



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia curriculum Biomedico e Biomolecolare

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Effetti dell'esaltazione dattiloscopica con cianoacrilato sull'integrità del *touch* DNA:
definizione preliminare di un *workflow* analitico per l'ottimizzazione dei risultati**

Candidata: Francesca Parpaglione

Tutor interno: Prof. Vincenzo Agostini



Firmato digitalmente da:
Agostini Vincenzo

Firmato il 05/10/2026 19:08

Seriale Certificato: 5037705

Valido dal 03/11/2025 al 03/11/2028

InfoCamere Qualified Electronic Signature CA

Stage svolto presso: Centro Avanzato di Diagnostica
"Alessandro Bertinaria"

Correlatrici: Dott.ssa Selena Cisana

Dott.ssa Monica Omedei

Anno Accademico 2025/2026

«Stai lontano dalle persone che cercano di sminuire le tue ambizioni. Le persone piccole lo fanno sempre, ma quelle veramente grandi ti fanno sentire che anche tu puoi diventare grande.»

Mark Twain

ABSTRACT

La sinergia tra dattiloscopia e analisi del DNA in ambito forense riveste un ruolo cruciale per l'identificazione individuale. La dattiloscopia forense, ossia le tecniche di rilevazione e di analisi dei *pattern* papillari presenti sui polpastrelli delle dita e sui palmi che formano le impronte digitali, rappresenta una delle tecniche più consolidate nell'identificazione personale, mentre il cosiddetto *touch DNA* si riferisce al materiale genetico che viene trasferito da un individuo a un oggetto o superficie attraverso un semplice contatto, spesso in quantità molto limitate. L'impiego di tecniche di rilevazione consente di evidenziare tracce da contatto, potenzialmente utili nell'ambito dello studio dattiloscopico, al fine di orientare i prelievi biologici per garantire dati robusti e probatoriamente affidabili.

In questo contesto, la possibilità di ottenere profili genetici a partire dal materiale biologico presente nelle impronte latenti potrebbe rappresentare un tema di interesse scientifico, soprattutto alla luce della relativa scarsità di studi sperimentali presenti in letteratura. Tuttavia, sorge una domanda centrale: le tecniche chimiche e fisiche comunemente adottate per lo sviluppo e l'esaltazione delle impronte digitali potrebbero compromettere l'integrità del materiale biologico, influenzandone la quantità, la qualità e la successiva analisi genetica? La valutazione di tali effetti appare quindi fondamentale per la definizione di un flusso di lavoro ottimizzato, in grado di bilanciare efficacemente la visualizzazione dei *pattern* papillari con l'estrazione e l'analisi del DNA.

A tale scopo è stato condotto questo studio che ha previsto l'esaltazione di impronte su substrato non poroso (vetro) applicando diverse tecniche di prelievo ed estrazione. L'efficacia dei trattamenti è stata valutata sulla base della concentrazione e sulla qualità del DNA estratto, valutate mediante tecnica di *Real Time PCR* ed ottenimento del profilo genetico a seguito di amplificazione *Multiplex PCR* ed elettroforesi capillare. Con l'obiettivo finale di delineare un *workflow* che possa ottimizzare la sinergia tra analisi delle impronte e la profilazione genetica, massimizzando e promuovendo una maggiore collaborazione interdisciplinare nelle scienze forensi.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 La struttura molecolare del DNA	1
1.2 Il genoma umano	3
1.3 I polimorfismi	4
1.4 La biologia forense	8
1.5 La storia della biologia forense	9
1.6 Tecniche di analisi del DNA.....	13
1.6.1 La catena di custodia	15
1.6.2 Individuazione, caratterizzazione preliminare delle tracce biologiche e prelievo...	15
1.6.3 L'estrazione.....	17
1.6.4 La Quantificazione	18
1.6.5 L'Amplificazione.....	20
1.6.6 Sequenziamento.....	21
1.7 Degradazione del DNA nucleare	24
1.8 Effetti stocastici	26
1.9 Indici di valutazione statistica e <i>software</i> di calcolo	28
1.10 Storia delle impronte digitali	31
1.10.1 Anatomia delle impronte digitali	33
1.10.2 Esaltazione delle impronte digitali	34
2. MATERIALI E METODI.....	40
2.1 Preparazione dei campioni	40
2.2 Prelievo	40
2.3 Estrazione	43
2.4 Quantificazione.....	43
2.5 Analisi statistiche.....	44
2.5.1 Analisi della varianza (ANOVA) a un fattore.....	45
2.5.2 Test non parametrico di <i>Mann-Whitney U</i>	46
2.6 Amplificazione	47
2.7 Elettroforesi capillare	47
2.8 Analisi biostatistica con <i>software LRMixStudio</i>	48
3. RISULTATI.....	51
3.1 Risultati di quantificazione.....	51
3.1.1 Effetto del trattamento con vapori di cianoacrilato sulla concentrazione di DNA..	55

3.1.2 Confronto della concentrazione di DNA tra <i>kit</i> di estrazione e tecnica di prelievo	58
3.1.3 Confronto del <i>Degradation Index</i> tra <i>kit</i> di estrazione e tecnica di prelievo.....	60
3.2 Risultati elettroforesi capillare.....	61
3.3 Risultati analisi <i>software LRmixStudio</i>	70
4. DISCUSSIONI	72
5. CONCLUSIONI	75
6. BIBLIOGRAFIA	76

1. INTRODUZIONE

1.1 La struttura molecolare del DNA

L'acido desossiribonucleico indicato con l'acronimo DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) è la macromolecola polimerica che ha la funzione di conservare e organizzare l'informazione genetica negli organismi viventi. Esso costituisce il supporto molecolare attraverso il quale le informazioni necessarie alla crescita, allo sviluppo e alla duplicazione cellulare vengono mantenute e trasmesse alle generazioni successive. [1,2]. Nei procarioti, il DNA assume una conformazione circolare all'interno del nucleotide citoplasmatico; negli eucarioti, invece, è organizzato in cromosomi lineari nel nucleo e in quantità minore anche in organelli citoplasmatici, come i mitocondri.

