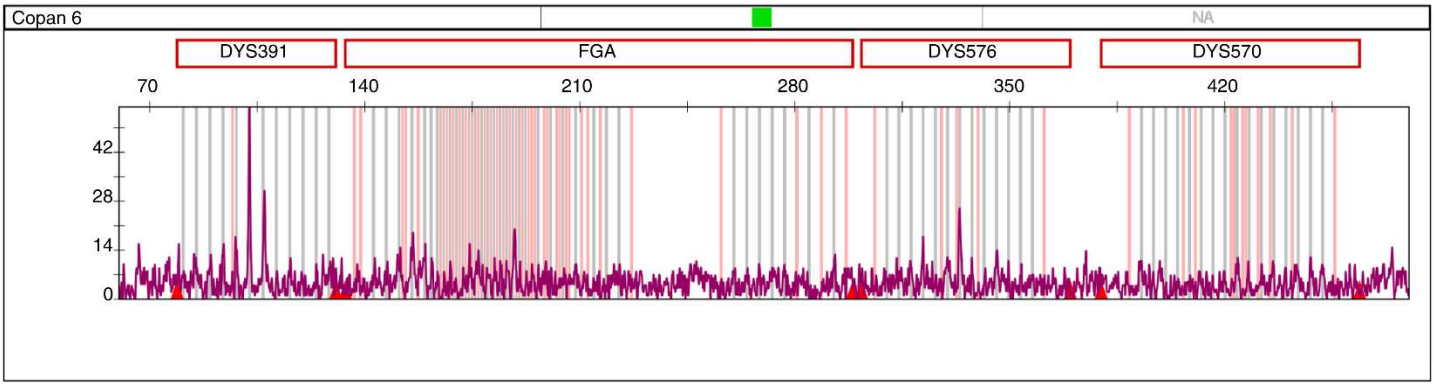


Sample Name	SQ	MIX
Copan 6		NA

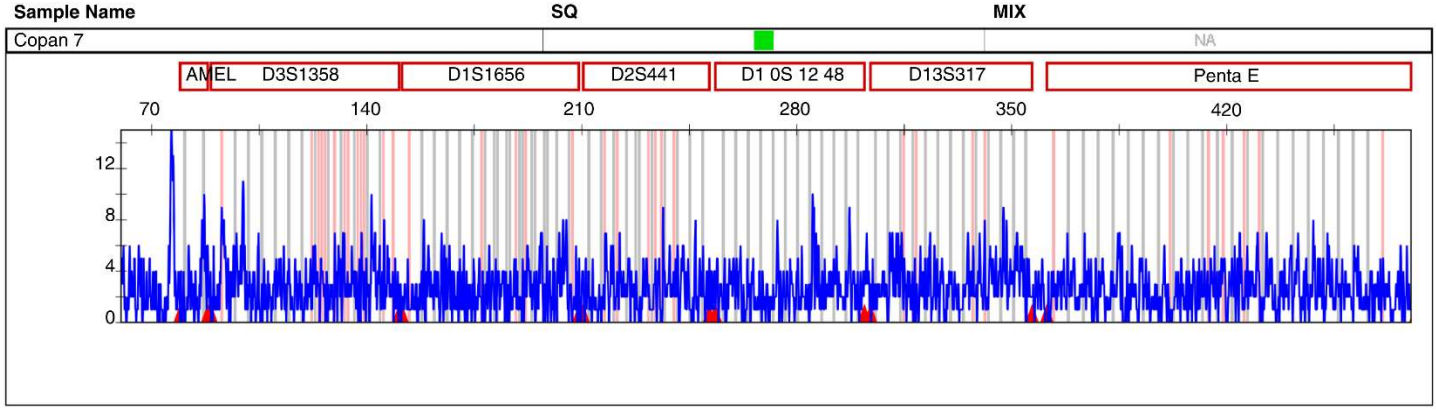


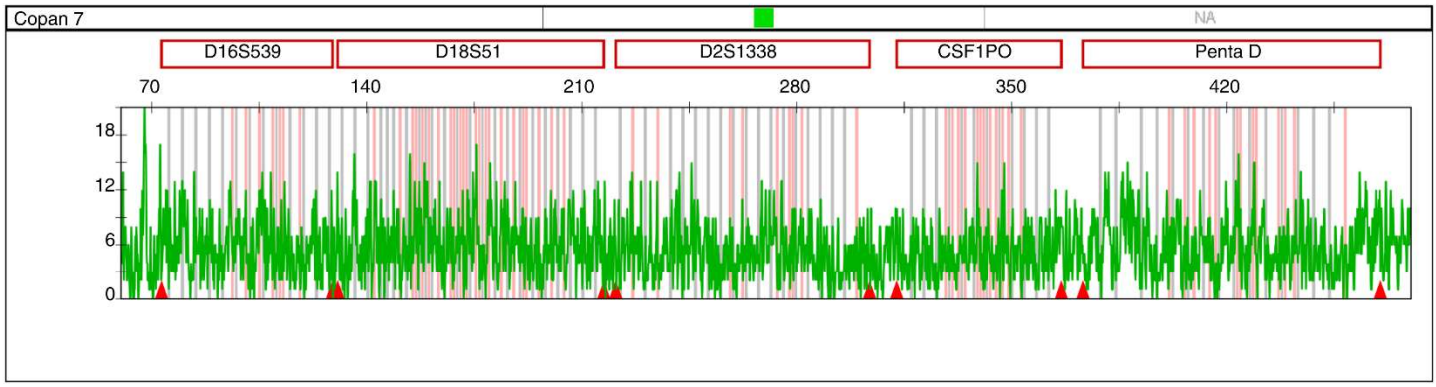


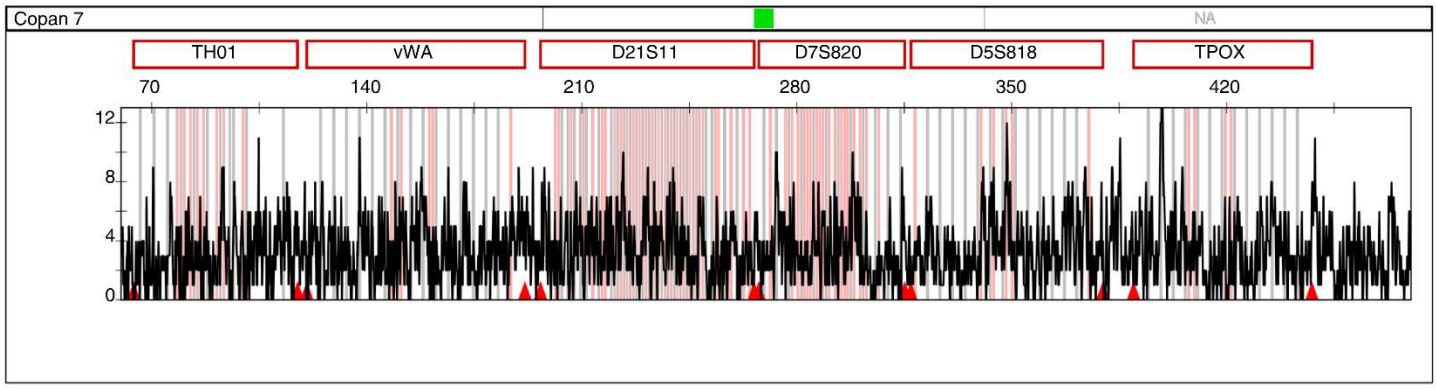


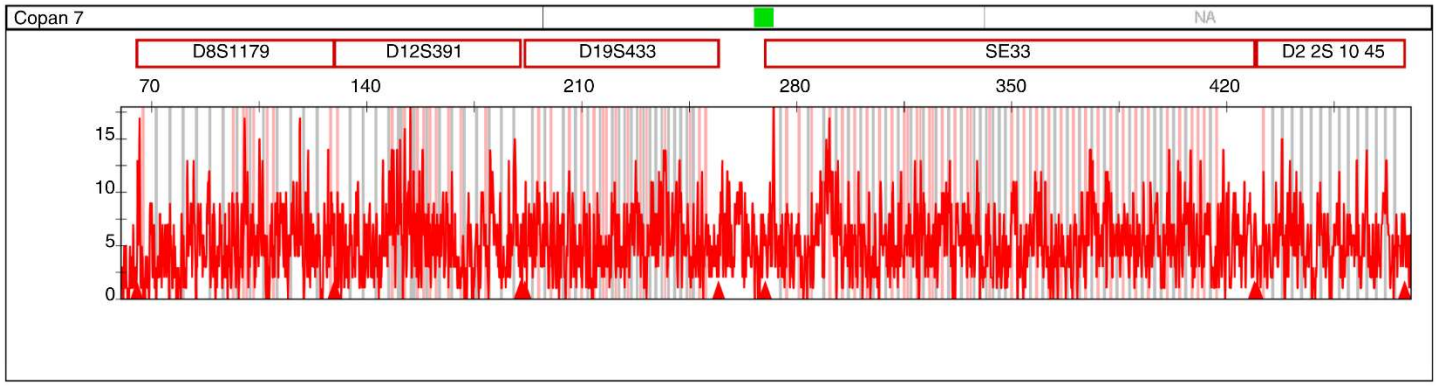


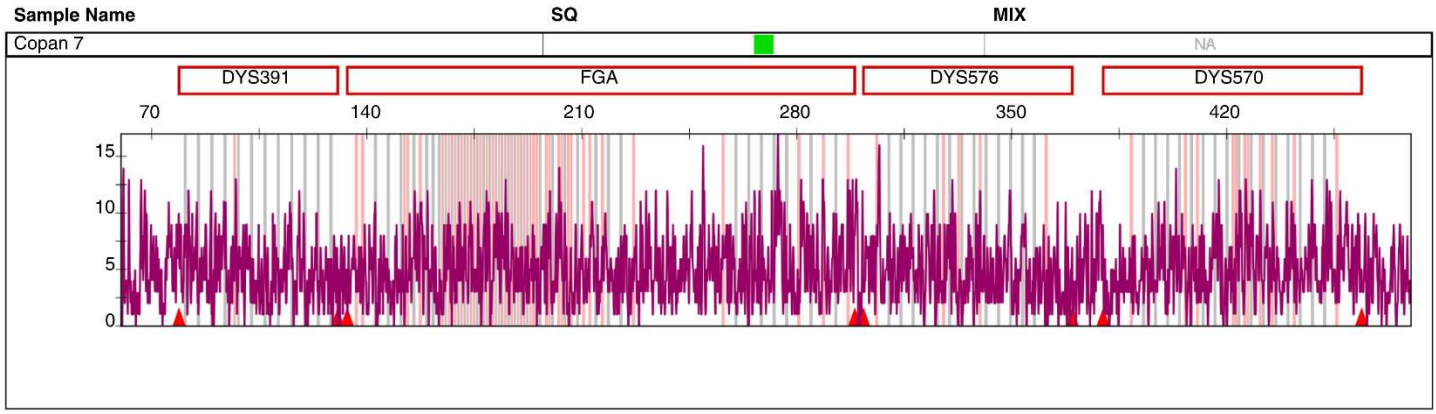
Sample Name **SQ** **MIX**



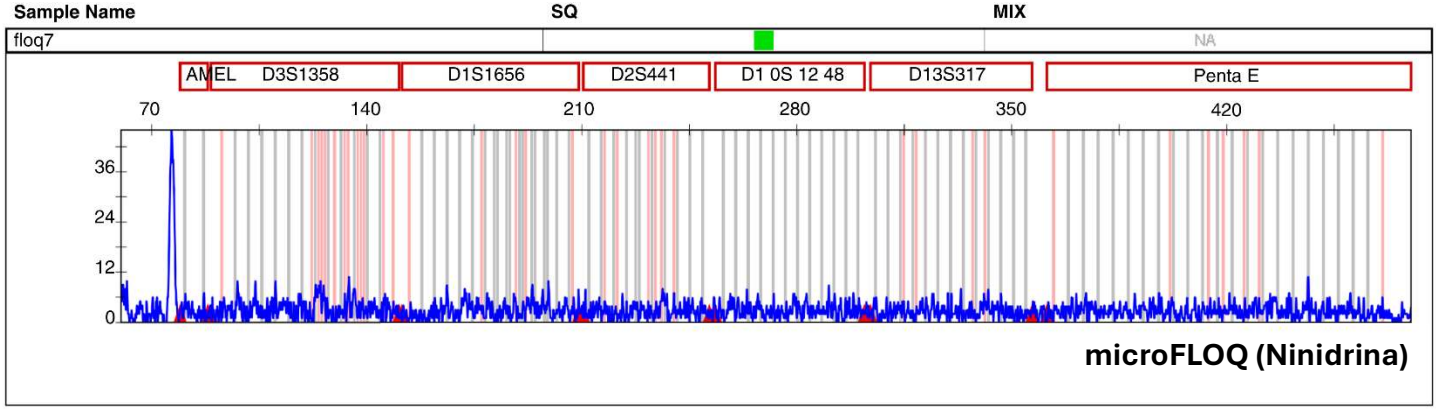


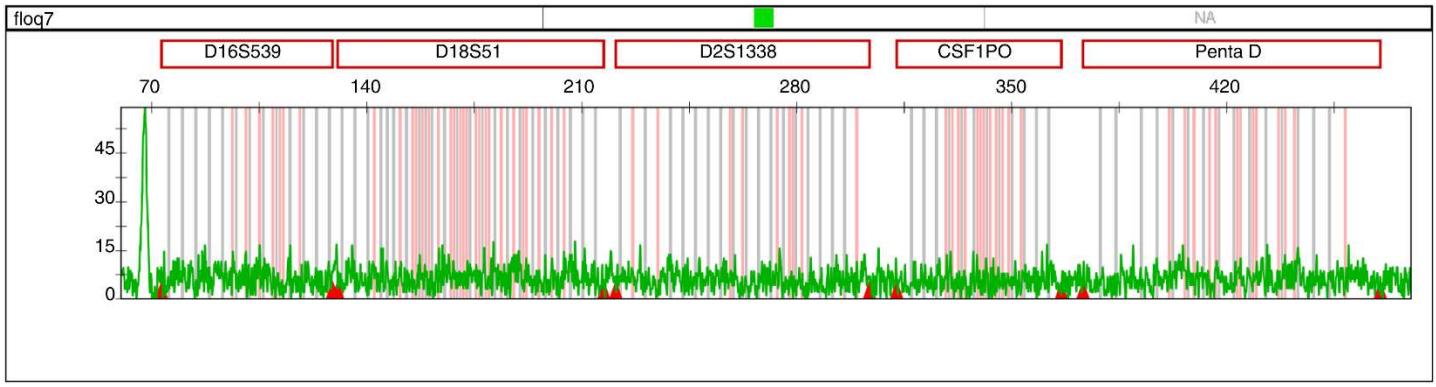


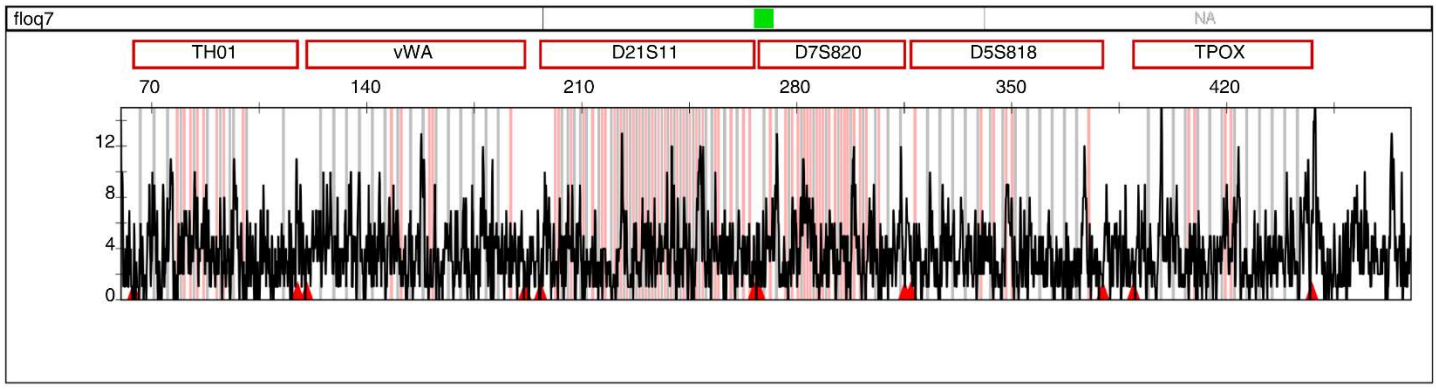


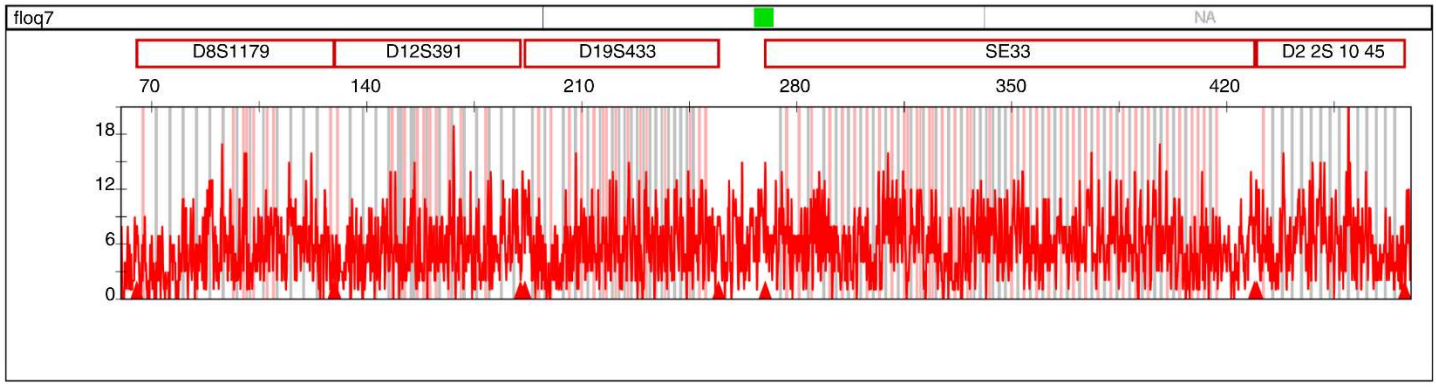

Sample Name
SQ
MIX
Copan 7
NA
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
15
10
5
0

Sample Name **SQ** **MIX**



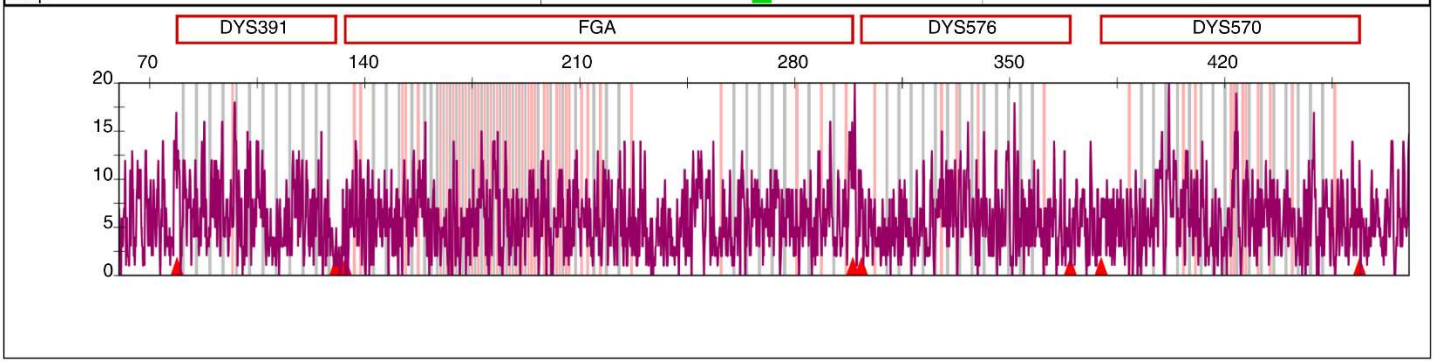




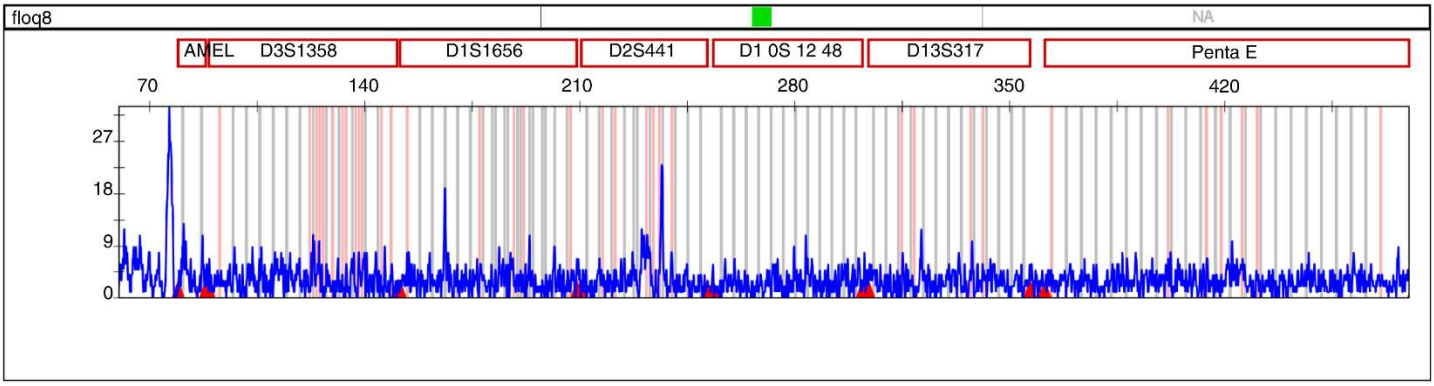


Sample Name **SQ** **MIX**

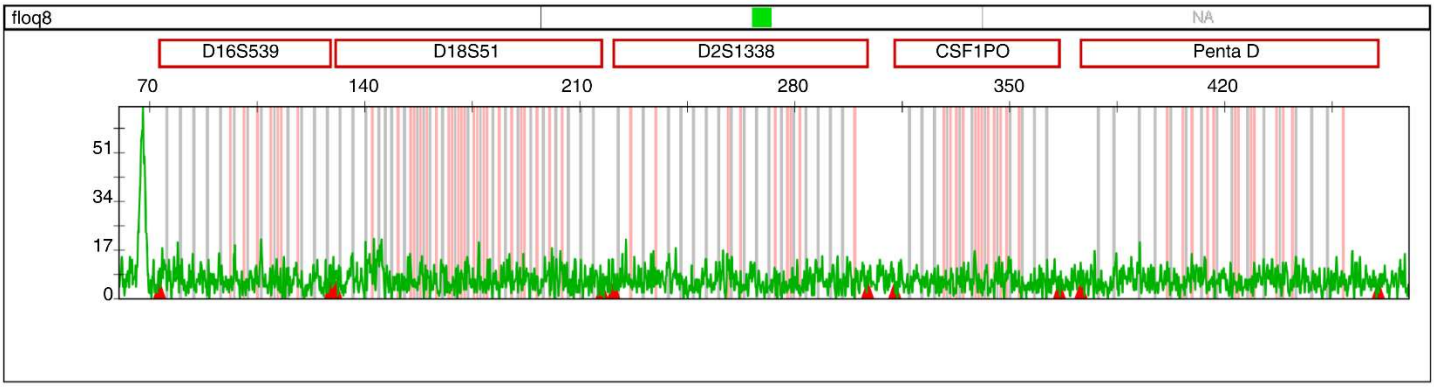
floq7 NA



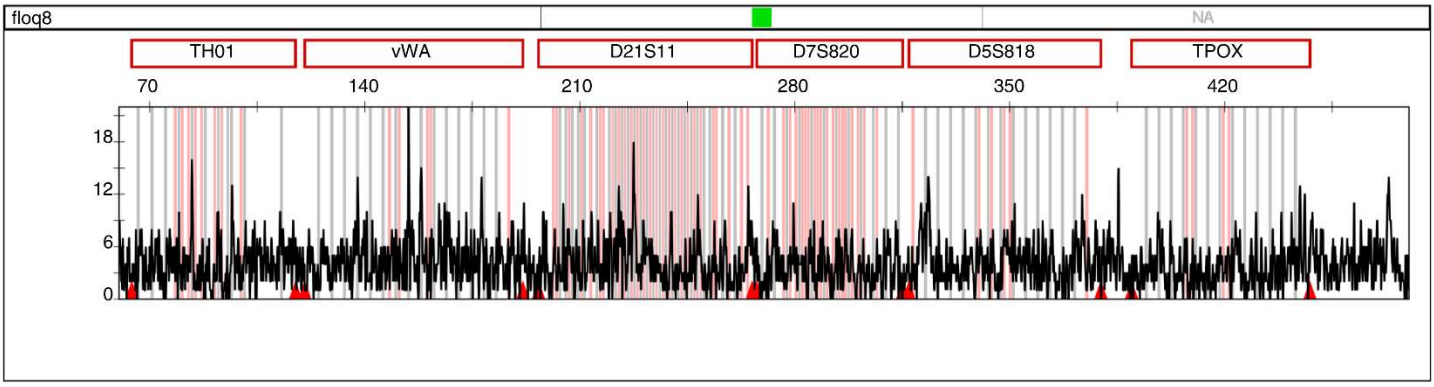
floq8 NA



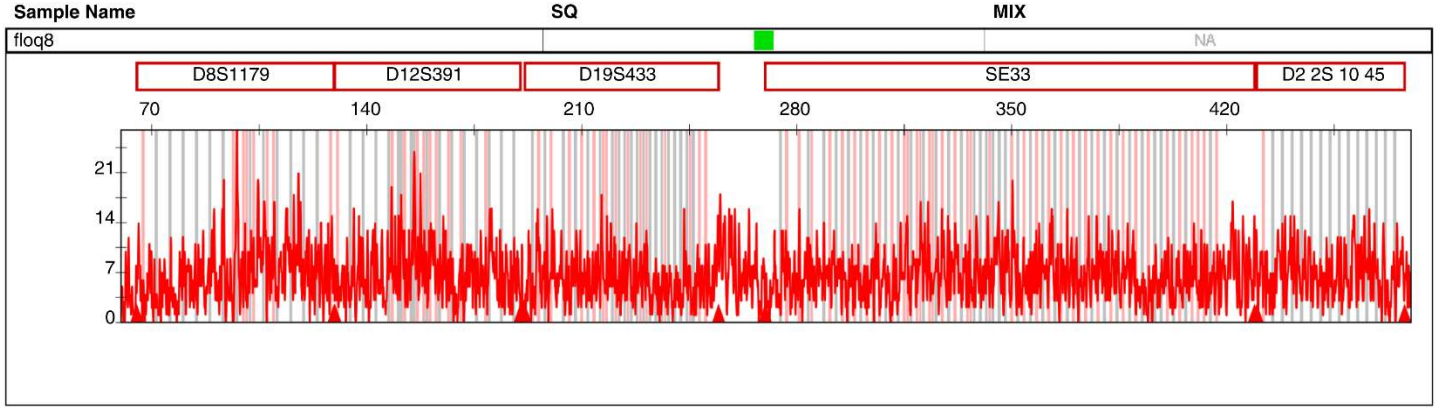
floq8 NA

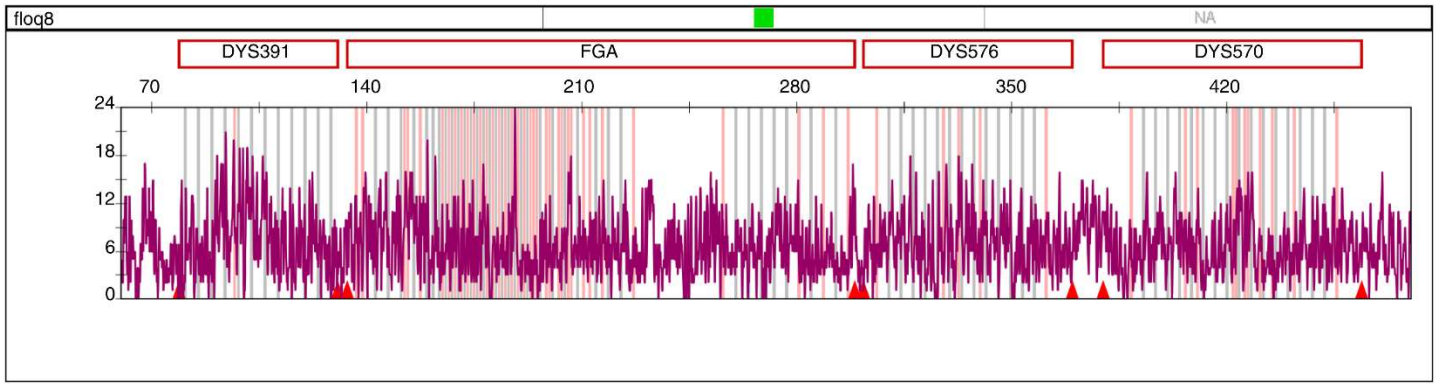


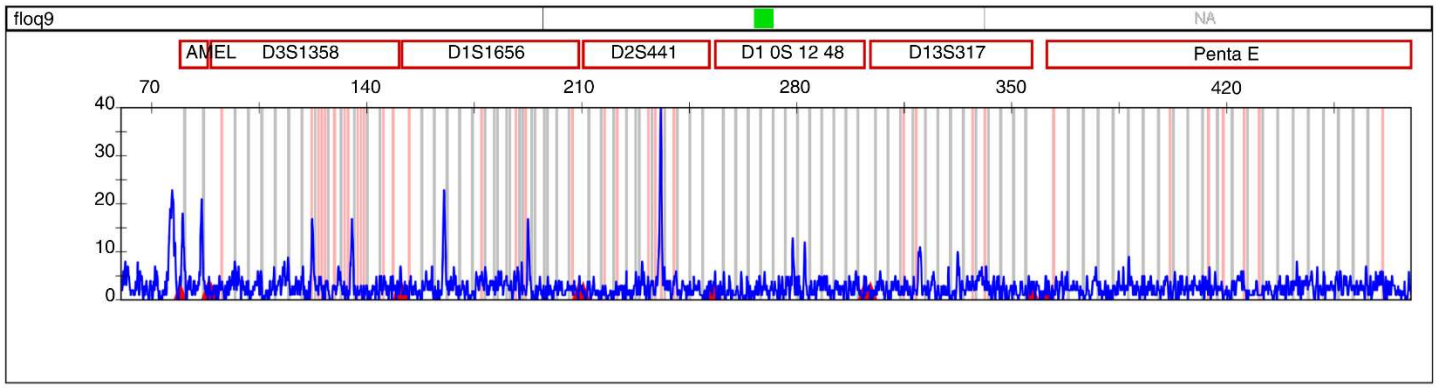
floq8 NA

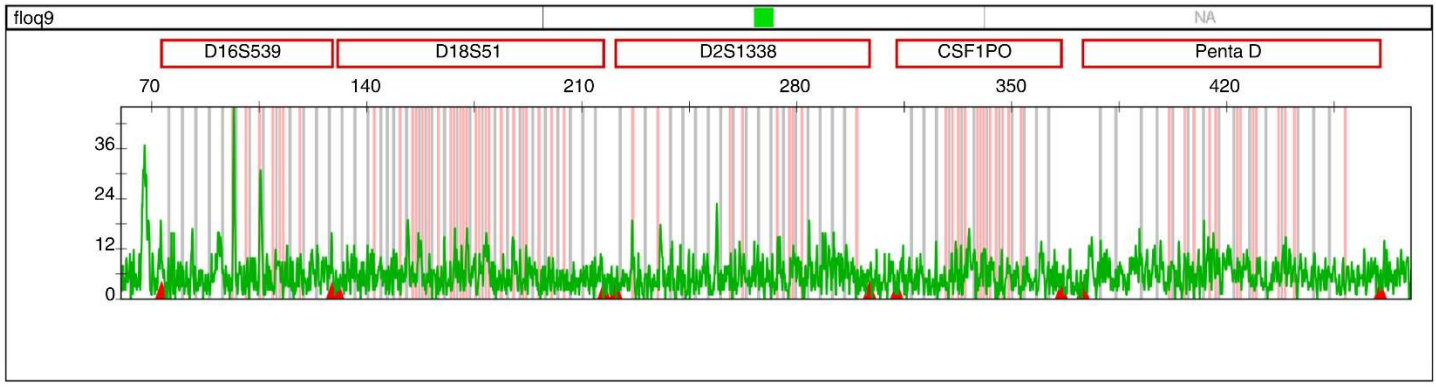


Sample Name **SQ** **MIX**

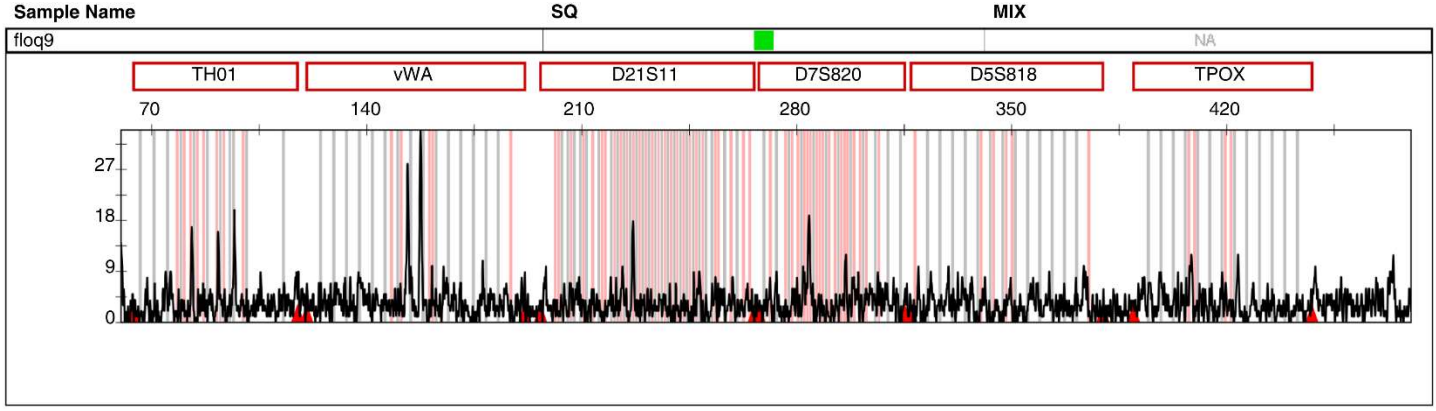


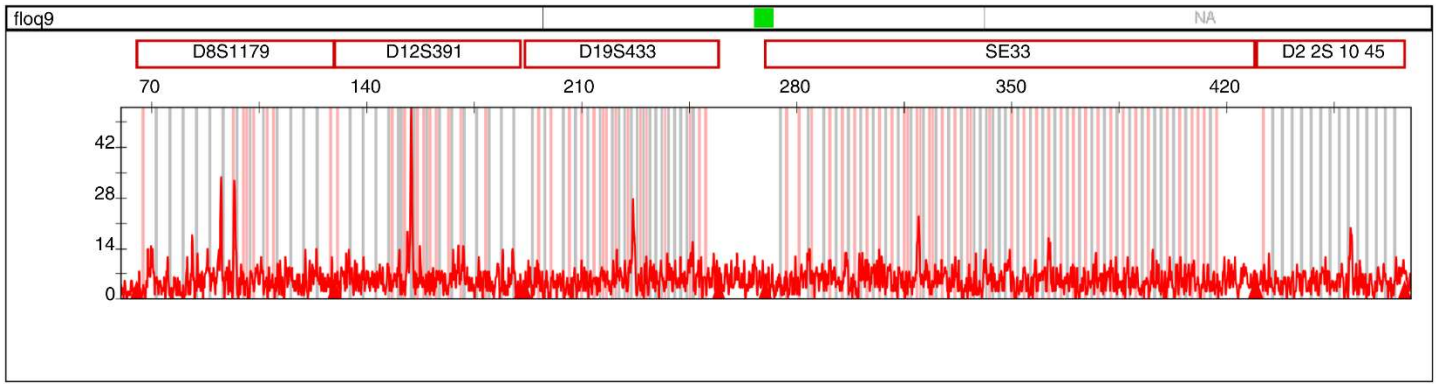


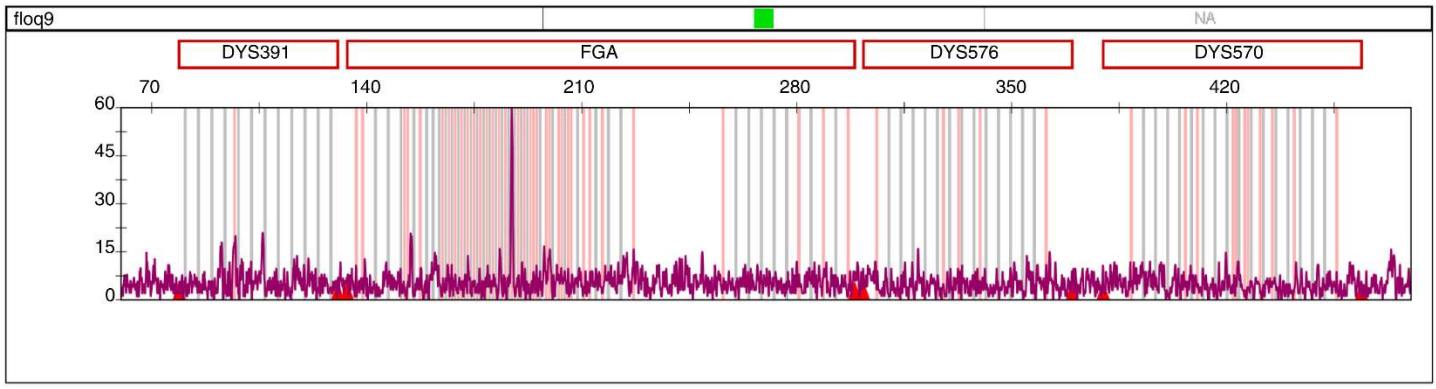


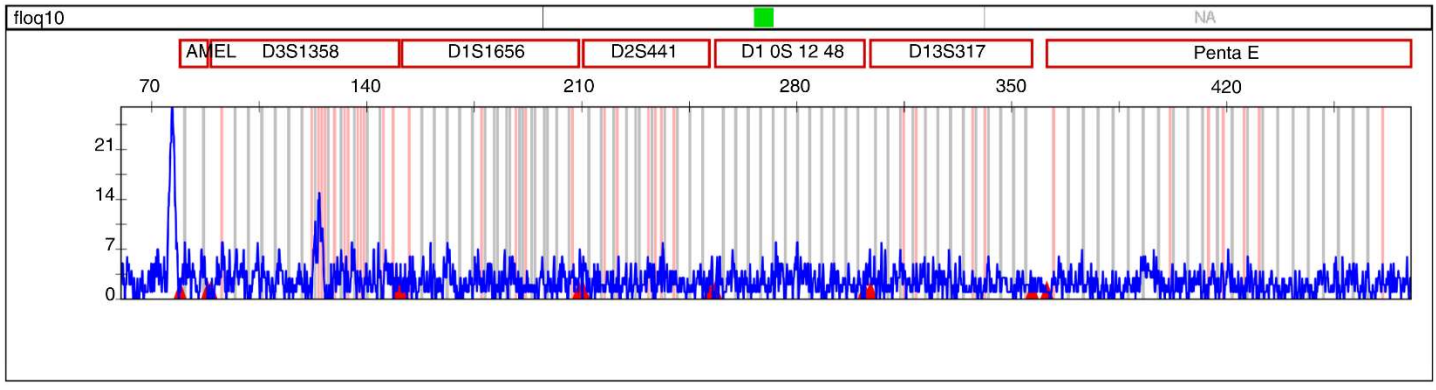


Sample Name **SQ** **MIX**

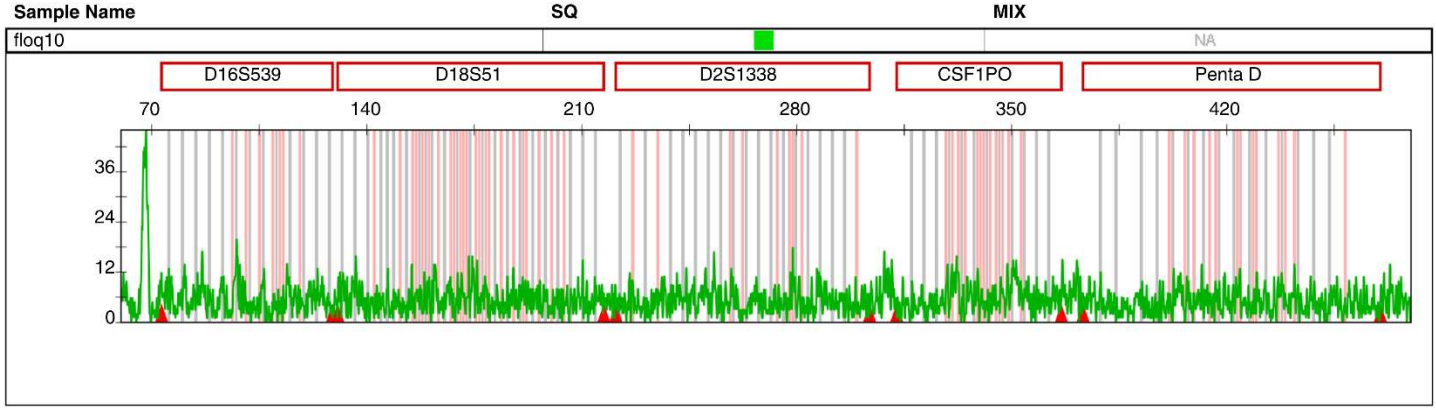


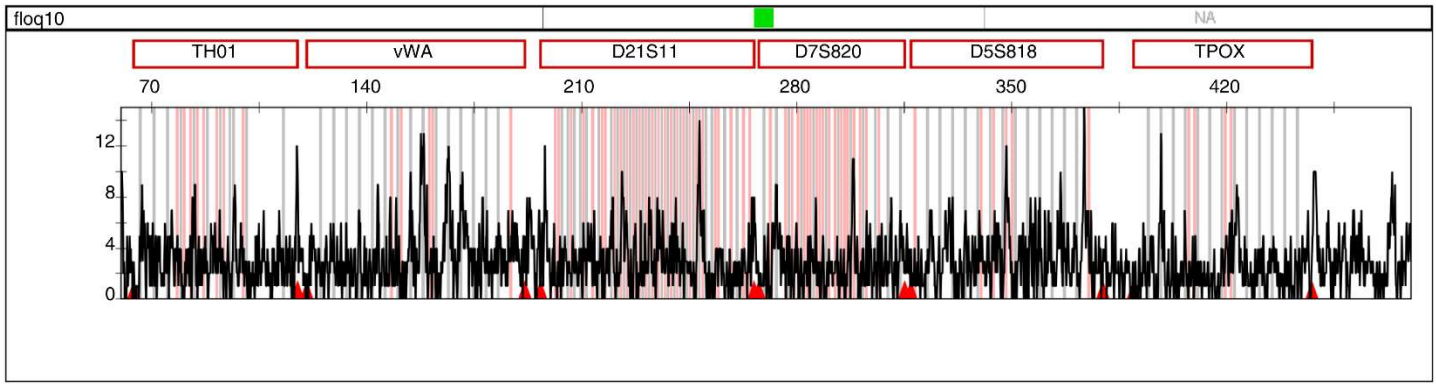