Dal punto di vista chimico, il DNA è un acido nucleico ed è costituito da catene di nucleotidi. Ogni nucleotide comprende: uno zucchero pentoso (deossiribosio), un gruppo fosfato e una base azotata. (Figura 1) [3].

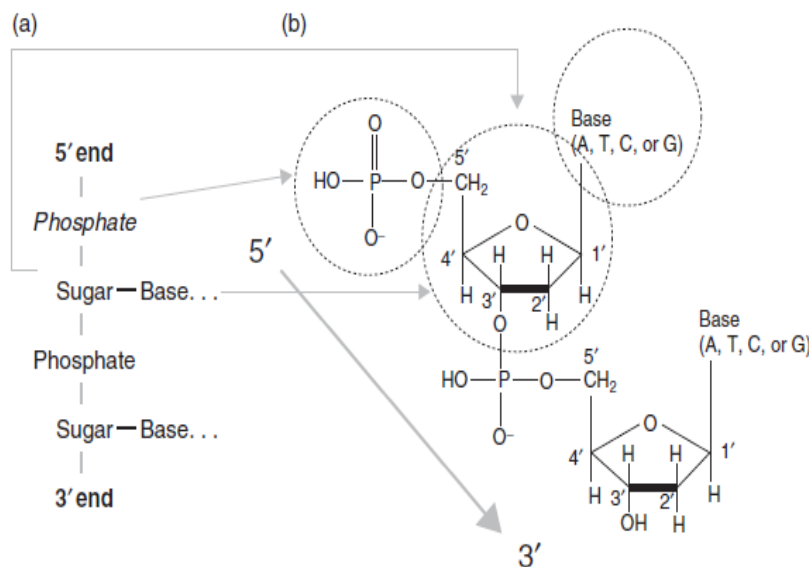


Figura 1: Componenti fondamentali degli acidi nucleici: (a) struttura dello zucchero-fosfato con le basi azotate legate alle molecole di zucchero; (b) struttura chimica dei gruppi fosfato e dello zucchero. Le sequenze di DNA sono convenzionalmente scritte in direzione 5' → 3'. Butler JM. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. Academic Press; 2012.

Le basi azotate si distinguono in purine, adenina (A) e guanina (G), e pirimidine, timina (T) e citosina (C). La complementarità tra le basi determina l'appaiamento specifico A–T e G–C, principio essenziale per la stabilità della molecola. Le osservazioni di *Erwin Chargaff*, note come regole di *Chargaff*, evidenziarono che, indipendentemente dalla specie, la quantità di adenina è equivalente a quella di timina e la quantità di guanina a quella di citosina fornendo la

base per comprendere l'appaiamento preciso dei filamenti complementari. Oltre a ciò, la somma delle purine (A+G) risulta equivalente a quella delle pirimidine (T+C) indicando un rapporto di tipo 1:1 [1,2].

Il gruppo fosfato invece conferisce agli acidi nucleici le loro proprietà acide, derivanti dalla dissociazione protonica che avviene a pH fisiologico. Inoltre, La carica negativa del gruppo fosfato riveste un ruolo fondamentale nel garantire l'integrità intracellulare del DNA: grazie alla sua polarità, la molecola risulta insolubile nei lipidi e, di conseguenza, non può attraversare passivamente le membrane cellulari o nucleari, costituite principalmente da fosfolipidi. Questa proprietà contribuisce in modo decisivo a mantenere la compartimentazione e a preservare l'organizzazione ordinata del materiale genetico all'interno della cellula [4].

Il DNA possiede caratteristiche chimico-fisiche che ne assicurano la funzionalità biologica. La sequenza dei nucleotidi codifica infatti l'informazione genetica, mentre i legami covalenti tra zucchero e fosfato conferiscono stabilità e integrità alla struttura. La disposizione lineare dei nucleotidi non rappresenta la conformazione finale della molecola, che può organizzarsi tridimensionalmente in strutture più complesse, tra cui la caratteristica doppia elica. L'analisi della struttura molecolare ha permesso di comprendere come la sequenza dei nucleotidi e l'orientamento spaziale dei filamenti siano strettamente correlati alle funzioni biologiche della molecola, fornendo le basi per l'interpretazione dei processi di replicazione, trascrizione e regolazione genica [3].

Nel 1953, *Watson e Crick* proposero il modello molecolare della doppia elica del DNA (B-DNA), il quale consiste in due filamenti polinucleotidici complementari e antiparalleli che si avvolgono intorno a un asse comune con andamento destrorso, formando un'elica di circa 20 Å (*Angstrom*) di diametro (Figura 2). Le basi azotate occupano la parte centrale dell'elica, con i piani perpendicolari all'asse, mentre le catene zucchero-fosfato sono rivolte verso il solvente

per ridurre le repulsioni tra gruppi fosfato carichi. I filamenti complementari sono stabilizzati da legami a idrogeno tra le coppie di basi e da interazioni π - π tra basi impilate [5].