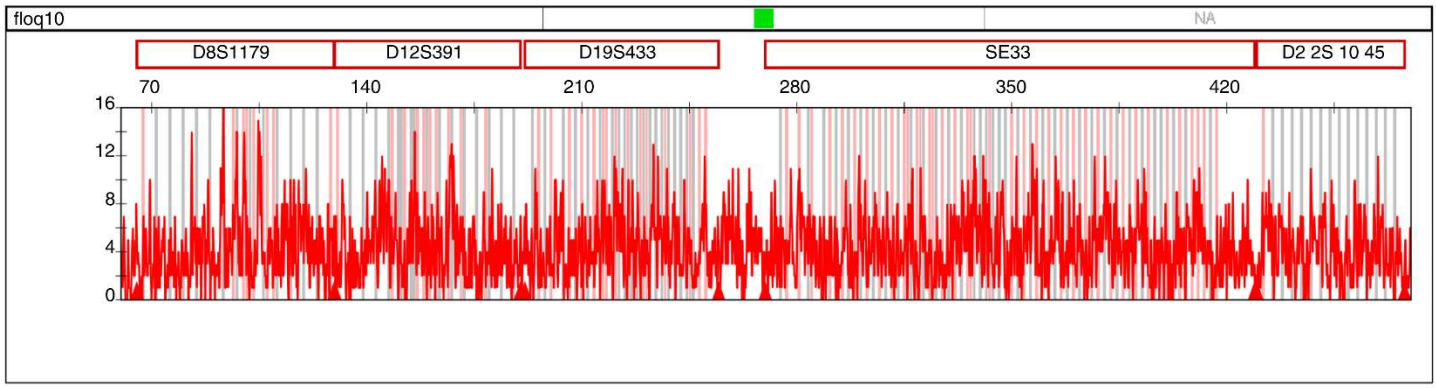


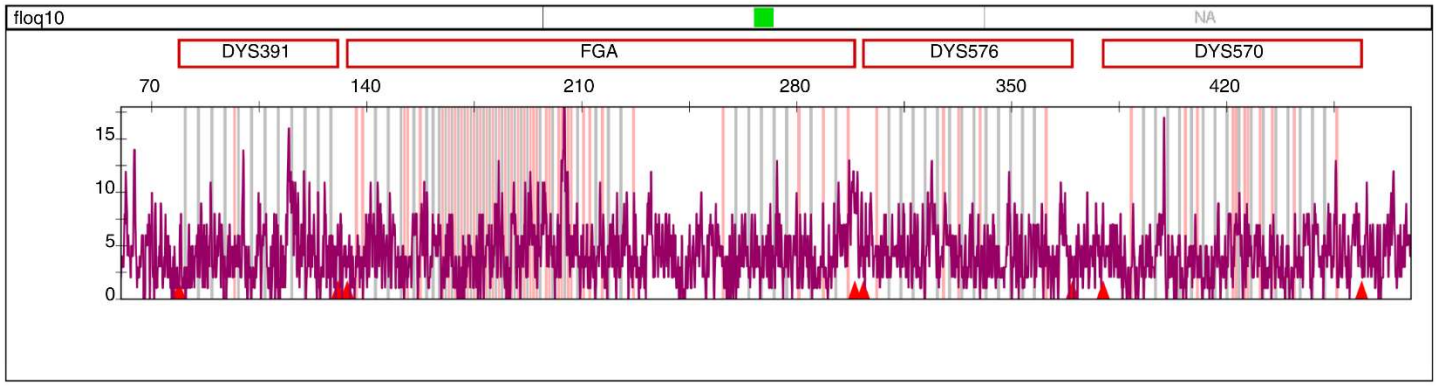


Sample Name **SQ** **MIX**



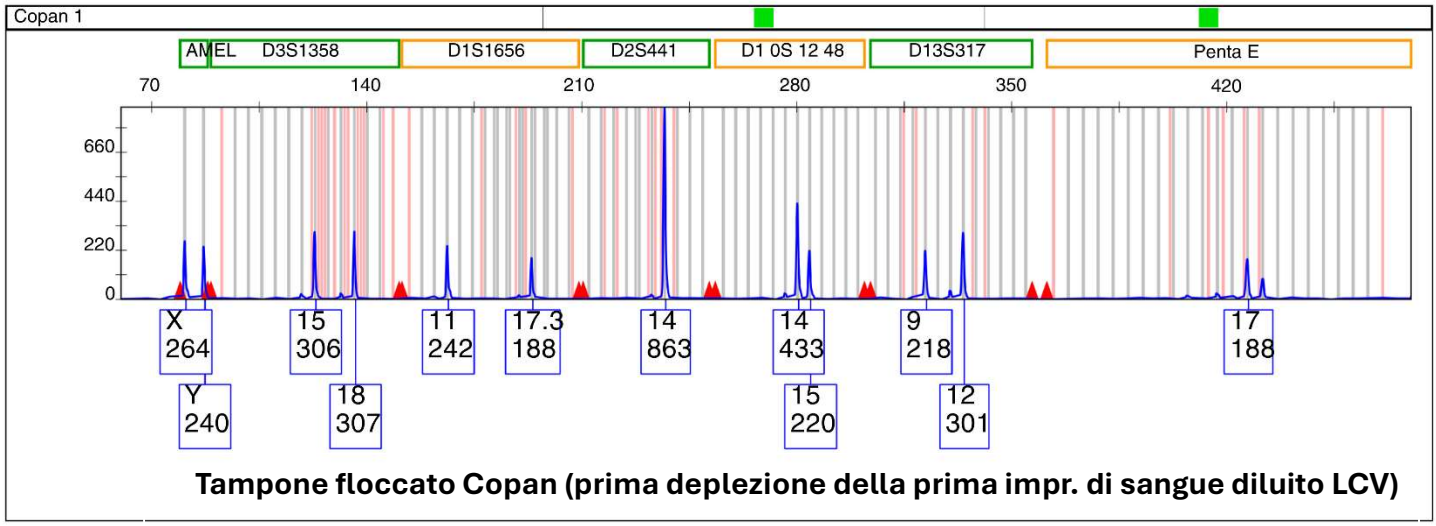




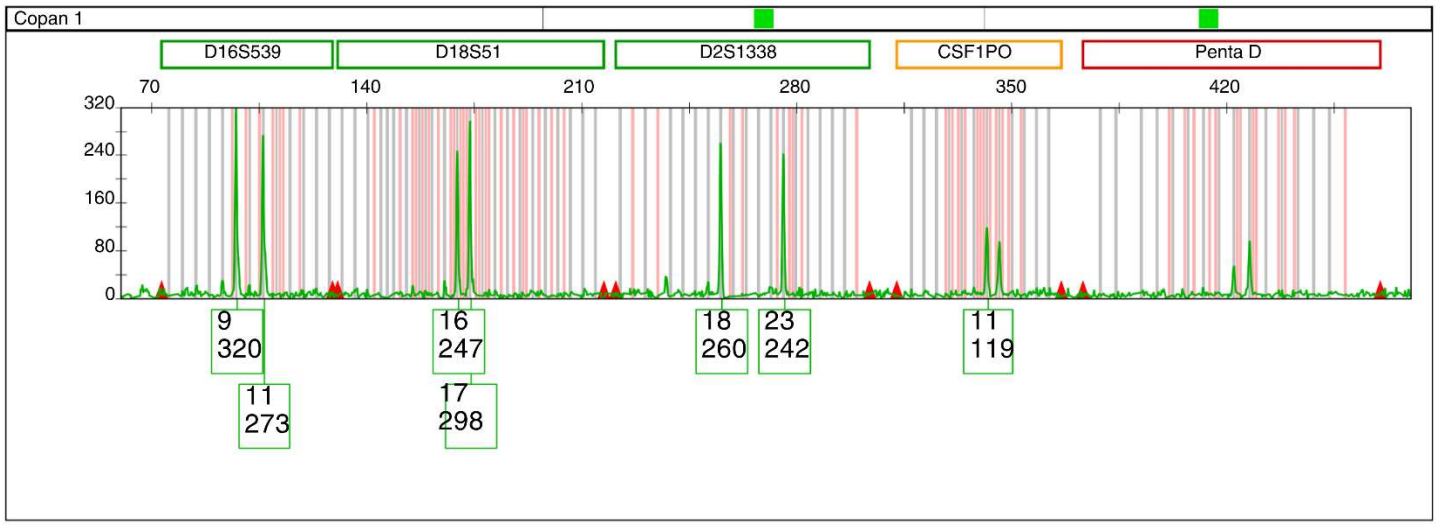


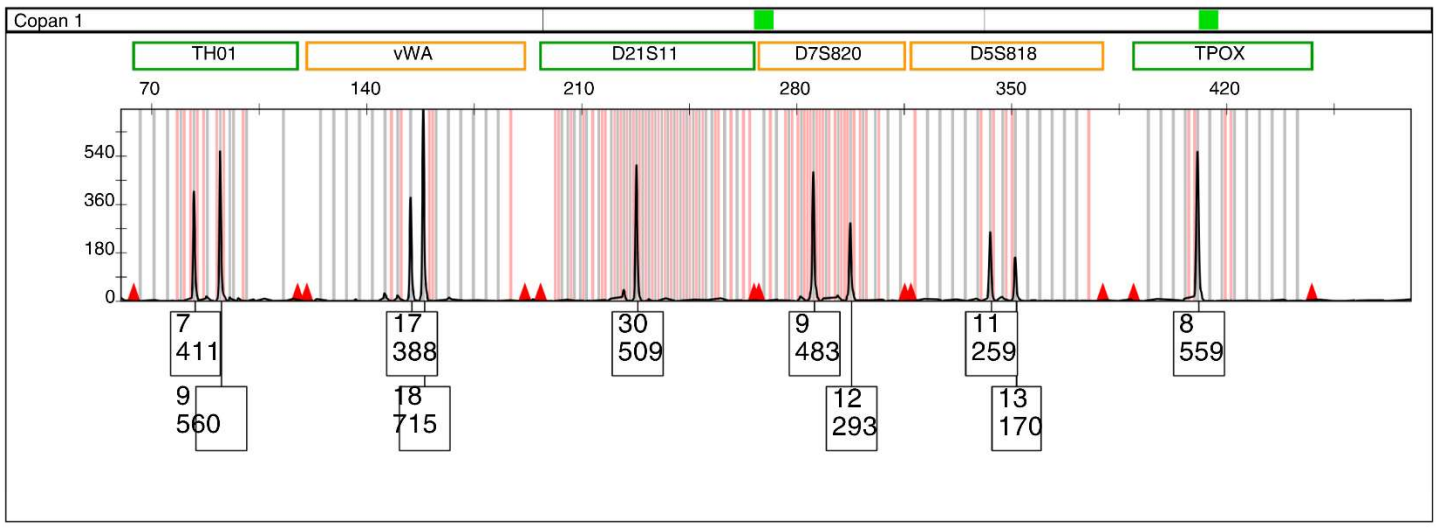
APPENDICE 8

Sample Name **SQ** **MIX**

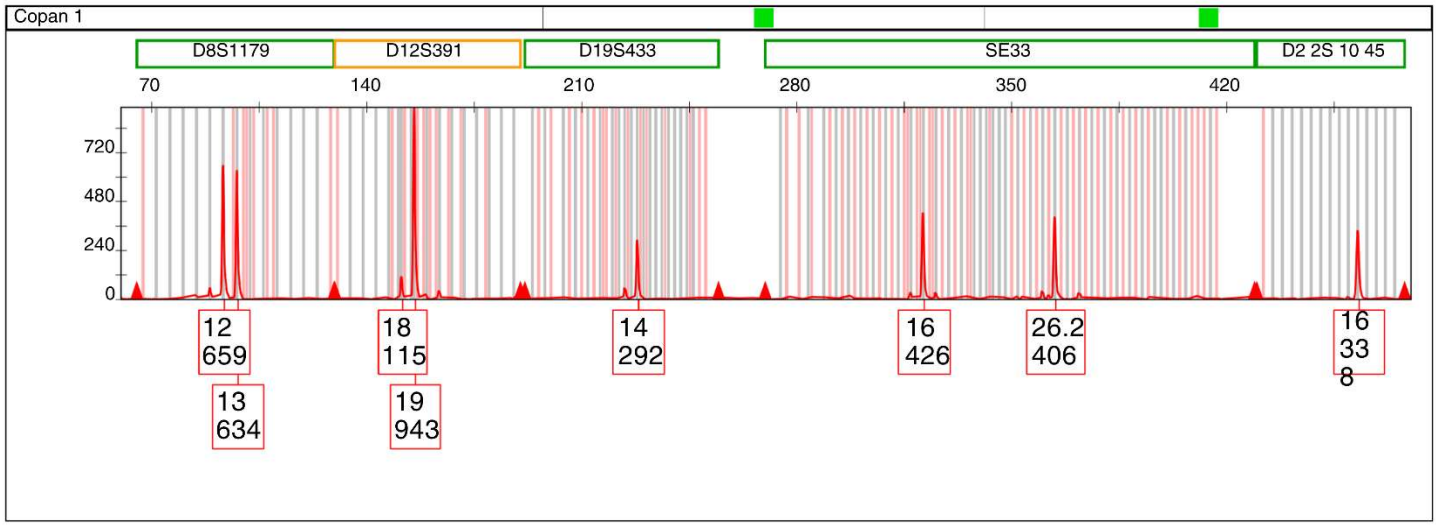


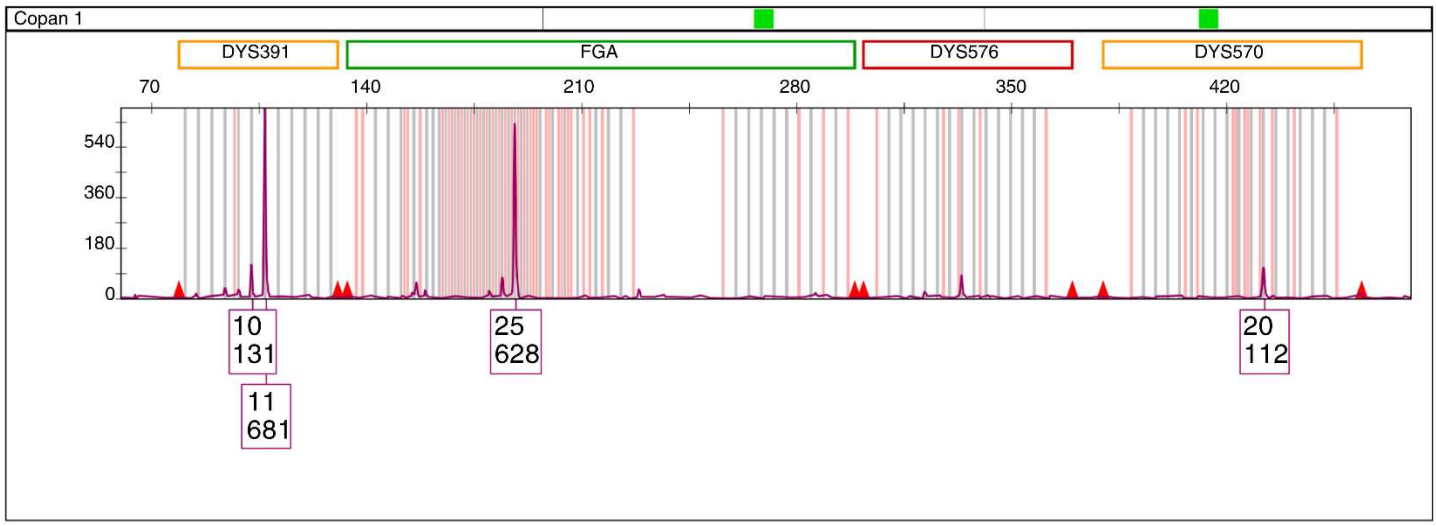
Tampone floccato Copan (prima deplezione della prima impr. di sangue diluito LCV)

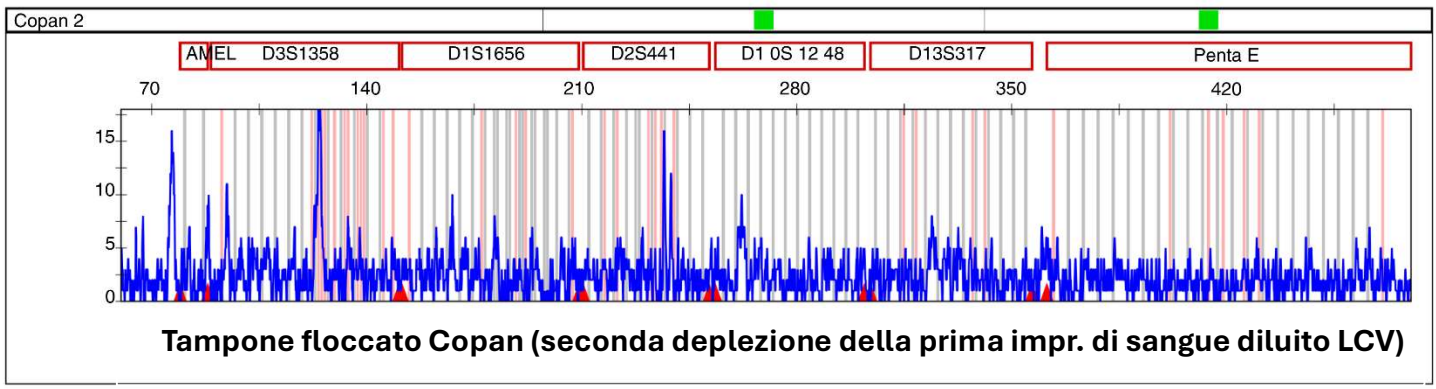




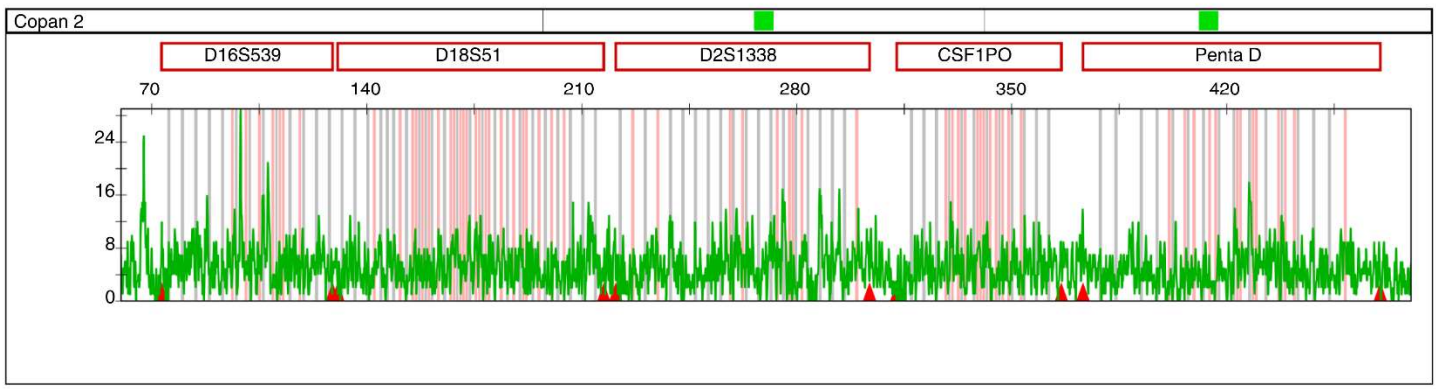
Sample Name **SQ** **MIX**



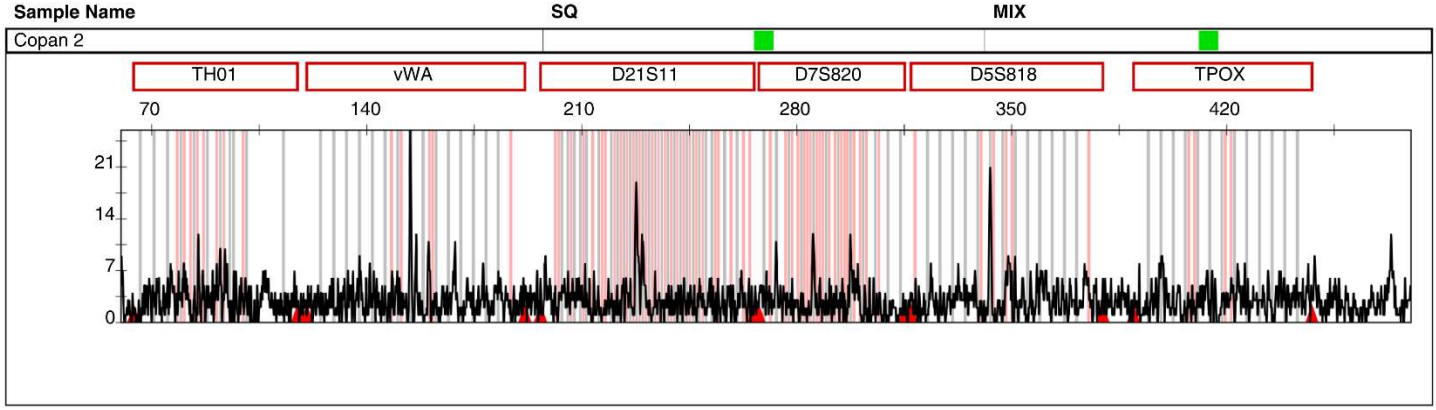


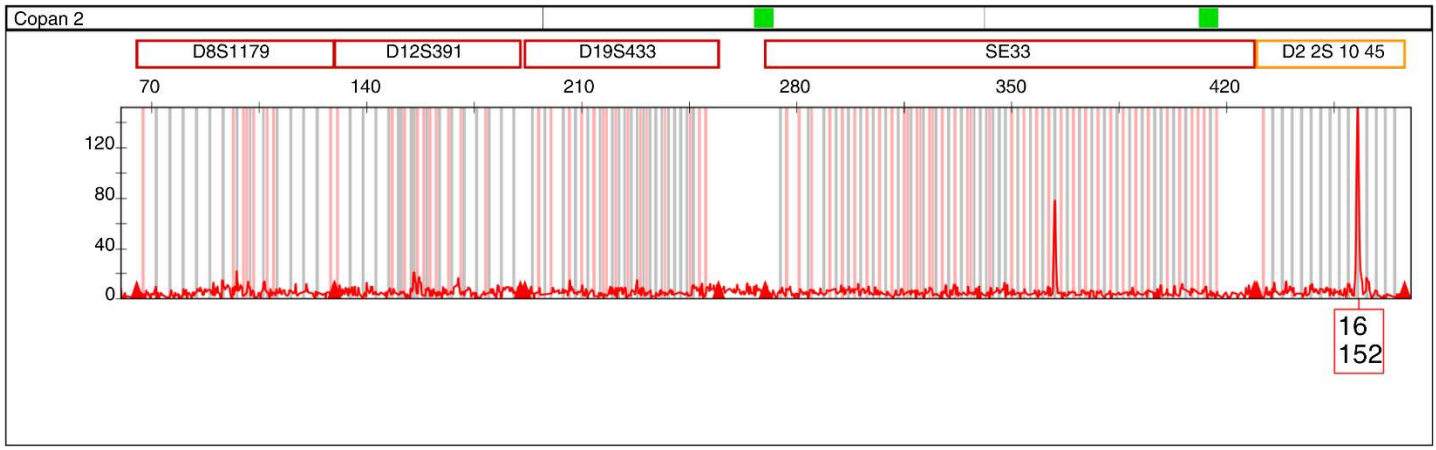


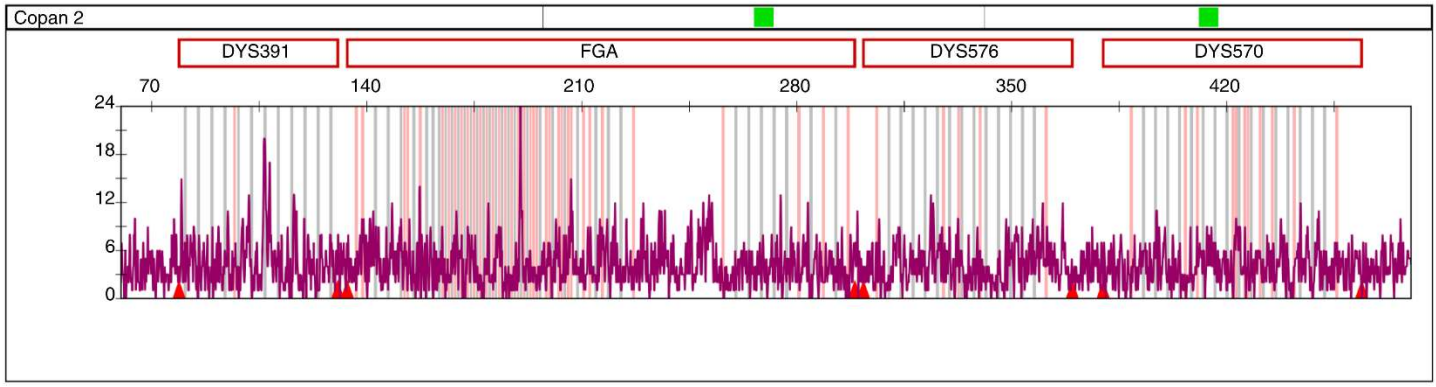
Tampone floccato Copan (seconda deplezione della prima impr. di sangue diluito LCV)

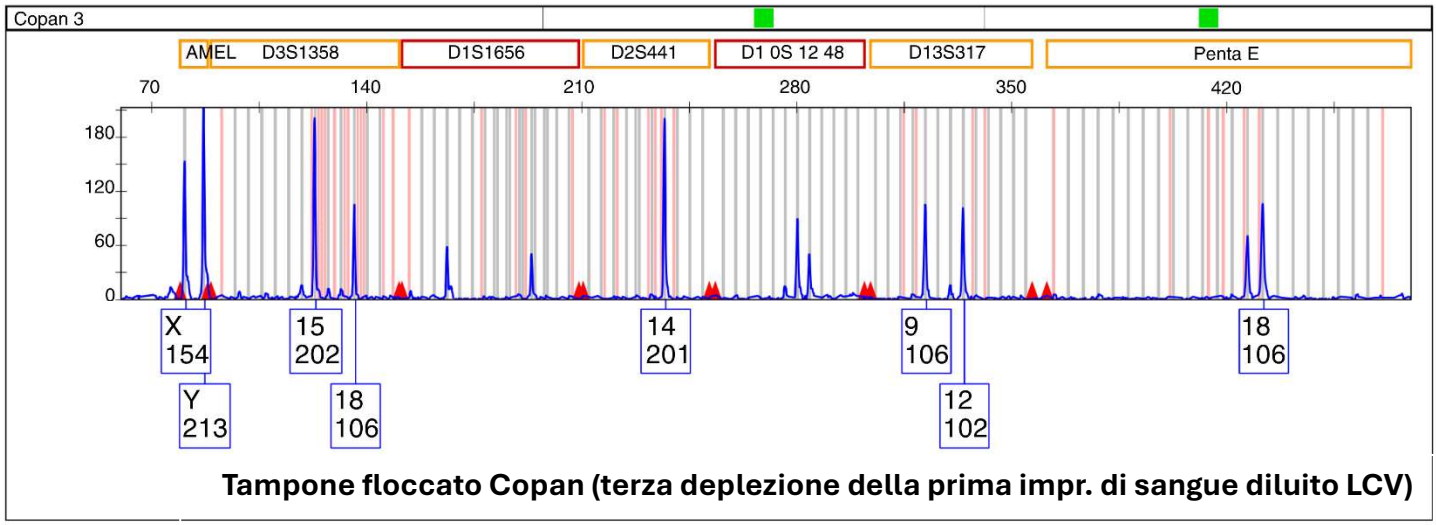


Sample Name **SQ** **MIX**



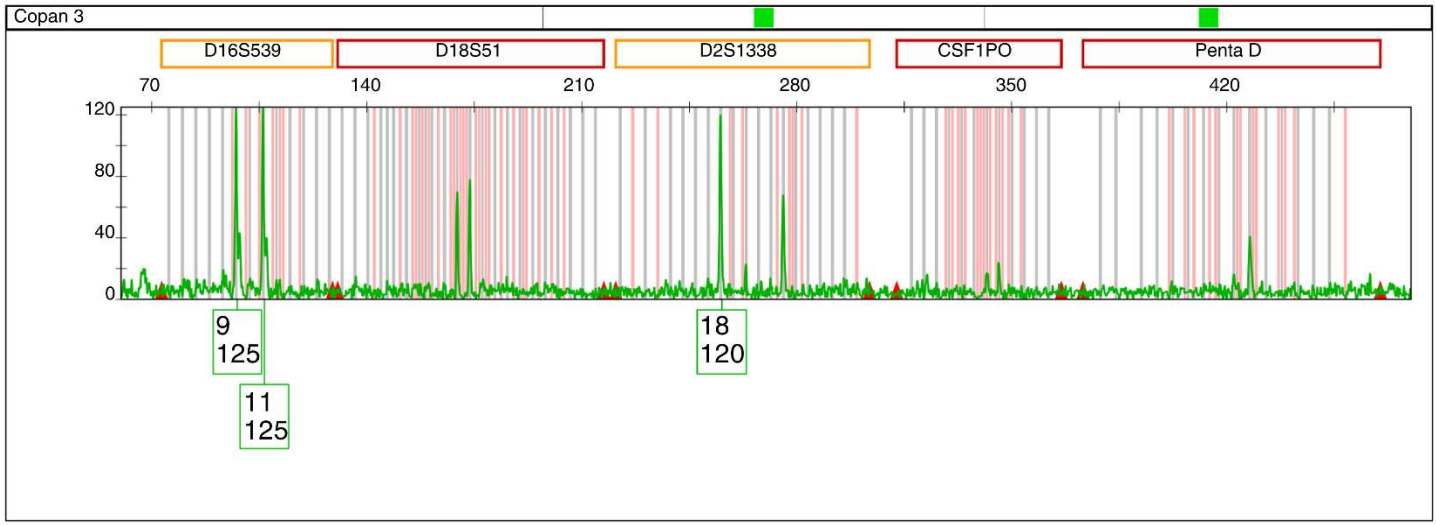


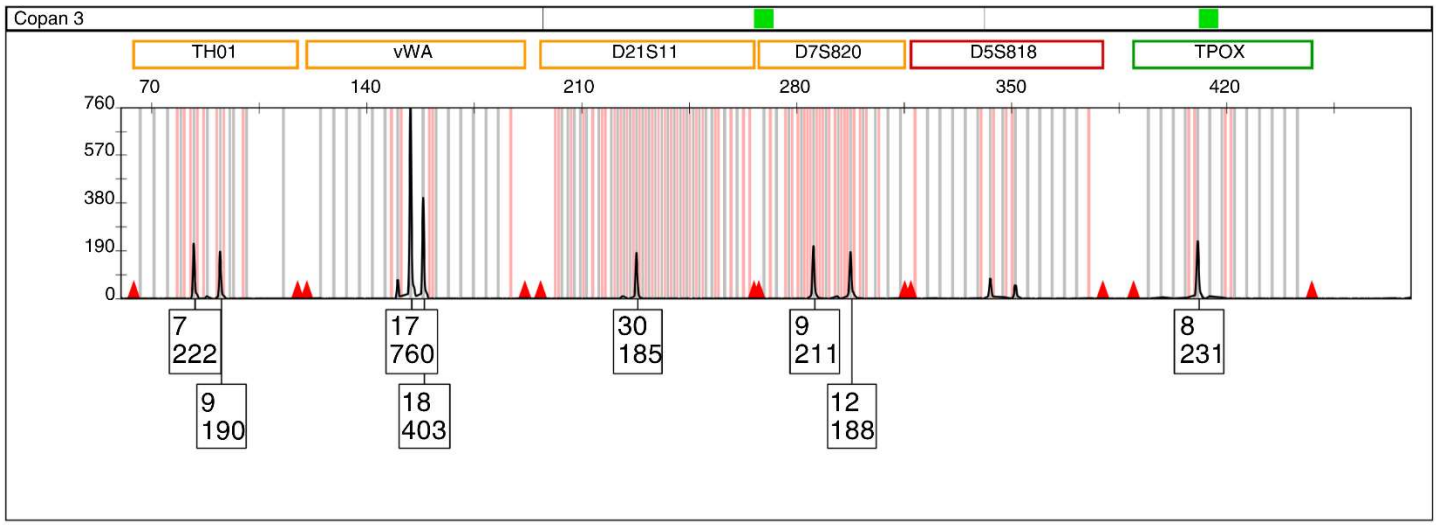


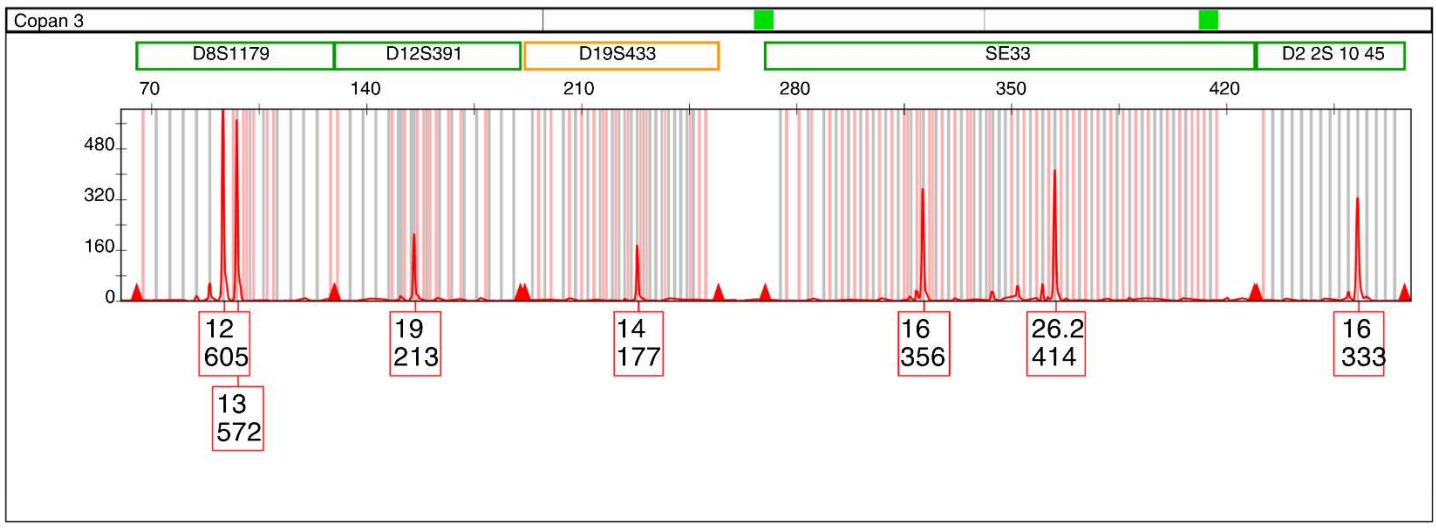


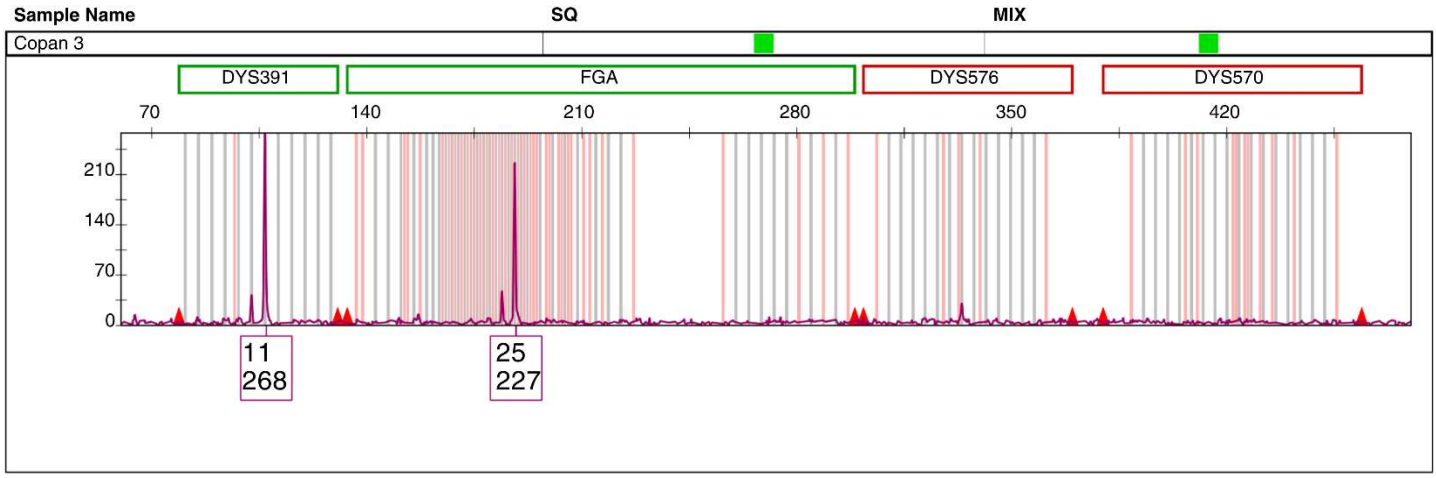
Tampone floccato Copan (terza deplezione della prima impr. di sangue diluito LCV)

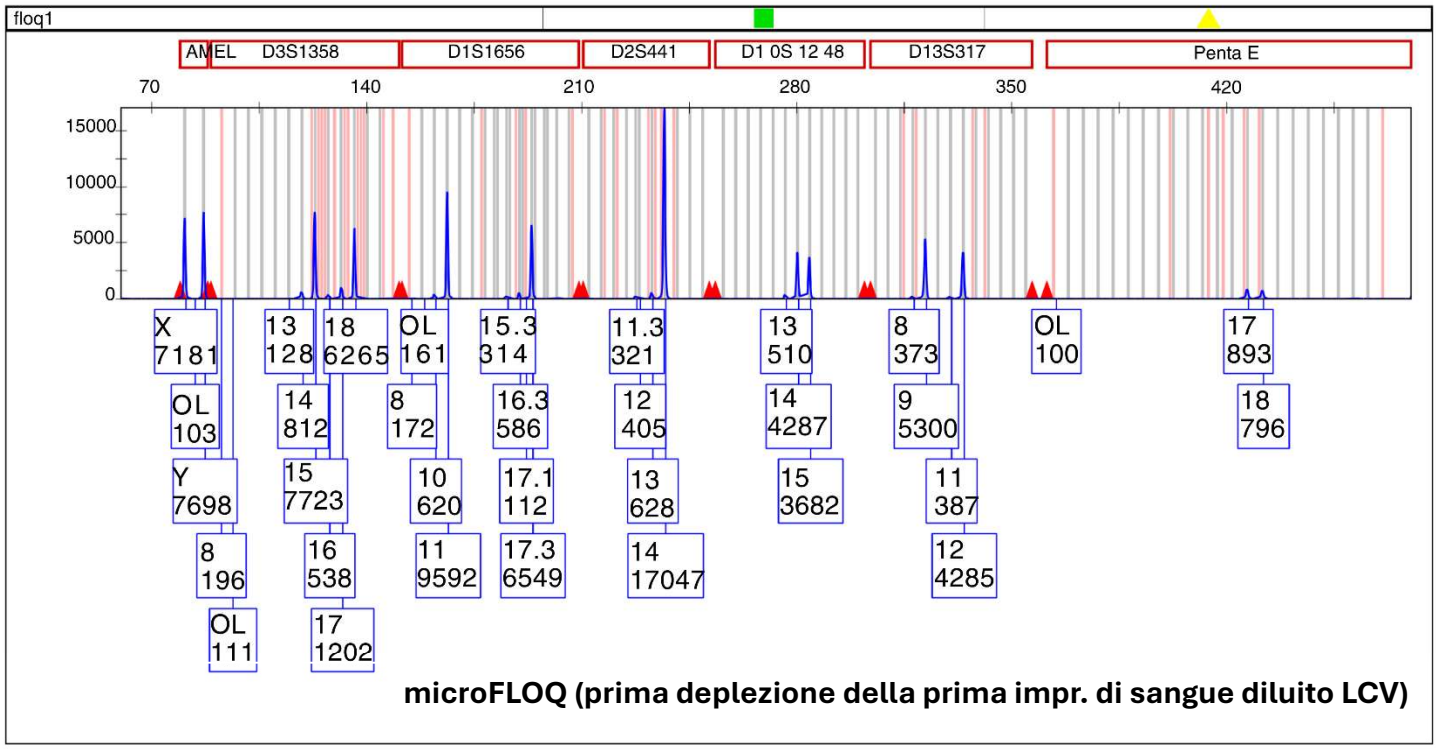
Sample Name **SQ** **MIX**



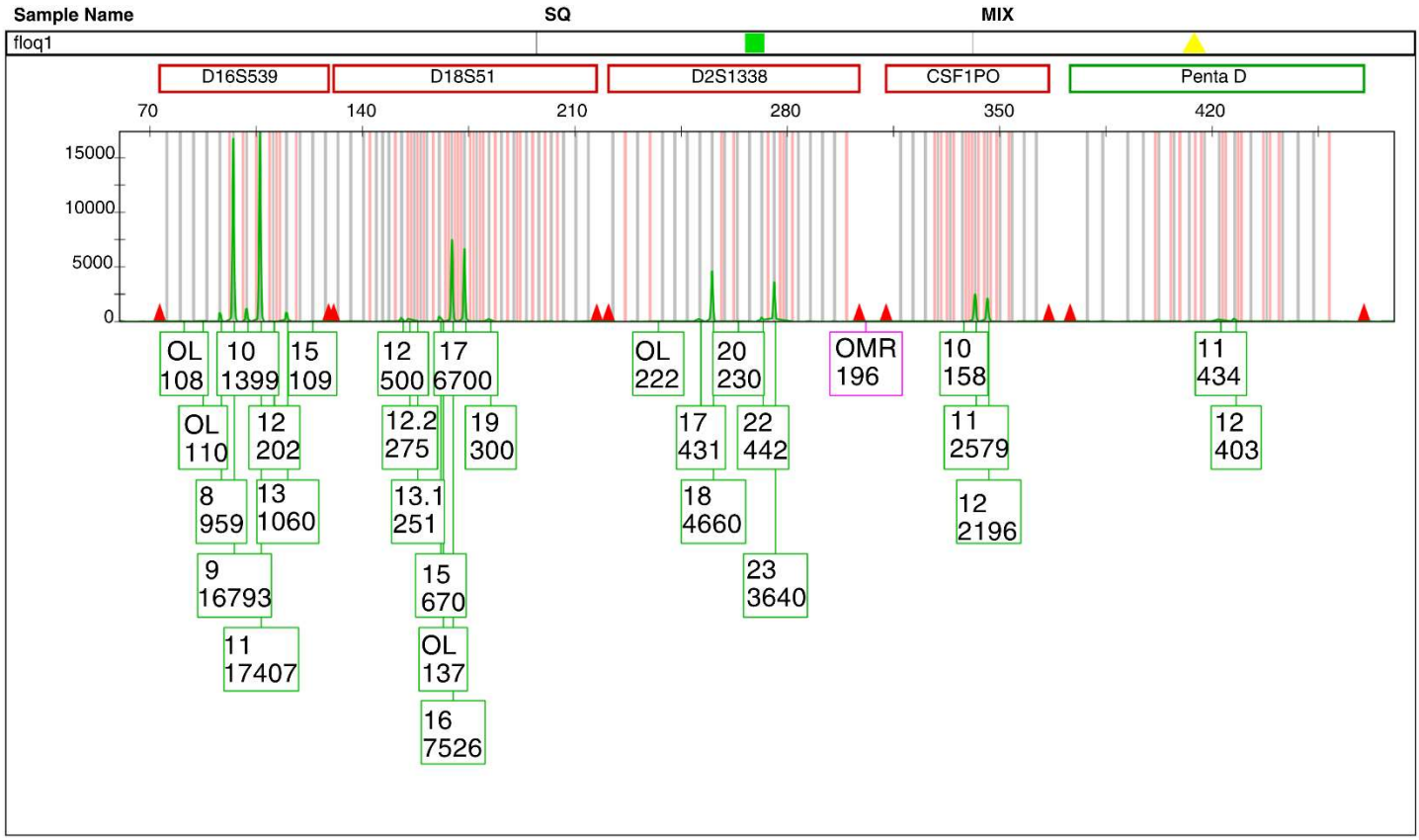


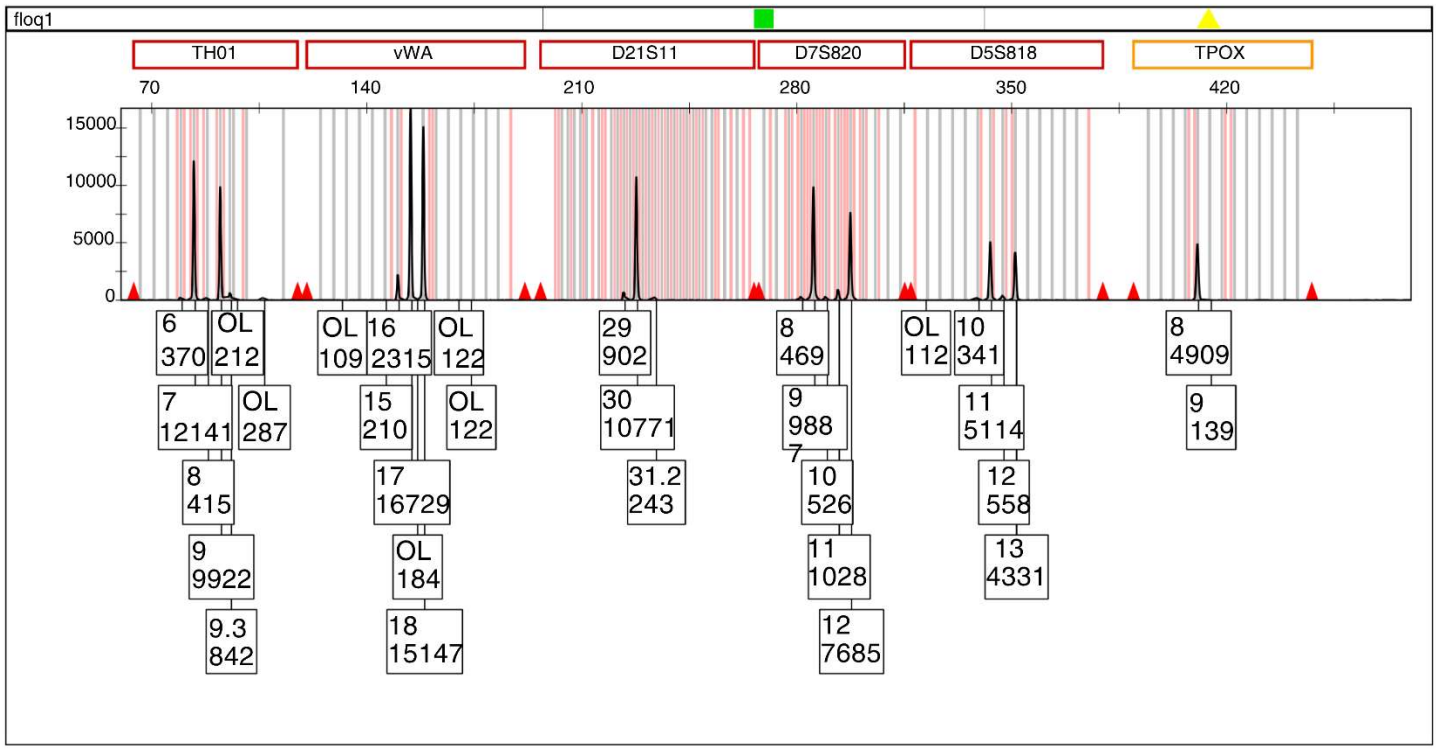






microFLOQ (prima deplezione della prima impr. di sangue diluito LCV)