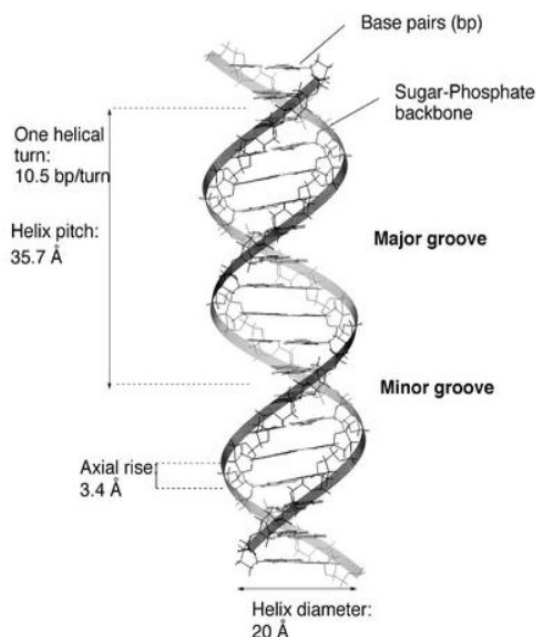


Figura 2: Struttura del B-DNA a doppia elica destrorsa con filamenti antiparalleli, evidenziando solco maggiore e minore, appaiamento delle basi e principali parametri strutturali (diametro ~ 20 Å e passo elicoidale). Belmont P., Constant J.-F., Demeunynck M., *Nucleic acid conformation diversity: from structure to function and regulation*.

1.2 Il genoma umano

Il genoma umano rappresenta l'insieme completo delle informazioni genetiche che guidano lo sviluppo e il mantenimento di un organismo [6]. Tali informazioni regolano processi cellulari fondamentali: la crescita, la proliferazione e la differenziazione delle cellule, la formazione e l'organizzazione dei tessuti e degli organi, nonché la coordinazione dei processi fisiologici e la risposta agli stimoli ambientali [7].

Il Progetto Genoma Umano (HGP) è un programma internazionale di ricerca scientifica avviato nel 1990 con l'obiettivo di sequenziare l'intero genoma umano, ed ha permesso di determinare la sequenza quasi completa del DNA evidenziando come il genoma nucleare umano sia costituito da circa 3,2 miliardi di paia di basi. Solo una piccola porzione, pari circa all'1,5 %, è direttamente coinvolta nella codifica delle proteine e nella regolazione dell'espressione genica. La parte restante è definita DNA non codificante e include sequenze regolatorie, strutturali e microsatelliti [6,8].

All'interno delle cellule umane, il DNA presente nel nucleo cellulare (DNA nucleare) è organizzato in cromosomi ovvero strutture compatte costituite da DNA e proteine istoniche, le quali conferiscono stabilità e permettono la compattazione necessaria per occupare il nucleo cellulare

stesso. [9]. Essi sono numerati da 1 a 22 in ordine di lunghezza decrescente. Le cellule somatiche possiedono due copie dei cromosomi 1-22 provenienti ognuna da un genitore, oltre ad un cromosoma X materno e un cromosoma X o Y (rispettivamente nella femmina e nel maschio) paterno, per un totale di 46 cromosomi distribuiti in 23 coppie, 22 di cromosomi omologhi e una di cromosomi sessuali [6].

I gameti (spermatozoi e cellule uovo) si trovano in stato aploide, in quanto possiedono una sola copia di ciascun cromosoma. Durante la fecondazione, l'unione tra cellula uovo e spermatozoo determina la formazione di uno zigote diploide [10].

Il materiale genetico contenuto nei cromosomi è costituito da regioni codificanti e non codificanti. Le regioni codificanti, denominate geni, contengono le informazioni necessarie affinché la cellula possa produrre proteine. Un gene presenta generalmente una lunghezza compresa tra alcune migliaia e decine di migliaia di paia di basi. I geni sono costituiti da esoni (porzioni codificanti proteine) e introni (sequenze interposte non codificanti) e rappresentano circa il 5% del genoma umano totale. Le restanti regioni non codificanti non sono direttamente coinvolte nella sintesi proteica e sono state a lungo definite "DNA spazzatura". Sebbene le regioni non codificanti non abbiano un ruolo biologico definito. Risultano di estrema importanza per l'analisi di identificazione in ambito forense. I marcatori utilizzati sono localizzati nelle regioni non codificanti del DNA [8].

La posizione cromosomica di un gene o di un marcatore genetico è definita locus. Le diverse varianti di un locus sono denominate alleli. In un individuo diploide ciascun autosoma contiene due copie di ciascun locus, una ereditata dal padre e una dalla madre, determinando così la presenza di due alleli per ciascun locus. Se i due alleli sono identici, il locus è detto omozigote, mentre se sono differenti è definito eterozigote. Nella popolazione umana, circa lo 0,3% del genoma varia tra individui, mentre il restante 99,7% è condiviso, ad eccezione dei gemelli monozigoti, la cui identità genomica si avvicina al 100% [7].

1.3 I polimorfismi

I polimorfismi genetici sono variazioni nel DNA che si riscontrano in almeno l'1 % della popolazione. I polimorfismi costituiscono il principale strumento di differenziazione tra individui e rappresentano la base per le analisi forensi finalizzate all'identificazione personale o alla ricostruzione di legami di parentela. Essi possono manifestarsi come cambiamenti di sequenza o variazioni di lunghezza, con caratteristiche e applicazioni differenti nella genetica molecolare e forense [11].

Esistono due tipologie di polimorfismi:

1. Di sequenza: i polimorfismi più semplici sono i *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), in cui una singola base può differire tra individui (Figura 3). Gli SNP non modificano la lunghezza complessiva del DNA, ma forniscono informazioni di variabilità localizzata [12].