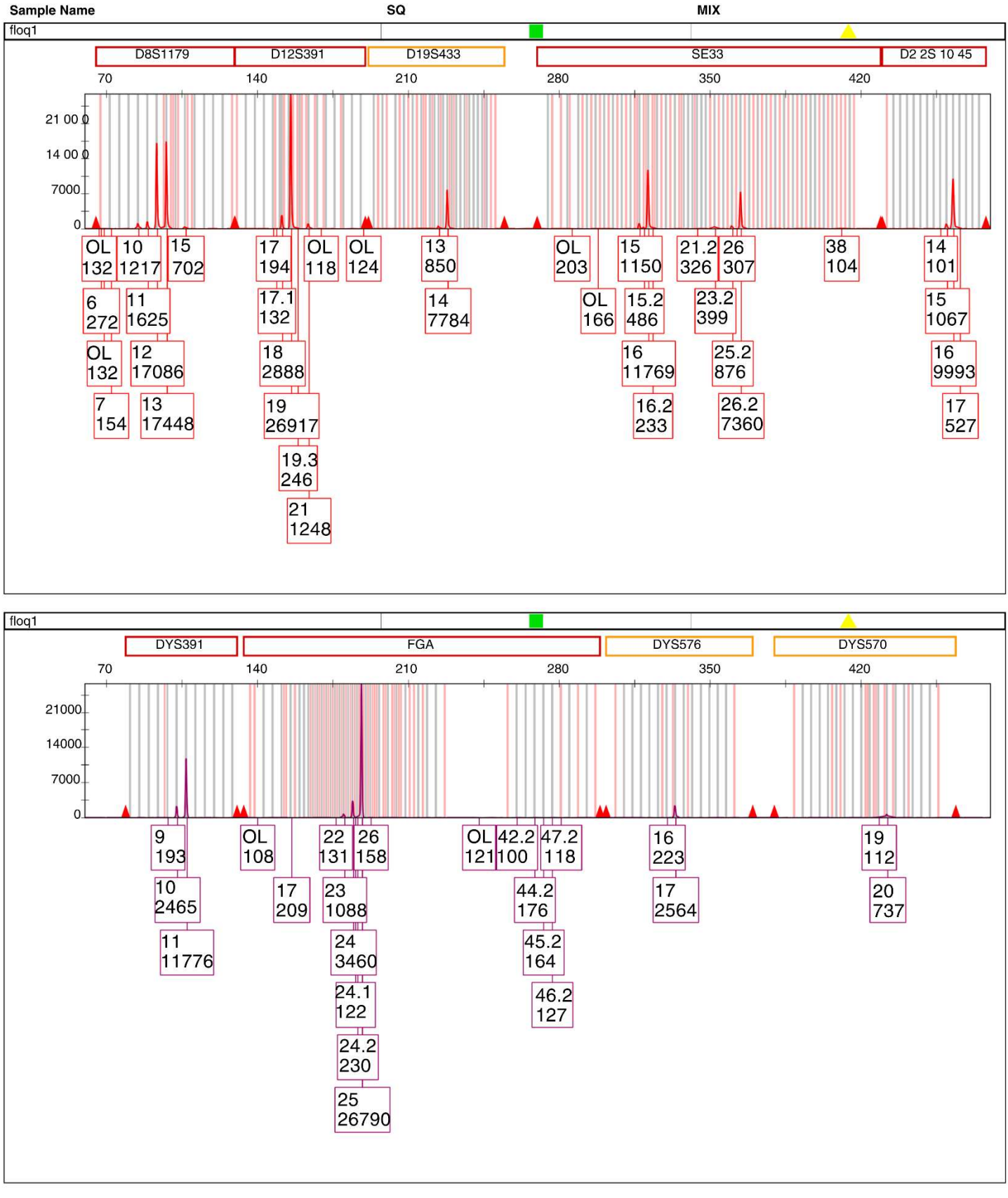

Sample Name
SQ
MIX
floq1
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
15000
10000
5000
0
OL 108
10 1399
15 109
12 500
17 6700
OL 222
20 230
OMR 196
10 158
11 434
OL 110
12 202
12.2 275
19 300
17 431
22 442
11 2579
12 403
8 959
13 1060
13.1 251
18 4660
12 2196
9 16793
15 670
23 3640
11 17407
OL 137
16 7526


floq1
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
15000
10000
5000
0
6 370
OL 212
OL 109
16 2315
OL 122
29 902
8 469
OL 112
10 341
8 4909
7 12141
OL 287
15 210
OL 122
30 10771
9 988 7
11 5114
9 139
8 415
17 16729
31.2 243
10 526
12 558
9 9922
OL 184
11 1028
13 4331
9.3 842
18 15147
12 7685