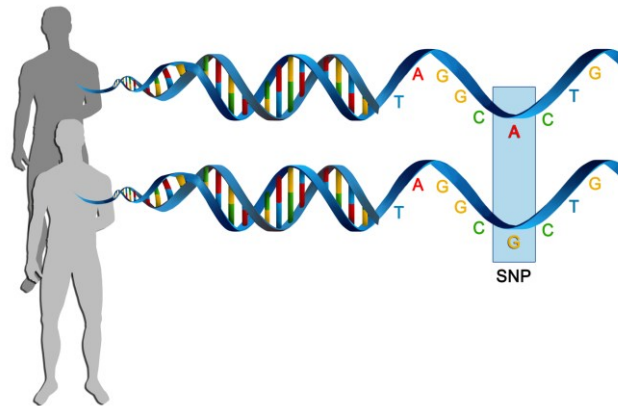


Figura 3: Rappresentazione schematica di un Single Nucleotide Polymorphism (SNP), evidenziato tra due individui in una specifica posizione della sequenza di DNA. In questo esempio, la sostituzione dell'adenina (A) con la guanina (G) costituisce il polimorfismo genetico. Pereira RD, Biroli P, Galama T, von Hinke S, van Kippersluis H, Rietveld CA, et al. *Gene-Environment Interplay in the Social Sciences* (2022).

2. Di lunghezza: costituiscono un'altra categoria di polimorfismi, comprendono sequenze ripetute come *Short Tandem Repeats* (STR) (Figura 4) e *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR) e *Indel*. Gli STR sono brevi sequenze di 1–6 basi, ripetute in tandem; la variabilità allelica dipende dal numero di ripetizioni presenti. Ad esempio, un individuo può avere tre ripetizioni di una sequenza specifica, mentre un altro ne possiede sette, generando alleli di diversa lunghezza per lo stesso locus. I VNTR o microsatelliti presentano unità ripetute più lunghe, con lo stesso principio di variabilità allelica legata al numero di ripetizioni. Gli *indel* (abbreviazione di inserzioni/delezioni) rappresentano

polimorfismi di lunghezza generati dall'aggiunta o dalla perdita di sequenze di nucleotidi e possono variare da un singolo nucleotide a decine di basi [13].

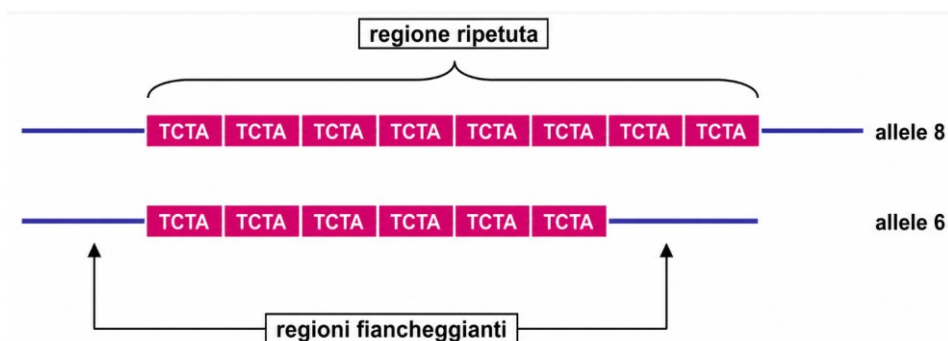


Figura 4: Schema di un STR (Short Tandem Repeat) che mostra due alleli con diverso numero di ripetizioni di un'unità. Tagliabracci A. Introduzione alla genetica forense. Indagini di identificazione personale e paternità. Milano: Springer; 2010.

In genetica forense, gli STR sono il *gold standard* per la tipizzazione grazie alla loro elevata variabilità allelica, alla standardizzazione dei loci e all'elevato potere discriminativo. Il valore discriminante non deriva dal singolo locus bensì dalla combinazione di più loci autosomici considerati indipendenti. La probabilità complessiva di osservare un determinato profilo genetico viene stimata mediante la regola del prodotto secondo la quale le frequenze genotipiche dei singoli loci vengono moltiplicate tra loro assumendo la loro indipendenza statistica. Questo modello riduce in modo esponenziale la probabilità complessiva di coincidenza tra individui non correlati [11,13].

I marcatori genetici utilizzati in ambito forense sono organizzati in gruppi distinti e standardizzati: *autosomal STR*, *marker* di identificazione del sesso come ameloginina (AMEL-X/Y) X-STR, Y-STR, SNP e *indel*. La comunità forense ha adottato linee guida internazionali condivise, tra cui le raccomandazioni della *DNA Commission della International Society for Forensic Genetics* (ISFG), per assicurare uniformità di nomenclatura, designazione allelica e comparabilità dei dati tra laboratori e banche dati nazionali e internazionali [14,15].

Per quanto riguarda gli STR autosomici, essi sono designati con nomi che iniziano per D o per acronimi specifici (es. vWA, FGA).

Esempio: D3S1358

D= DNA

3= cromosoma

S= *single strand*

1358= numero progressivo che identifica il segmento specifico all'interno della mappatura del genoma.

I principali set standardizzati includono:

- CODIS (*Combined DNA Index System*) (Figura 5): CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA.
- ESS (*European Standard Set*): D3S1358, FGA, D8S1179, TH01, vWA, D18S51, D21S11.
- Set più moderni: D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391, D22S1045, Penta D, Penta E, SE33, D6S1043 [16,17]

Per determinare il sesso si impiega il marcatore Amelogenina che permette la tipizzazione del sesso grazie alle differenze di lunghezza tra le varianti sul cromosoma X e Y. La peculiarità dell'amelogenina è che a differenza della maggior parte dei *marker* STR i quali sono non codificanti, essa codifica per una proteina coinvolta nella formazione dello smalto dentale. L'amelogenina è presente su entrambi i cromosomi sessuali nei soggetti maschili (XY), la PCR amplifica entrambe le varianti, generando due bande distinte nell'elettroferogramma, mentre nei soggetti femminili (XX) è presente solo la variante X, quindi si osserva un singolo picco nel profilo elettroforetico [17,18].

- Y-STR: loci specifici del cromosoma Y, identificati con prefisso DYS (es. DYS19, DYS385, DYS389, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS438, DYS439, ecc.), utilizzati per costruire aplotipi applicabili in profili di DNA maschili.
- Gli X-STR, invece, derivano da loci ripetuti sul cromosoma X e sono particolarmente utili per analisi in individui femminili. Loci noti includono DXS10079, DXS101, DXS10146, DXS10148, DXS6800, DXS6803, DXS6809, DXS7132, DXS7424, DXS8378, DXS9902 e HPRTB. Gli X-STR si organizzano in gruppi di *linkage* ossia

cluster di loci fisicamente vicini sul cromosoma X, che tendono a essere ereditati insieme in quanto la ricombinazione tra loro è rara o assente [19].

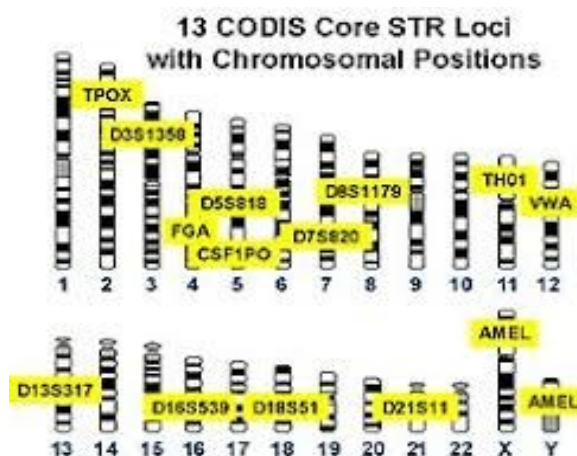


Figura 5: Schema dei loci STR core del sistema CODIS. Moretti TR, Moreno LI, Smerick JB, Pignone ML, Hizon R, Buckleton JS, Bright JA, Onorato AJ. Population data on the expanded CODIS core STR loci for eleven populations of significance for forensic DNA analyses in the United States. (2016)

1.4 La biologia forense

La biologia forense è un ramo delle Scienze Forensi, intese come l'insieme delle discipline scientifiche che applicano metodi e conoscenze delle scienze naturali all'analisi e all'interpretazione delle prove nell'ambito dei procedimenti giudiziari, che, mediante l'impiego di tecniche di biologia molecolare, identifica singoli individui a partire da campioni biologici di DNA. Queste tecniche rivestono un ruolo centrale nell'attività investigativa, nei reati in cui può essere dirimente l'impiego di tecniche volte a desumere informazioni utili da residui di natura biologica rinvenibili sui reperti associati al reato [20,21].

Essa si configura come un insieme di procedure rigorosamente standardizzate volte all'analisi e all'interpretazione di materiali biologici (insieme eterogeneo di sostanze e strutture di origine biologica costituite da componenti derivati da organismi viventi, che includono fluidi corporei, tessuti, cellule e loro derivati molecolari, utilizzabili per analisi diagnostiche, identificative o di ricerca.) associati a eventi criminosi o a problematiche di natura civile quali le controversie di paternità, successioni ereditarie o altre dispute in cui la prova biologica può influire sulla determinazione dei diritti o degli obblighi tra le parti. L'obiettivo primario è quello di identificare, con elevata accuratezza e affidabilità scientifica, la possibile correlazione tra un individuo e una traccia biologica, inserendo tale valutazione all'interno di un quadro probatorio validato e riproducibile [22]. Nei contesti civili, come nella determinazione di relazioni di parentela o l'accertamento di paternità. La comparazione dei profili genetici consente di determinare

statisticamente se due individui siano biologicamente correlati o se un individuo sia il contributore di una traccia [20,21].

Un principio fondamentale alla base delle analisi genetiche in ambito forense è rappresentato dal fatto che il DNA nucleare di un individuo è sostanzialmente identico in tutte le cellule dell'organismo, indipendentemente dal tessuto o dal fluido biologico da cui esso viene estratto. Tale uniformità deriva dai processi di replicazione e divisione cellulare che, durante la mitosi, garantiscono la trasmissione del medesimo patrimonio genetico alle cellule figlie. Esistono tuttavia rare eccezioni a questo principio come ad esempio il mosaicismo genetico, condizione per cui nello stesso individuo possono coesistere popolazioni cellulari con differenze genetiche dovute a mutazioni insorte durante lo sviluppo embrionale o nel corso della vita. Nonostante queste eventualità, l'uniformità del patrimonio genetico nelle cellule dei diversi tessuti di uno stesso individuo rappresenta il presupposto biologico che rende possibile l'utilizzo di differenti matrici biologiche nelle analisi di identificazione genetica [23].

Il DNA può essere ottenuto da qualsiasi fluido biologico, offrendo così ampie opportunità per l'analisi forense, anche a partire da campioni eterogenei o con concentrazione estremamente ridotta di materiale genetico. Le principali matrici biologiche impiegate includono: sangue, liquido seminale, bulbi piliferi, saliva, cellule epiteliali e tessuto osseo [20,21].