applied biosystems
by Thermo Fisher Scientific

Project: simone20072026

GeneMapper™ ID-X 1.6



Sample Name	SQ	MIX
floq2		NA

No Sizing Data: 2012-05-floq2-B02.hid

floq2		NA

No Sizing Data: 2012-05-floq2-B02.hid

floq2		NA

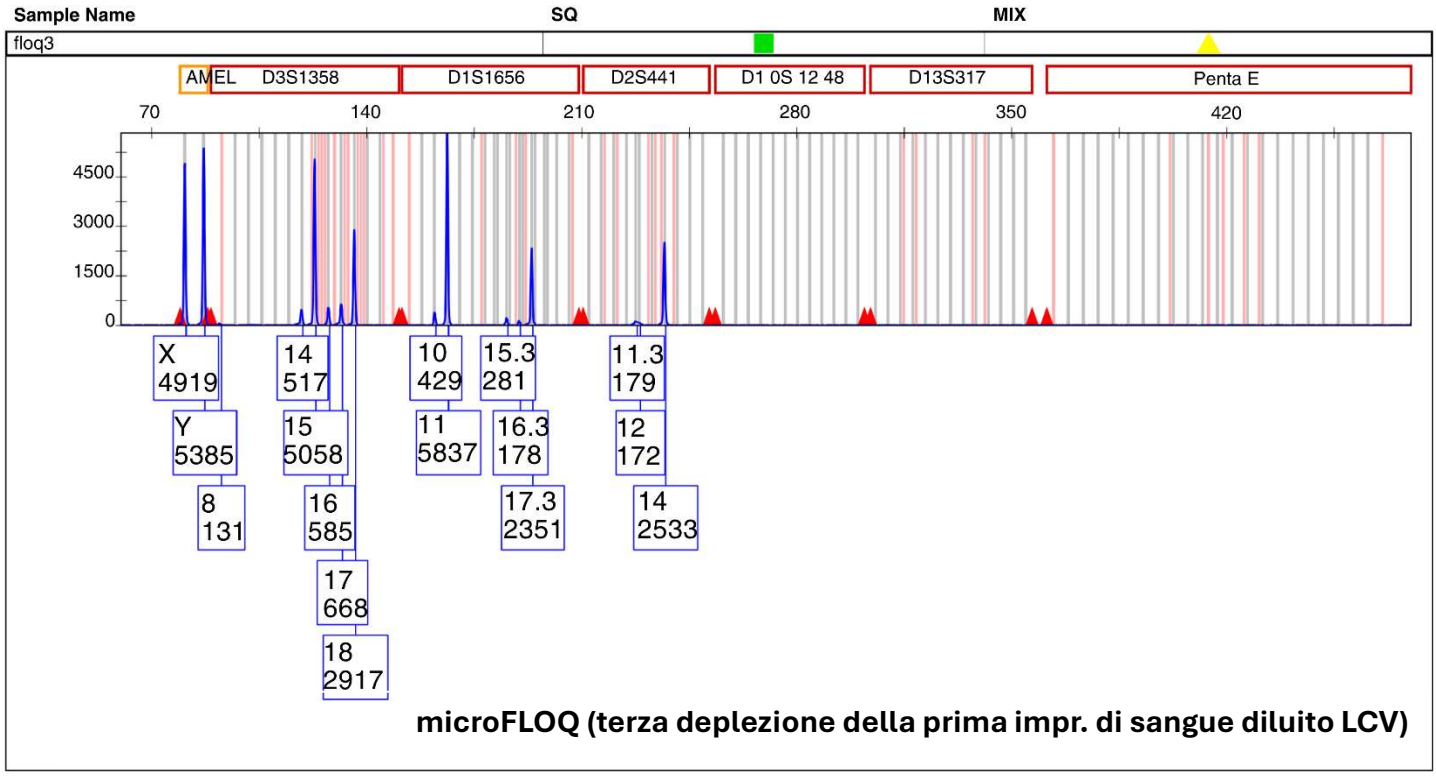
No Sizing Data: 2012-05-floq2-B02.hid

floq2		NA

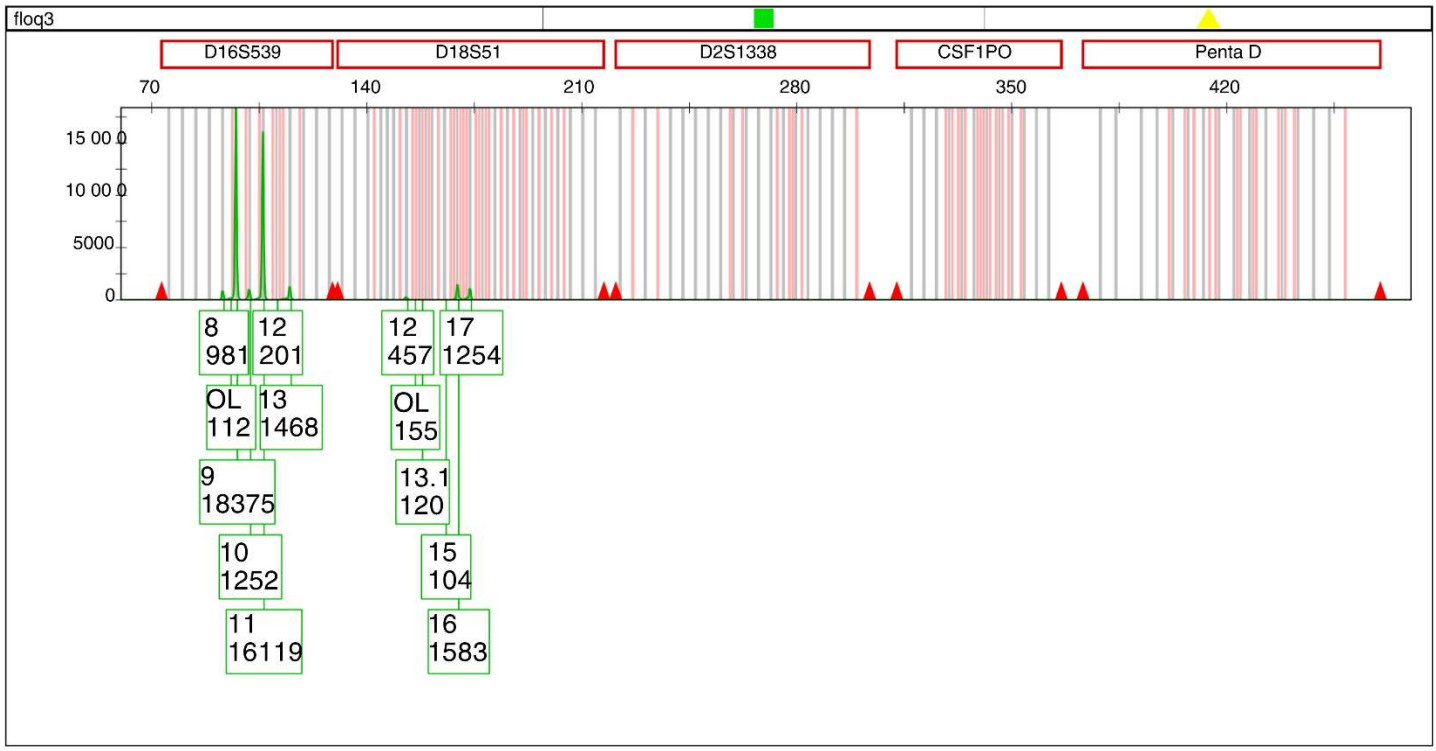
No Sizing Data: 2012-05-floq2-B02.hid

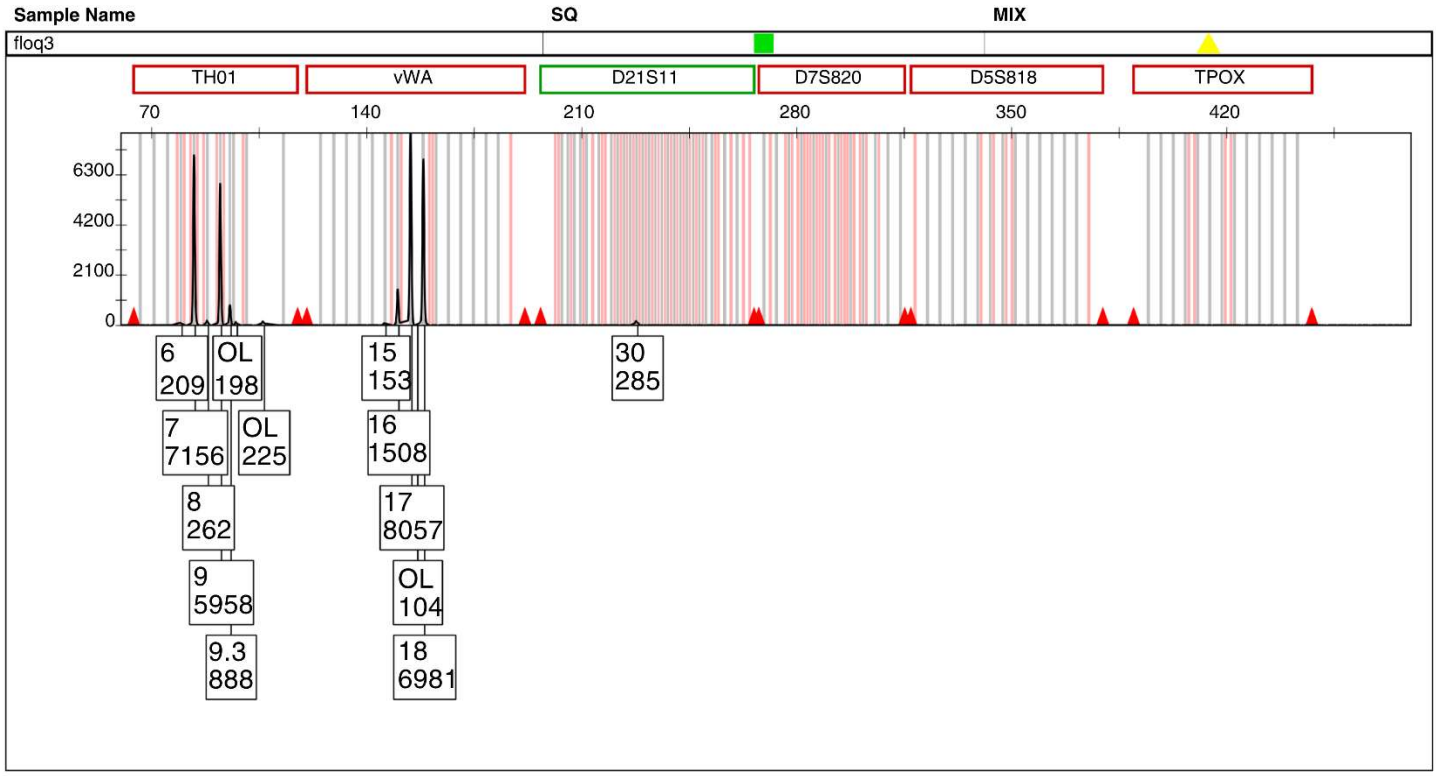
floq2		NA

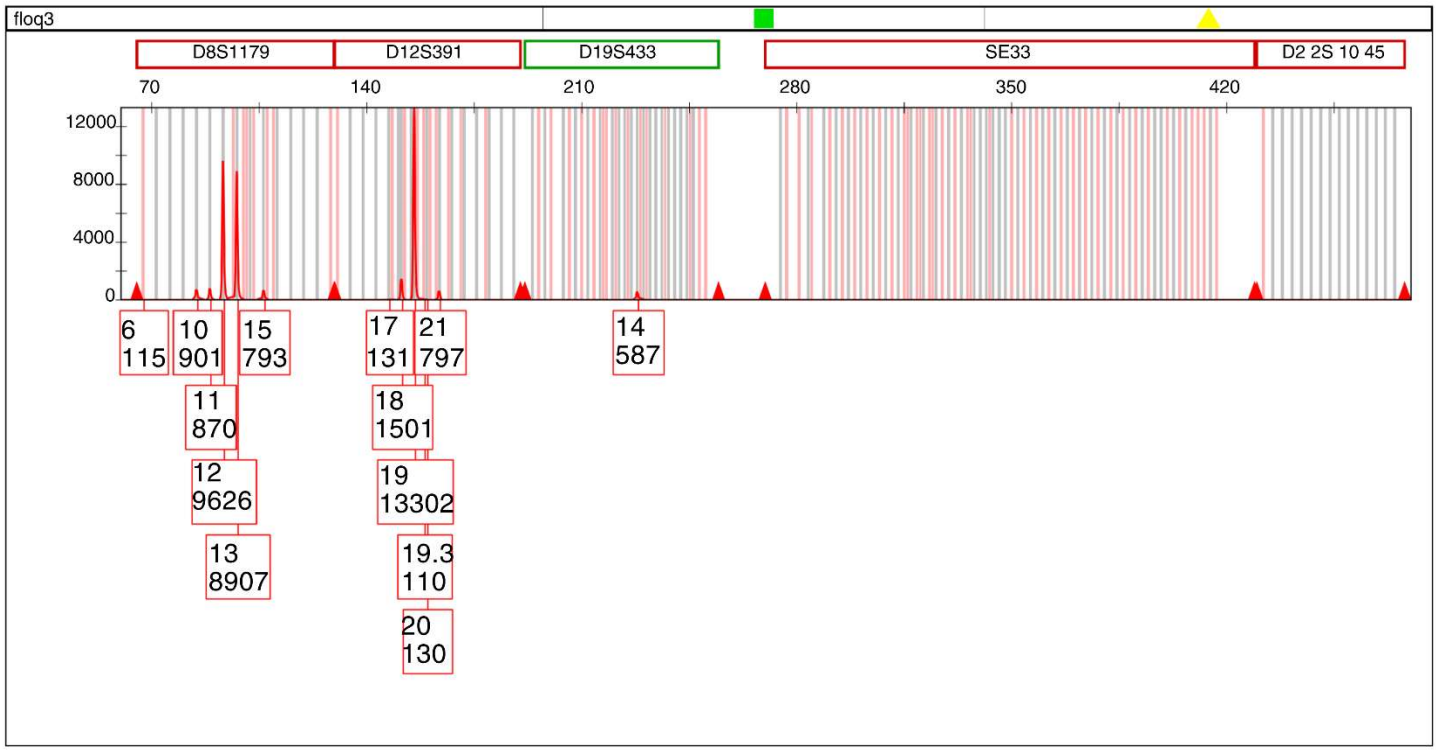
No Sizing Data: 2012-05-floq2-B02.hid

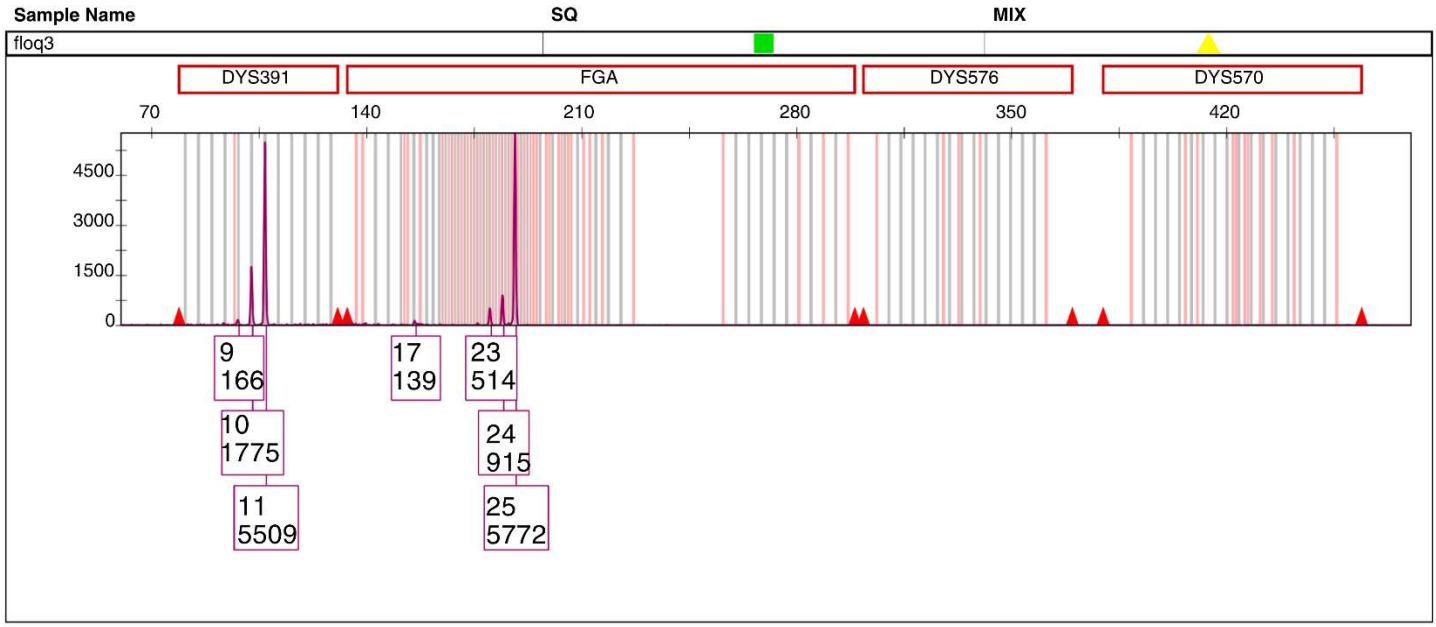


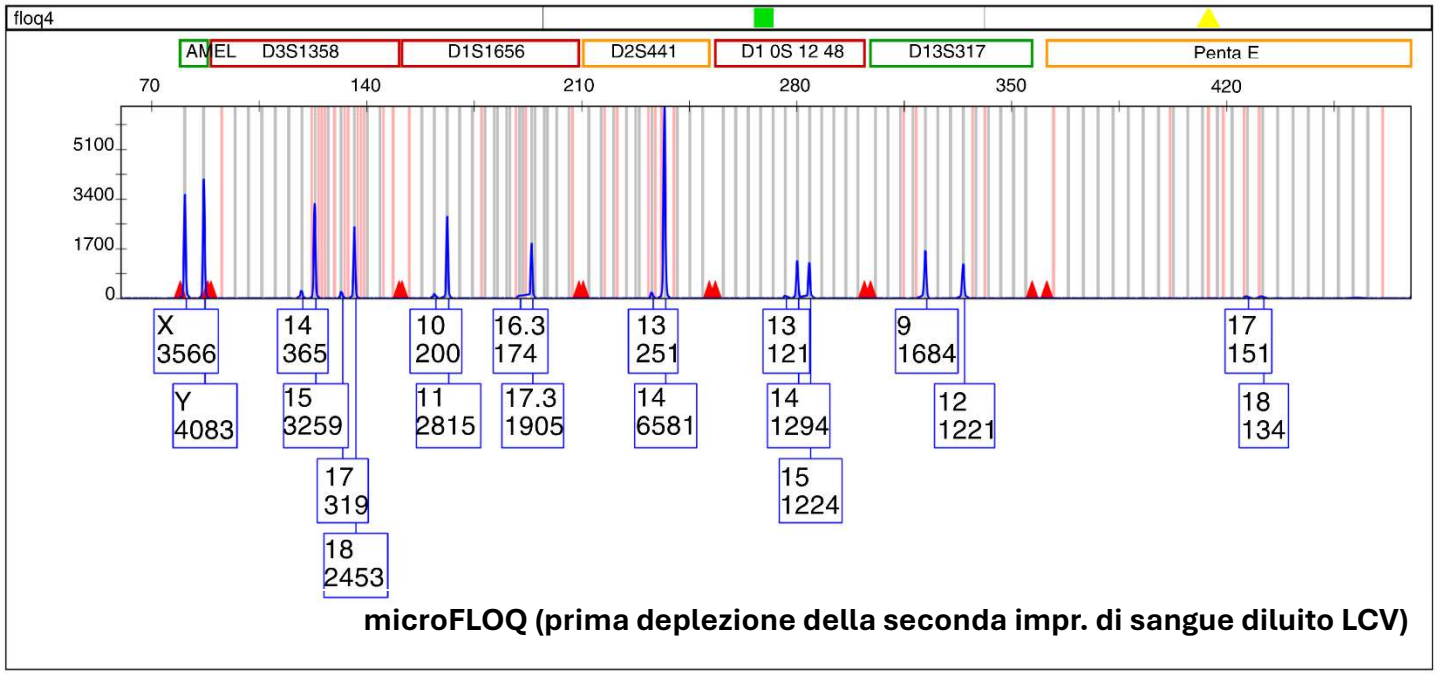
microFLOQ (terza deplezione della prima impr. di sangue diluito LCV)



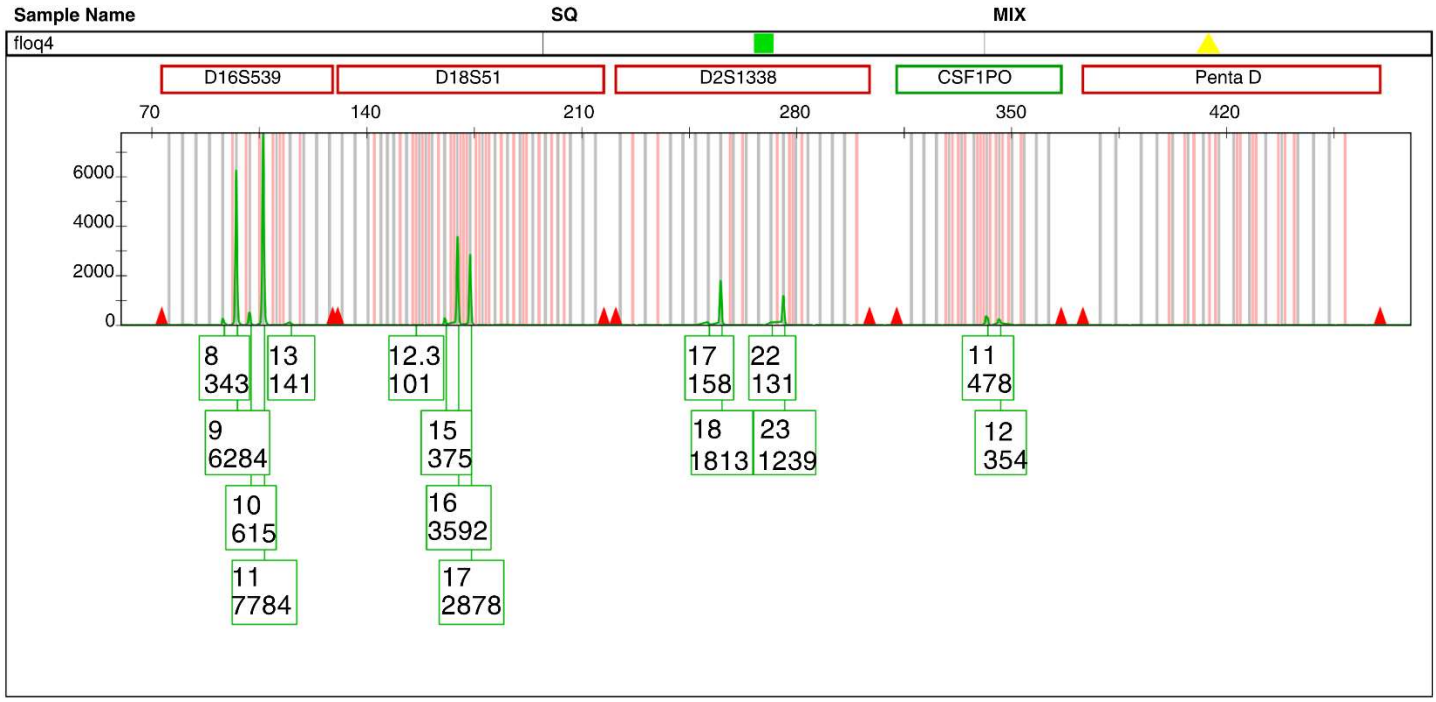

Sample Name
SQ
MIX
floq3
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
6300
4200
2100
0
6 209
OL 198
7 7156
OL 225
8 262
9 5958
9.3 888
15 153
16 1508
17 8057
OL 104
18 6981
30 285

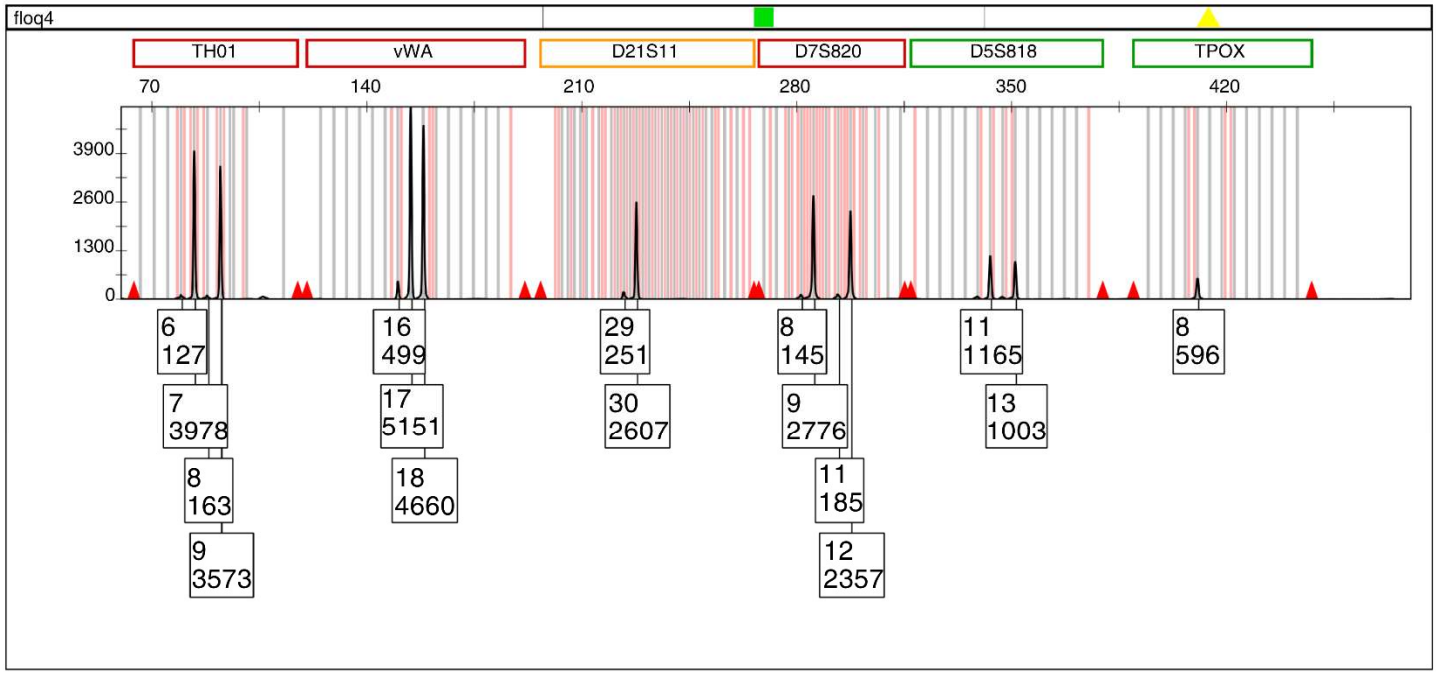

floq3
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
12000
8000
4000
0
6 115
10 901
15 793
11 870
12 9626
13 8907
17 131
21 797
18 1501
19 13302
19.3 110
20 130
14 587

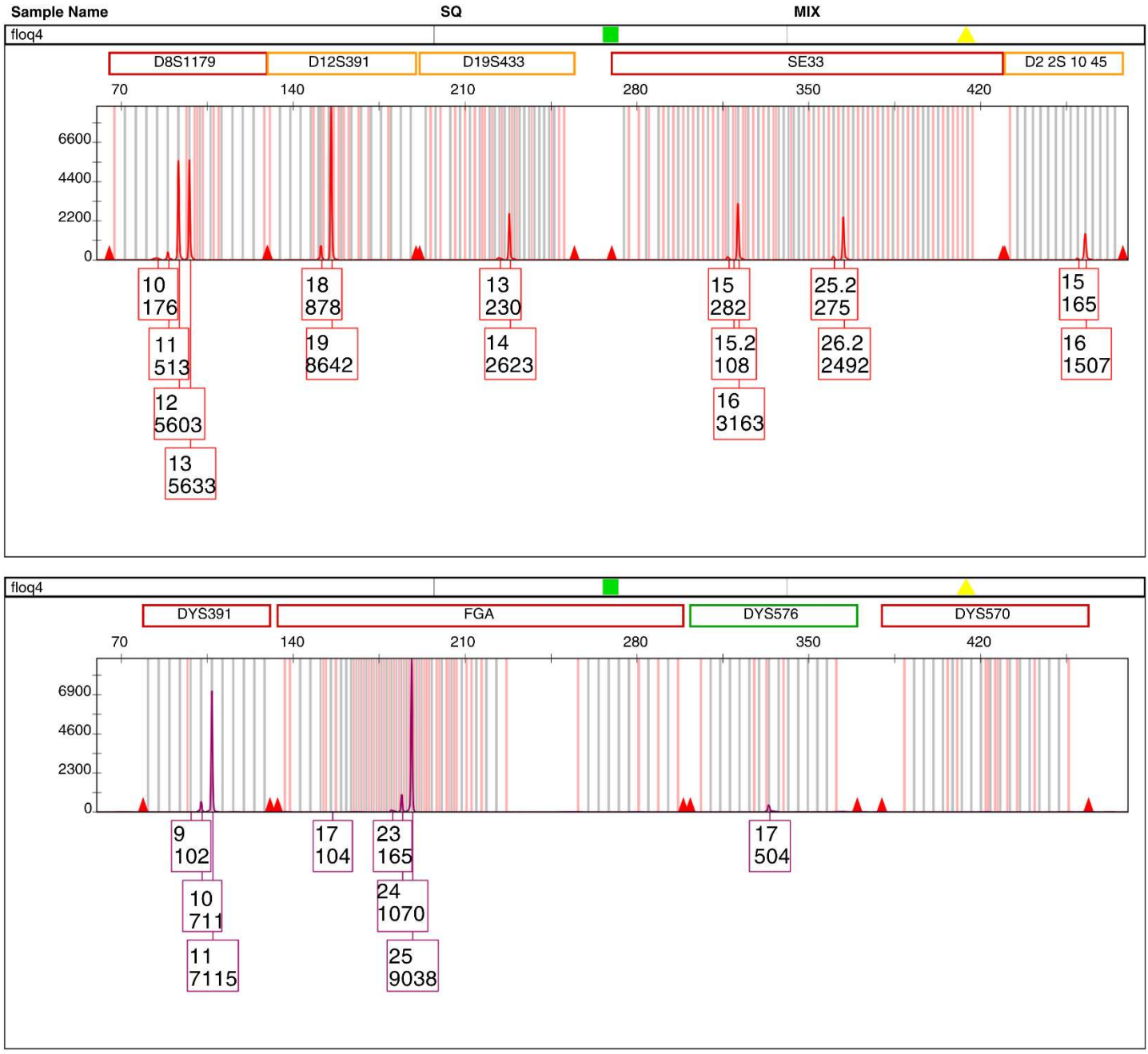


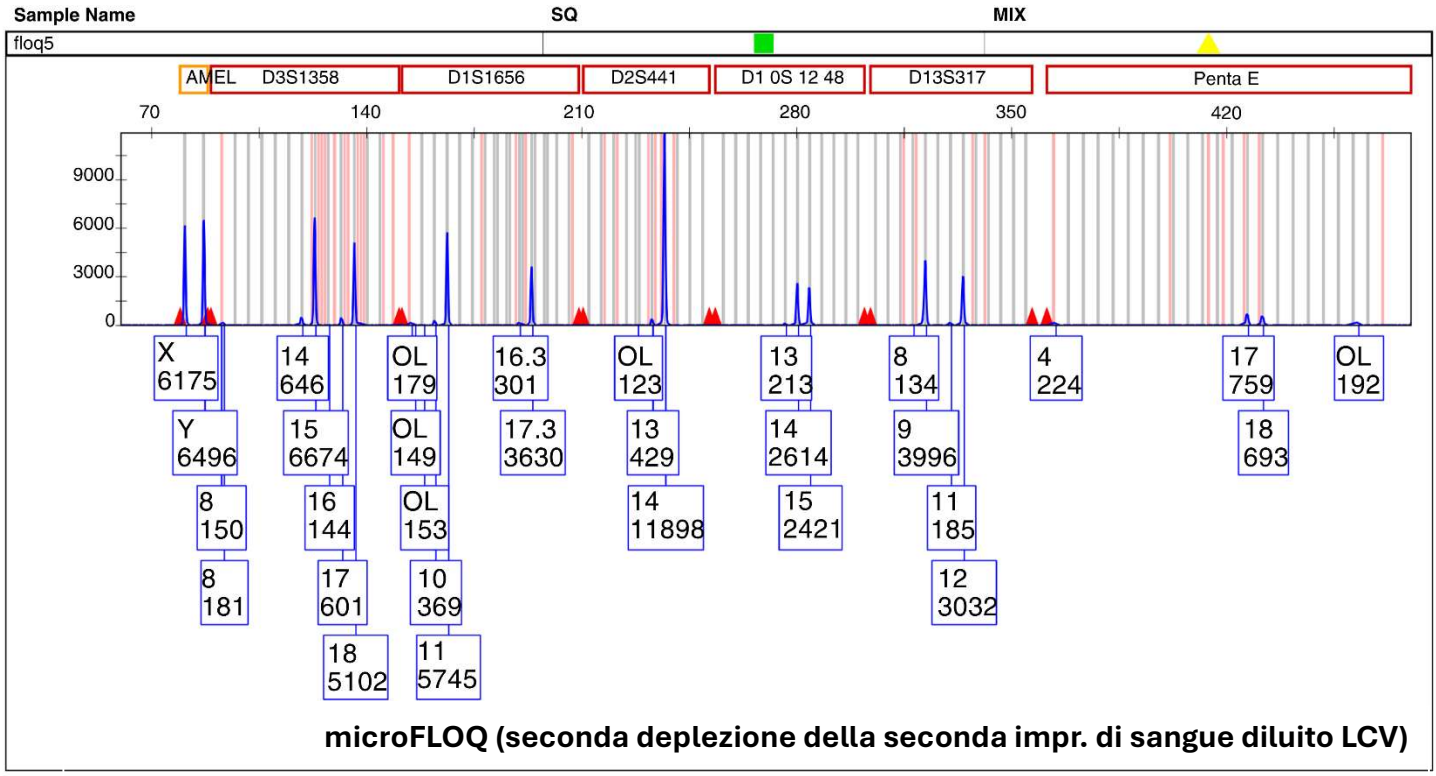


microFLOQ (prima deplezione della seconda impr. di sangue diluito LCV)

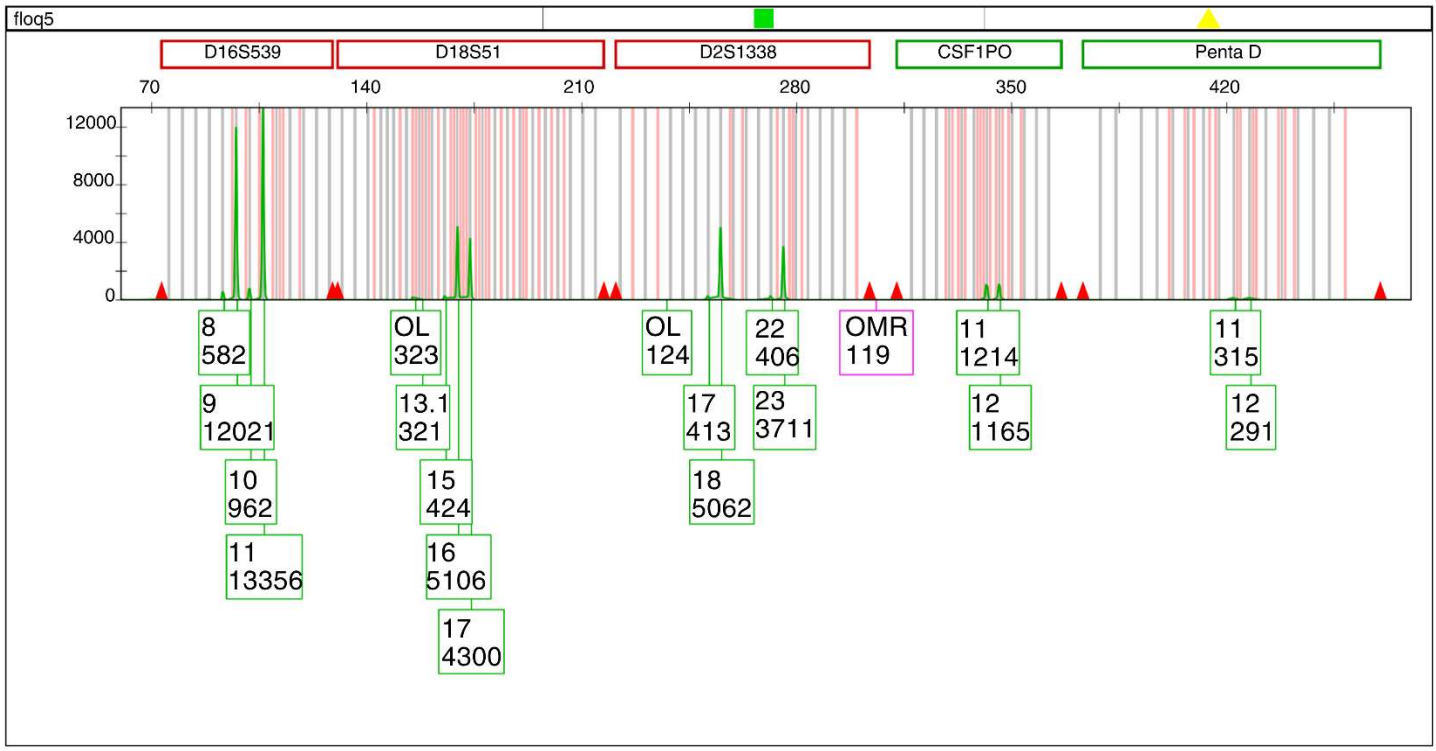

Sample Name
SQ
MIX
floq4
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
6000
4000
2000
0
8
343
13
141
12.3
101
17
158
22
131
11
478
9
6284
15
375
18
1813
23
1239
12
354
10
615
16
3592
11
7784
17
2878