1.5 La storia della biologia forense

Un primo approccio sistematico all'identificazione personale in ambito forense si colloca nella seconda metà del XIX secolo, quando le istituzioni criminali europee e americane – in particolare i corpi di polizia, le amministrazioni penitenziarie e gli uffici di identificazione giudiziaria incaricati della registrazione dei recidivi – cercavano metodologie standardizzate per distinguere in modo oggettivo gli individui. Una delle prime tecniche formalizzate fu ideata da *Alphonse Bertillon* tra il 1880 e il 1890 [24]: il metodo di antropometrico giudiziario, noto come *bertillonage*, si basava sulla rilevazione di un insieme di misure corporee standardizzate (quali altezza, lunghezza degli arti, circonferenze corporee ecc.) insieme alla documentazione fotografica frontale e laterale dell'individuo ed a caratteri descrittivi come ad esempio le cicatrici. Le misure venivano annotate in schede dettagliate e confrontate con archivi preesistenti per tentare un'associazione tra un sospetto e precedenti registrazioni di individui noti, offrendo un primo tentativo di codificazione sistematica delle caratteristiche fisiche umane per fini identificativi. Questo metodo, seppur innovativo per il suo rigore descrittivo, presentava dei limiti inerenti al potere discriminante e alla stabilità delle misurazioni nel tempo, risultando sensibile

all'errore umano e alle variazioni biologiche naturali. Contemporaneamente, si sviluppava un secondo approccio con base biometrica più distintiva ovvero la dattiloscopia [25]. Basata sull'osservazione dei pattern cutanei delle impronte digitali, la dattiloscopia si concentra su strutture papillari uniche per ogni individuo, caratterizzate da formazioni quali ad esempio *loop* (cicli), *delta*, *whorl* (spirali) e *arch* (archi) (Figura 6).

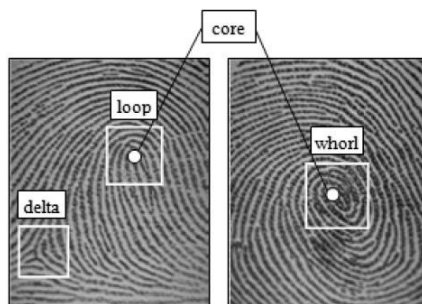


Figura 6: elementi costitutivi di un'impronta digitale. D. Maltoni, D. Maio, A.K. Jain and J. Feng, *Handbook of Fingerprint Recognition (Third Edition)*, Springer Nature, 2022

Queste caratteristiche, seppure originate da osservazioni di studiosi del XIX secolo, mostrarono un livello di variabilità individuale maggiore e più stabile nel tempo rispetto alle misure antropometriche corporali, e si imposero come strumento di identificazione più efficace. In Argentina, l'adozione pratica delle impronte digitali portò all'utilizzo giudiziario della dattiloscopia alla fine del XIX secolo, quando *Juan Vucetich* [26] impiegò queste strutture papillari per associare in modo definitivo una traccia lasciata sulla scena di un crimine al responsabile, mostrando l'efficacia applicativa di questo metodo rispetto alle misurazioni fisiche precedenti. In Gran Bretagna, il caso dei fratelli *Stratton* del 1905 rappresenta uno dei primi esempi documentati in cui le impronte digitali furono ammesse come evidenza probatoria in un procedimento penale, consolidando la dattiloscopia come strumento affidabile per l'identificazione individuale nelle indagini criminali [27].

Successivamente, con l'introduzione di tecniche più avanzate, l'identificazione individuale in ambito forense si è basata sulla caratterizzazione dei polimorfismi proteici [28]. In particolare, venivano analizzati i sistemi AB0 e Rh, nonché i complessi HLA (*Human Leukocyte Antigen*), tramite tecniche immunologiche ed elettroforetiche per la separazione delle proteine. L'obiettivo era quello di sfruttare le differenze qualitative e quantitative delle proteine tra individui per ottenere un'identificazione, seppur parziale, del soggetto di interesse. Tuttavia, queste metodiche presentavano delle limitazioni. In primo luogo, la stabilità delle proteine nelle matrici biologiche è relativamente bassa: in particolare, campioni ematici o tissutali subiscono una rapida degradazione proteica, compromettendo la capacità di ottenere profili affidabili. Inoltre, il

numero di marcatori disponibili era limitato, riducendo il potere discriminante delle analisi e di conseguenza la capacità di distinguere individui in popolazioni ampie. Questi fattori rendevano le tecniche basate sui polimorfismi proteici poco adatte per applicazioni forensi complesse. L'introduzione delle tecniche di analisi del DNA ha risolto molti di questi limiti, consentendo un'identificazione specifica e sensibile anche a partire da quantità minime di materiale biologico e da campioni degradati.

Nel 1984, *Alec Jeffreys* sviluppa un metodo sperimentale noto come tecnica del DNA *fingerprinting* la quale si basava sulla caratterizzazione delle sequenze di DNA altamente polimorfiche definite VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*).

L'analisi dei VNTR hanno costituito le basi storiche del DNA *fingerprinting*, gli STR rappresentano oggi lo standard nelle analisi forensi, in test di parentela e in studi genetici di popolazione, grazie alla loro efficienza e affidabilità [20].

La svolta decisiva nell'ambito della genetica forense si ebbe nel 1985 quando *Kary Mullis* sviluppò e introdusse la tecnica di PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Più nello specifico la PCR rappresenta una metodica in vitro finalizzata all'amplificazione selettiva ed esponenziale di specifiche sequenze di acidi nucleici. Tale tecnica consente la sintesi di copie multiple di un frammento di DNA a partire da un filamento stampo, mediante l'azione della DNA-polimerasi, che catalizza l'assemblaggio dei nucleotidi guidata da primer progettati per legarsi alle estremità della sequenza di interesse. Per la realizzazione della PCR, la miscela di reazione deve contenere diversi componenti essenziali:

- Sequenza target: rappresenta il materiale genetico da amplificare.
- DNA-polimerasi: è l'enzima responsabile della sintesi *de novo* dei filamenti di DNA, catalizzando l'aggiunta sequenziale di deossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs) all'estremità 3'-OH del *primer*, in direzione 5'→3', sulla base della complementarità con il filamento stampo. Ciascun nucleotide in ingresso viene appaiato al nucleotide complementare dello stampo e incorporato mediante formazione di un legame fosfodiesterico, con rilascio di pirofosfato; il filamento neosintetizzato cresce quindi per addizione progressiva di monomeri finché la polimerasi percorre la sequenza bersaglio. Una delle più utilizzate è la Taq polimerasi, enzima derivato dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*, capace di resistere alle elevate temperature necessarie alla denaturazione del DNA al fine di separare i due filamenti della doppia elica, permettendo così ai *primer* di legarsi

alle estremità delle sequenze bersaglio e alla DNA-polimerasi di sintetizzare i filamenti complementari.