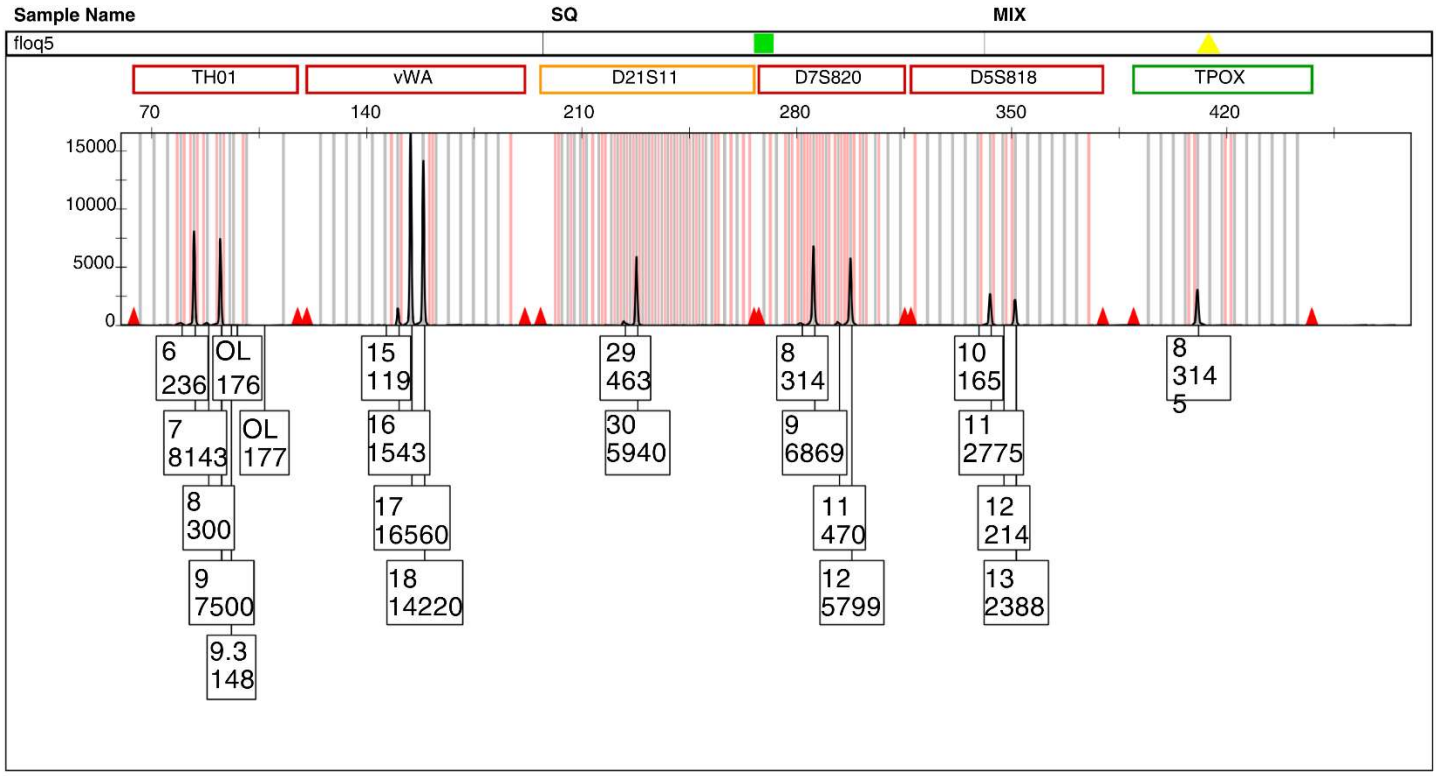

floq4
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
3900
2600
1300
0
6
127
16
499
29
251
8
145
11
1165
8
596
7
3978
17
5151
30
2607
9
2776
13
1003
8
163
18
4660
11
185
9
3573
12
2357

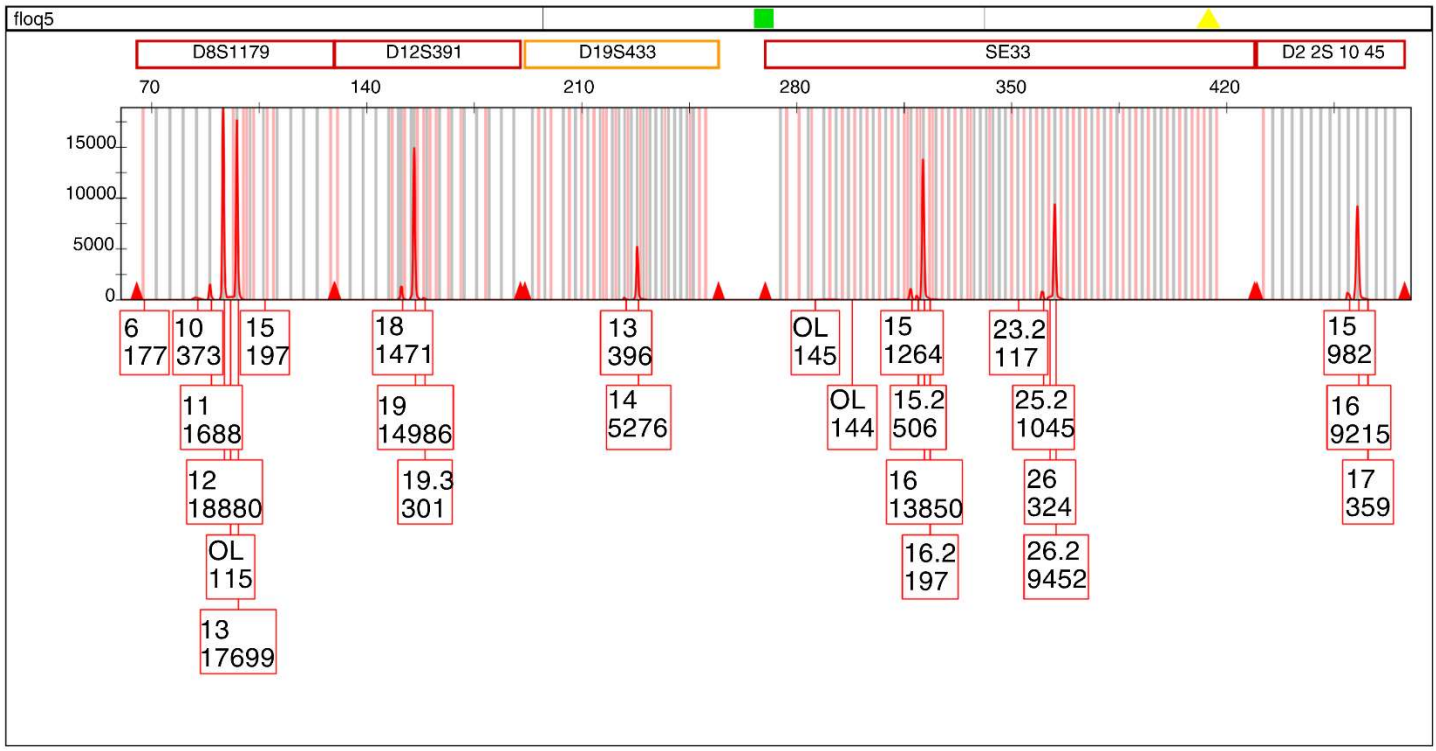

Sample Name
SQ
MIX
floq4
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
6600
4400
2200
0
10 176
11 513
12 5603
13 5633
18 878
19 8642
13 230
14 2623
15 282
15.2 108
16 3163
25.2 275
26.2 2492
15 165
16 1507
floq4
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
70
140
210
280
350
420
6900
4600
2300
0
9 102
10 711
11 7115
17 104
23 165
24 1070
25 9038
17 504

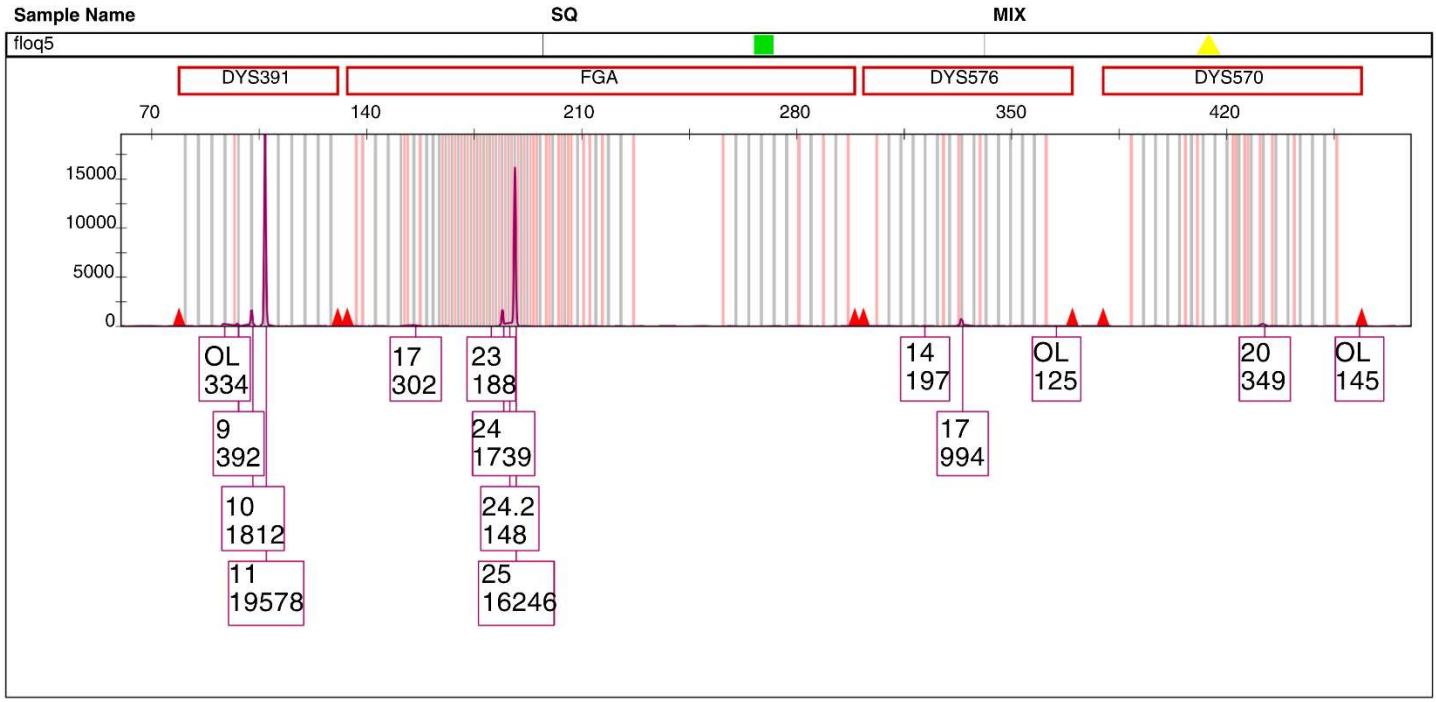


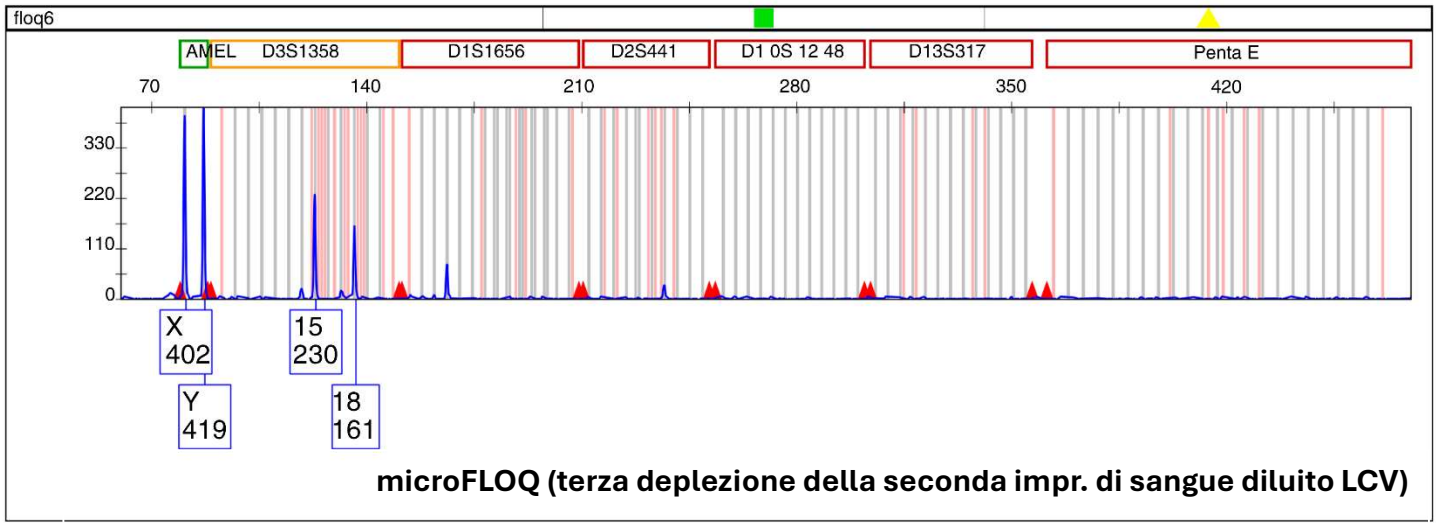
microFLOQ (seconda deplezione della seconda impr. di sangue diluito LCV)



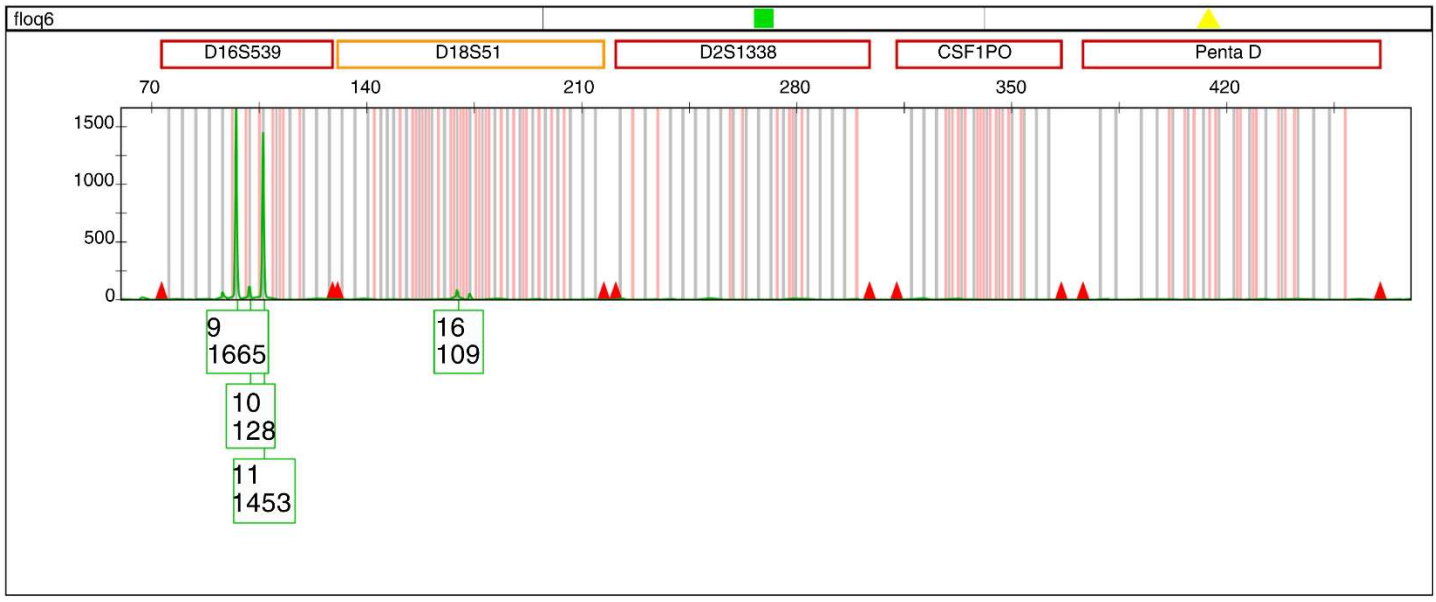

Sample Name
SQ
MIX
floq5
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
15000
10000
5000
0
6 236
OL 176
7 8143
OL 177
8 300
9 7500
9.3 148
15 119
16 1543
17 16560
18 14220
29 463
30 5940
8 314
9 6869
11 470
12 5799
10 165
11 2775
12 214
13 2388
8 314 5


floq5
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D2 2S 10 45
70
140
210
280
350
420
15000
10000
5000
0
6 177
10 373
15 197
11 1688
12 18880
OL 115
13 17699
18 1471
19 14986
19.3 301
13 396
14 5276
OL 145
OL 144
15 1264
15.2 506
16 13850
16.2 197
23.2 117
25.2 1045
26 324
26.2 9452
15 982
16 9215
17 359

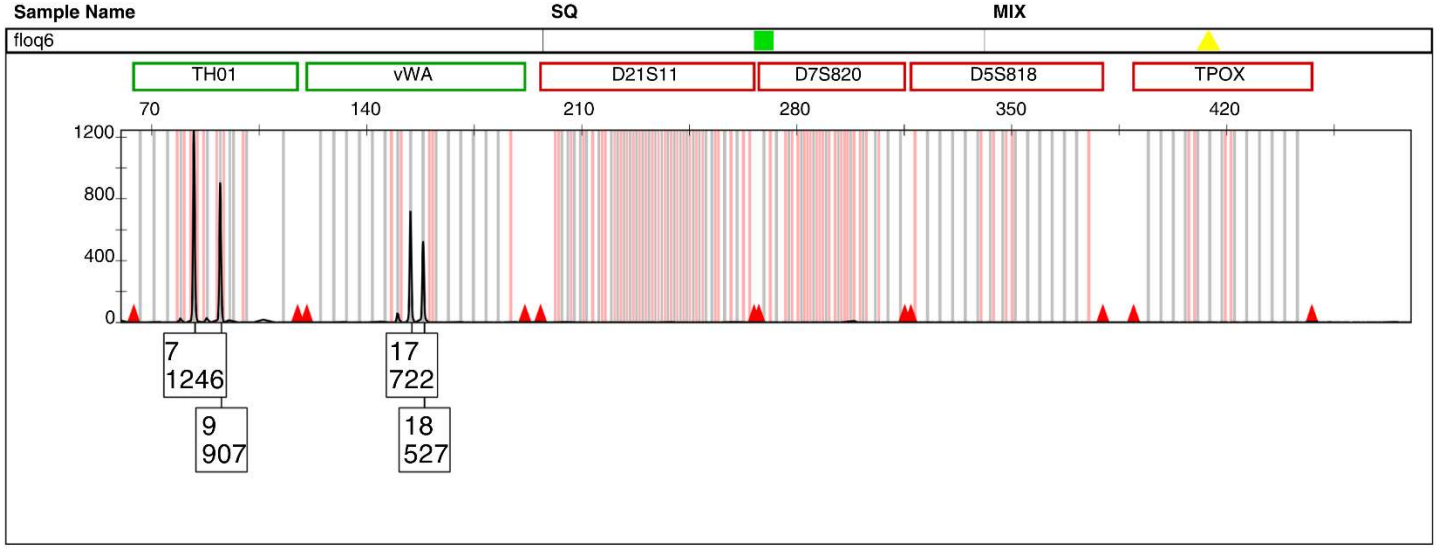


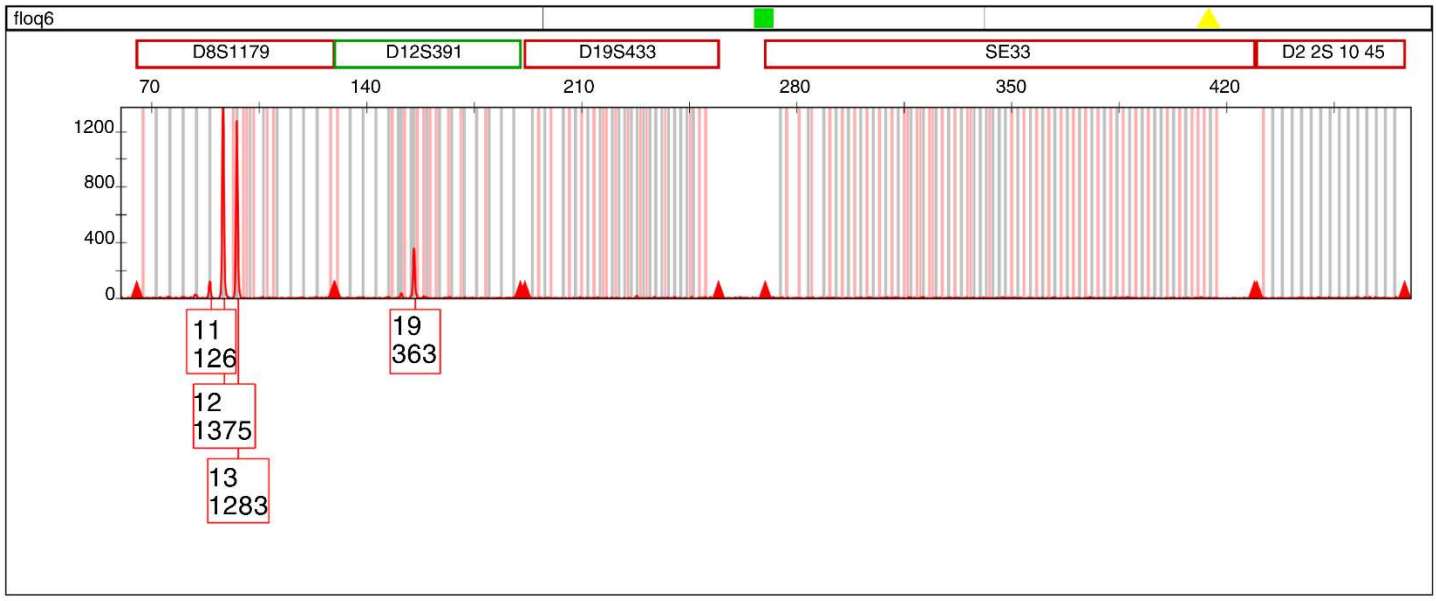


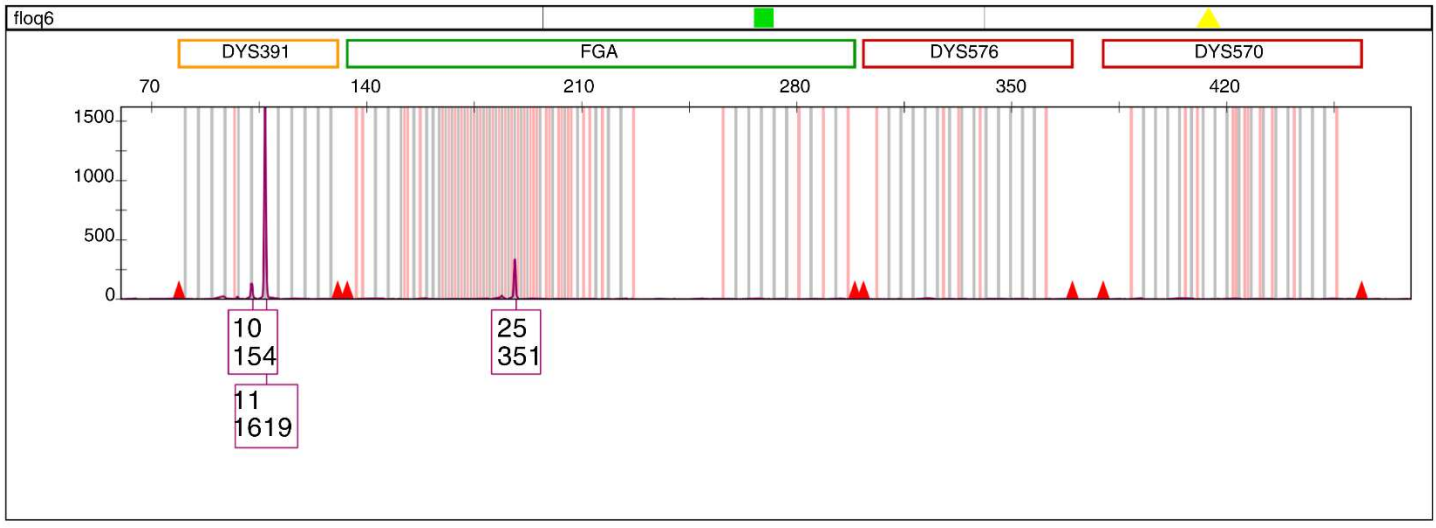
microFLOQ (terza deplezione della seconda impr. di sangue diluito LCV)



Sample Name **SQ** **MIX**

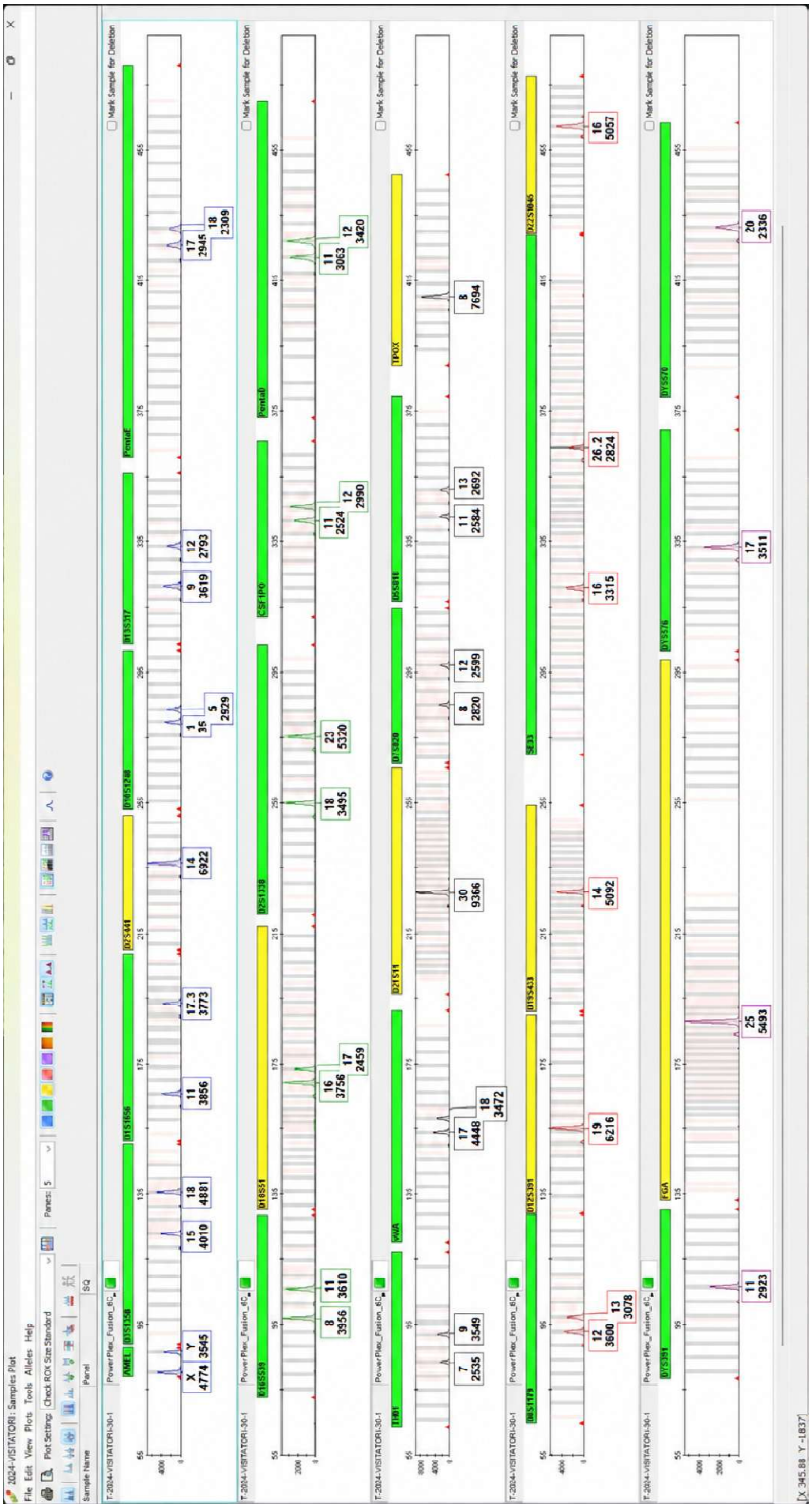




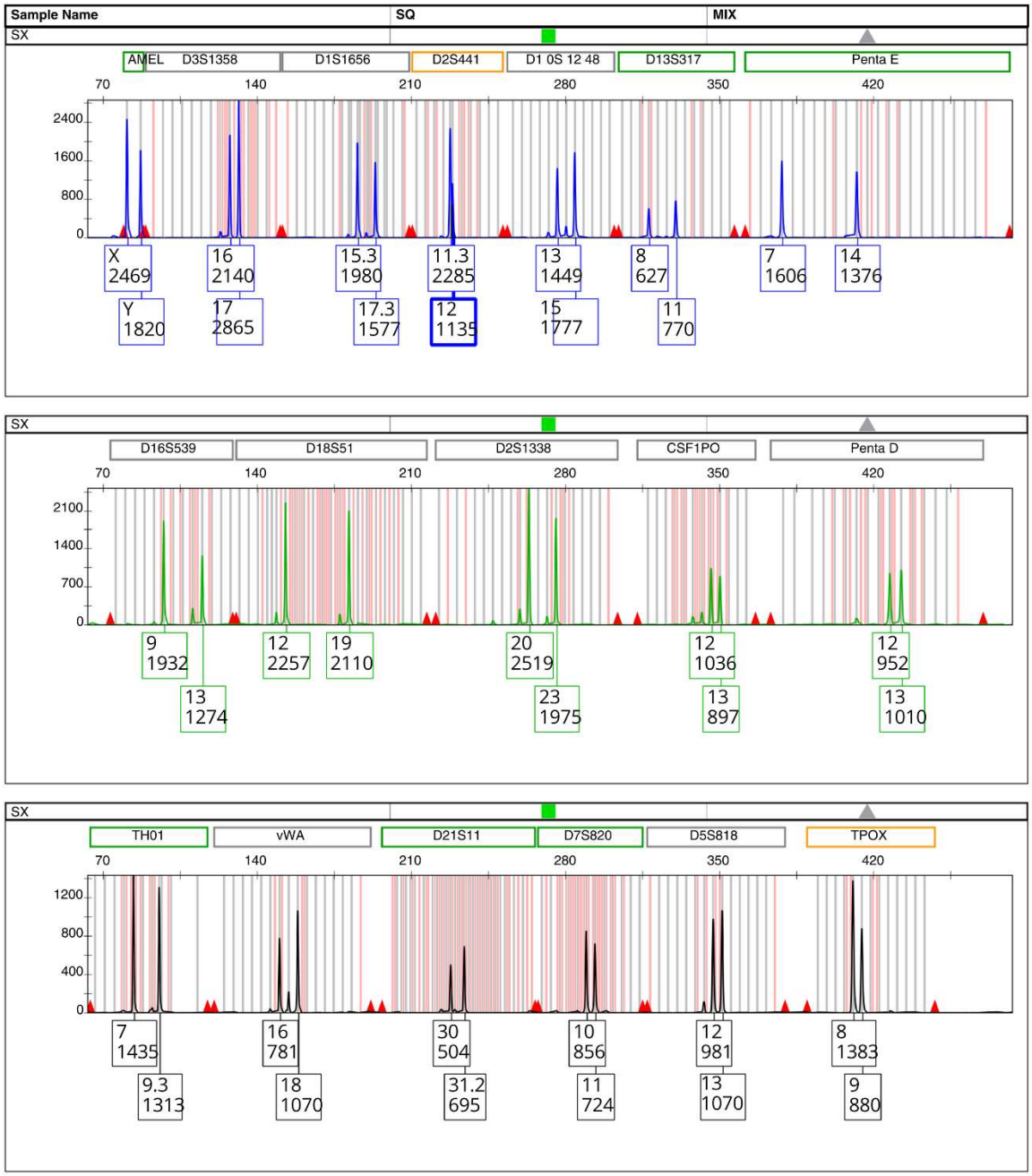


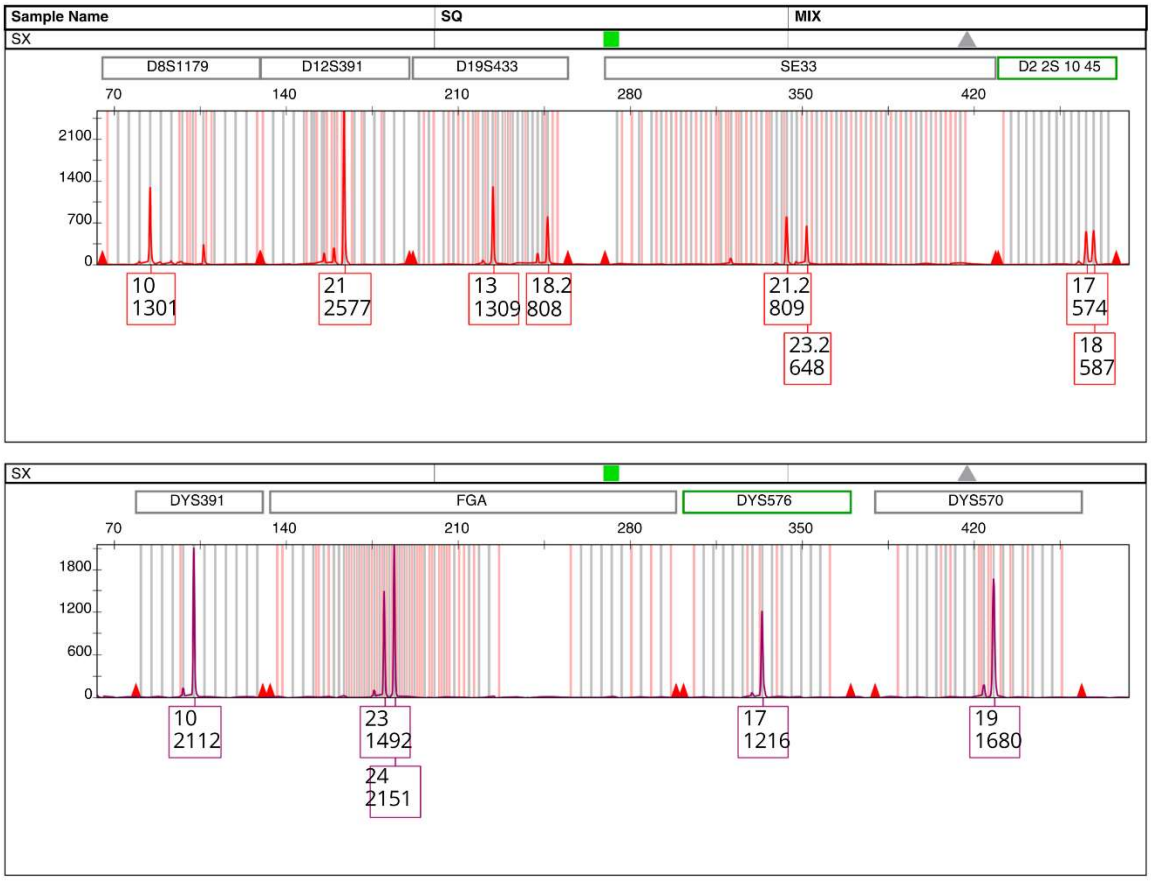
APPENDICE 9

La presente appendice riporta i profili genetici di riferimento dei donatori coinvolti nelle attività sperimentali. Tali profili, ottenuti mediante analisi dei marcatori STR, sono stati utilizzati come termine di confronto per l'interpretazione dei risultati genetici dei campioni analizzati, consentendo di valutare la corrispondenza dei profili ottenuti con quelli dei singoli donatori e di identificare eventuali contributi genetici multipli nei profili misti.



Profilo genetico di riferimento del donatore del sangue, utilizzato sia intero sia diluito al 50% negli esperimenti 6.6 e 6.8.


Sample Name
SQ
MIX
SX
AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D1 0S 12 48
D13S317
Penta E
70
140
210
280
350
420
2400
1600
800
0
X 2469
Y 1820
16 2140
17 2865
15.3 1980
17.3 1577
11.3 2285
12 1135
13 1449
15 1777
8 627
11 770
7 1606
14 1376
SX
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
70
140
210
280
350
420
2100
1400
700
0
9 1932
13 1274
12 2257
19 2110
20 2519
23 1975
12 1036
13 897
12 952
13 1010
SX
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
70
140
210
280
350
420
1200
800
400
0
7 1435
9.3 1313
16 781
18 1070
30 504
31.2 695
10 856
11 724
12 981
13 1070
8 1383
9 880

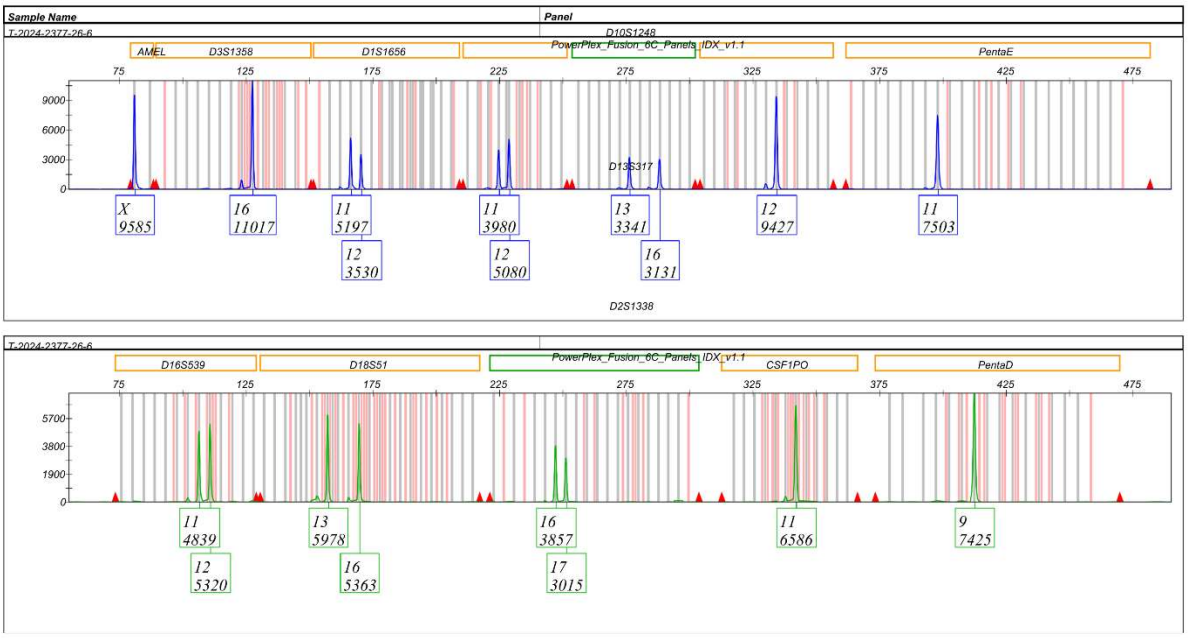


Profilo genetico di riferimento del donatore dell'impronta, negli esperimenti 6.1, 6.2, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7 e 6.8.

appliedbiosystems

Project: 2026-visitatori

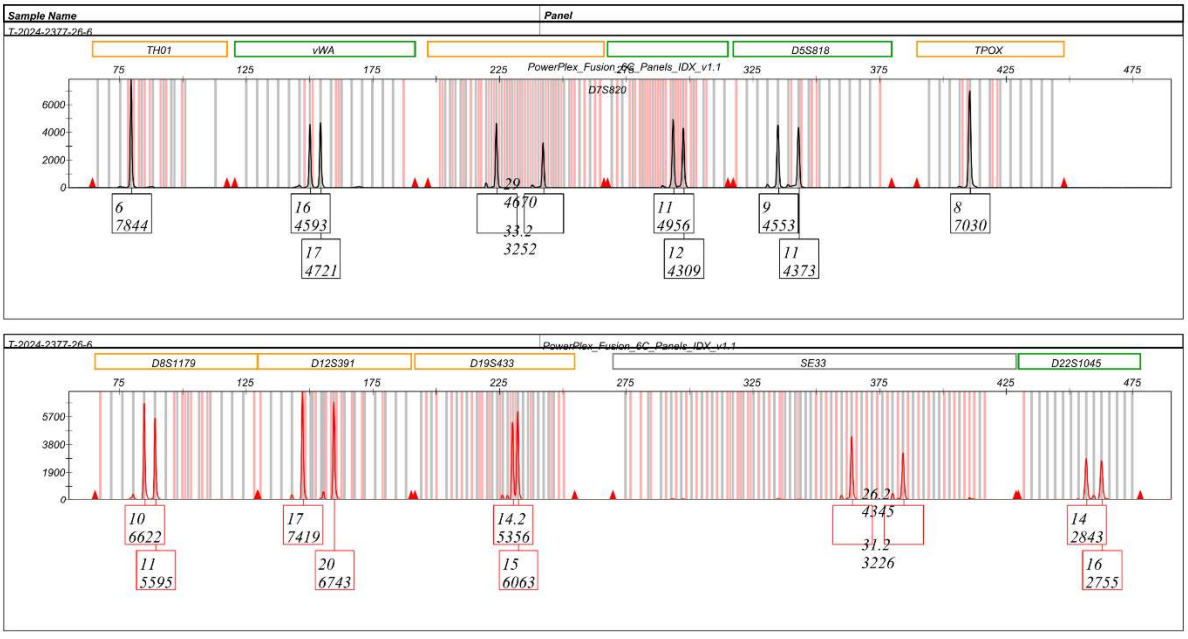
GeneMapper ID-X 1.6

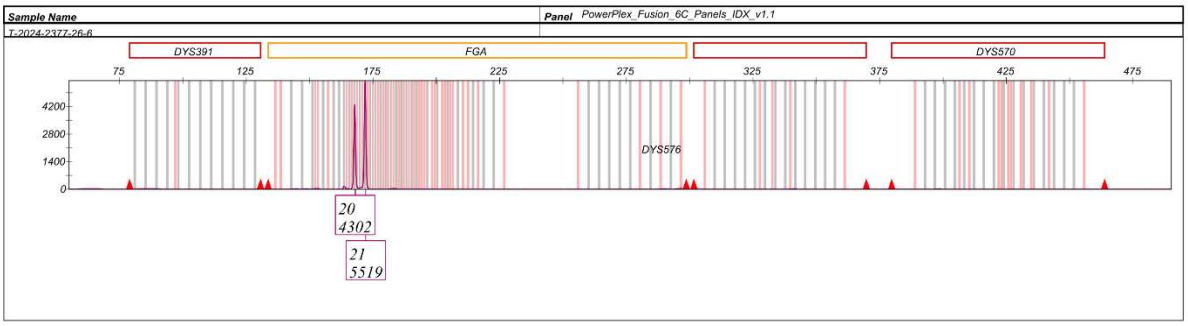


appliedbiosystems

Project: 2026-visitatori

GeneMapper ID-X 1.6





Profilo genetico di riferimento della donatrice dell'impronta, nell' esperimento 6.3.