- *Primer*: due oligonucleotidi a singolo filamento complementari rispettivamente all'estremità 3' e 5' della sequenza target, definiti senso e antisenso, che fungono da innesco per l'attività della polimerasi.
- Soluzione tampone: soluzione acquosa salina in grado di mantenere stabile il pH della reazione.
- Deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs): monomeri necessari per la sintesi dei nuovi filamenti di DNA.
- Cofattore $MgCl_2$: il cloruro di magnesio agisce come cofattore della polimerasi, influenzando sia l'efficienza dell'enzima sia la specificità dell'appaiamento dei primer. La concentrazione di Mg^{2+} deve essere accuratamente ottimizzata, poiché un eccesso o una carenza può compromettere la specificità della reazione.

La reazione di PCR, dopo una prima fase di incubazione, si articola in cicli termici ripetuti, ciascuno dei quali comprende tre fasi fondamentali ovvero denaturazione, *annealing* ed estensione, generalmente descritte:

1. Denaturazione

- Temperatura: 95°C
- Separazione dei due filamenti di DNA stampo
- Rottura dei legami a idrogeno tra le basi azotate complementari

2. *Annealing*

- Temperatura: 55–65°C
- Appaiamento dei *primer* alle sequenze complementari sui filamenti singoli di DNA

3. Estensione

- Temperatura: 68–72°C
- Attività della TAQ polimerasi la quale catalizza l'aggiunta di dNTPs complementari al filamento stampo, sintetizzando nuovi filamenti di DNA partendo dai *primer*

La PCR permette un'amplificazione esponenziale del DNA, pertanto, al termine del processo di amplificazione si otterranno 2^n copie di DNA, dove n rappresenta il numero di cicli termici ripetuti [29].

1.6 Tecniche di analisi del DNA

L'analisi del DNA in genetica forense ha come obiettivo l'ottenimento di un profilo genetico ove possibile informativo. I laboratori operano secondo linee guida nazionali ed internazionali che mirano a garantire coerenza metodologica, qualità analitica, validazione delle procedure e interpretazione rigorosa dei risultati. In Italia tali indicazioni sono elaborate dal Gruppo Genetisti Forensi Italiani (Ge.F.I.), che integra e armonizza le raccomandazioni internazionali con le esigenze normative e giudiziarie locali. Il Ge.F.I. lavora in stretta collaborazione con istituzioni forensi nazionali e con le linee guida dell'*International Society for Forensic Genetics* (ISFG) e di altri gruppi internazionali come lo *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* (SWGDAM), e l'*European Network of Forensic Science Institutes* (ENFSI), per definire standard condivisi sulla conduzione delle analisi genetiche forensi.

Secondo queste linee guida, il flusso di lavoro per l'analisi del DNA in genetica forense è definito in una sequenza di fasi analitiche ordinate e rigorose [30,31].

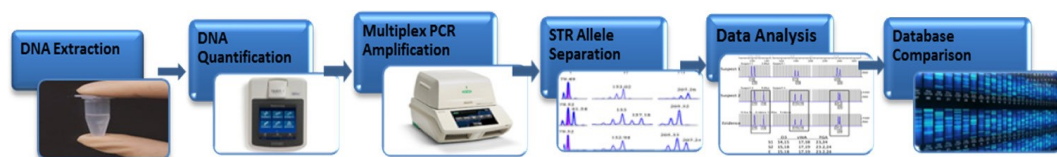


Figura 7: Schema del workflow analitico delle tecniche di analisi del DNA. Nwawuba Stanley, U., Mohammed Khadija, A., Bukola, A.T., Omusi Precious, I., & Ayeubomwan Davidson, E. (2020). *Forensic DNA Profiling: Autosomal Short Tandem Repeat as a Prominent Marker in Crime Investigation. The Malaysian Journal of Medical Sciences*.

La seguente Tabella 1 illustra le fasi sequenziali del processo, i metodi analitici impiegati e le principali criticità tecniche:

Tabella 1: Workflow analitico per l'analisi del DNA

Flusso di Lavoro per l'Analisi del DNA in Genetica Forense			
FASE	OPERAZIONI PRINCIPALI	ESEMPI di METODI / TECNOLOGIE DESCRITTE	PROBLEMATICHE / CRITICITÀ
RACCOLTA e CAMPIONAMENTO	Repertazione di tracce biologiche (sangue, sperma, saliva, capelli, ecc.); tracciabilità del reperto attraverso la catena di custodia; imballaggio e trasporto	Condotto mediante strumenti specificamente destinati alla raccolta forense, quali tamponi, superfici adesive, pinzette, bisturi o altri dispositivi sterili	Contaminazione da contatto; degradazione a causa di condizioni ambientali avverse (come umidità e calore)
ESTRAZIONE	Lisi cellulare; separazione degli acidi nucleici dalle proteine e dagli altri componenti; purificazione	Estrazione con <i>Chelex100®</i> (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA); estrazione basata su matrici di silice e su biglie magnetiche	Co-estrazione di inibitori della PCR (gruppo Erme; acidi umici ecc.)
QUANTIFICAZIONE	Determinazione della concentrazione di DNA umano disponibile nel campione	Analisi spettrofotometrica; SYBR Green™; <i>real-time PCR</i> (qPCR) con sonde <i>TaqMan™</i>	Metodi non qPCR non specifici per DNA umano; troppo o troppo poco DNA compromette il profilo STR
AMPLIFICAZIONE PCR	Tecnica finalizzata alla generazione di un numero estremamente elevato, fino a miliardi di copie, di specifiche regioni di DNA <i>target</i>	Termociclatori che consentono l'incubazione dei reagenti a temperature controllate e programmate.	Presenza di inibitori; amplificazione preferenziale di alleli in presenza di DNA degradato
SEQUENZIAMENTO	Consente di ottenere i dati grezzi necessari alla costruzione del profilo genetico	Nei sequenziatori moderni (NGS), la tecnica di riferimento è rappresentata dall'elettroforesi capillare	Presenza di bolle d'aria nel campione; necessità di calibrazione con matrice spettrale
INTERPRETAZIONE	Calcolo della probabilità di corrispondenza casuale; valutazione della forza probatoria del profilo genetico	Indici di valutazione statistica e software di calcolo	Campioni misti complicano il calcolo; risultato inconclusivo se dati insufficienti

Fonte: Butler, J.M., *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Academic Press, 2010

Questi passaggi metodologici non sono rigidi ma devono essere contestualizzati sulla base del tipo di traccia biologica, della qualità e quantità di DNA recuperato e delle condizioni del caso specifico, pur mantenendo un elevato livello di standardizzazione e trasparenza. L'obiettivo comune, secondo Ge.F.I. e ISFG, è garantire che i risultati siano scientificamente validi, riproducibili e difendibili in sede giuridica, rispettando sia i principi della biologia molecolare forense sia le esigenze procedurali di accuratezza e affidabilità [32].

1.6.1 La catena di custodia

La catena di custodia definisce il sistema integrato di procedure documentali e operative finalizzato a garantire integrità, tracciabilità e ammissibilità probatoria dei reperti biologici, dalla scena del crimine alla conclusione dell'*iter* analitico di laboratorio, sino alla loro presentazione in sede giudiziaria. Essa consiste in una documentazione continua che traccia ogni fase di gestione del reperto, assicurando la corrispondenza verificabile tra il campione originario e i dati ottenuti. L'integrità del campione dev'essere assicurata sin dalla fase di sopralluogo: raccolta impropria, conservazione inadeguata del campione o sua contaminazione costituiscono elementi suscettibili che possono compromettere la validità delle analisi del DNA in sede dibattimentale. Generalmente, la tracciabilità intra-laboratorio è gestita mediante sistemi LIMS (*Laboratory Information Management System*), che assicurano la registrazione elettronica del ciclo di vita di ciascun campione, il tracciamento automatizzato nelle fasi di estrazione, quantificazione, amplificazione ed elettroforesi, e la produzione di fascicoli digitali.

Il prelievo del materiale biologico può includere diversi substrati: fluidi corporei, tessuti molli, matrici mineralizzate o cheratinizzate, nonché superfici o oggetti sui quali sia presente una traccia biologica suscettibile ad analisi genetica [30]. Successivamente al recupero, il reperto è collocato in contenitori idonei a preservarne le caratteristiche macroscopiche e le componenti molecolari di interesse — provette, contenitori sigillabili, sacchetti in materiale plastico o scatole in cartone, queste ultime preferibili per campioni umidi poiché favoriscono la dispersione dell'acqua residua e limitano la proliferazione microbica — garantendo l'integrità del reperto durante il trasporto e la continuità della catena di custodia fino alla consegna al laboratorio [32].

I laboratori forensi accreditati sono tenuti al rispetto di procedure documentate, sottoposte a ispezione periodica da parte di organismi terzi, che garantiscono l'integrità e la tracciabilità del reperto dall'acquisizione alla refertazione. La solidità della catena di custodia costituisce dunque un requisito imprescindibile per l'ammissibilità e l'affidabilità delle evidenze biologiche in ambito giudiziario [8].

1.6.2 Individuazione, caratterizzazione preliminare delle tracce biologiche e prelievo

L'individuazione e la caratterizzazione preliminare delle tracce biologiche si basano sull'integrazione di tecniche fisiche e chimico-biologiche finalizzate all'identificazione e selezione dei reperti di interesse. In tale contesto, un ruolo centrale è rivestito dalle fonti di luce forensi, le quali sfruttano specifiche bande dello spettro elettromagnetico per evidenziare tracce latenti

mediante fenomeni di interazione luminosa quali fluorescenza, assorbimento e illuminazione obliqua. Numerosi fluidi biologici presentano infatti una fluorescenza naturale che ne consente la rilevazione esclusivamente attraverso tali dispositivi, i quali permettono altresì una documentazione fotografica accurata e una raccolta mirata dei campioni. A titolo esemplificativo, il liquido seminale emette fluorescenza in un intervallo compreso tra 200 e 600 nanometri, con picchi di emissione caratteristici nella regione UV-visibile riconducibili alla presenza di flavine e metaboliti del triptofano; analogamente, saliva, urina e siero presentano “firme” spettrali specifiche che consentono, mediante analisi chemiometrica, la discriminazione tra i diversi fluidi biologici [7].

Una volta individuate le potenziali tracce, la fase di caratterizzazione preliminare si avvale di *test* presuntivi. Tali saggi devono rispondere ad alcuni requisiti tra cui: rapidità di esecuzione, economicità e compatibilità con le successive analisi genetiche. Nell’ambito della ricerca di sangue, i *test* catalitici sfruttano l’attività perossidasi del gruppo eme (come ad esempio *Combur Test®*, *Roche Diagnostics*), dando luogo a reazioni colorimetriche o chemiluminescenti; tra questi, il *test* al luminol risulta particolarmente efficace per l’individuazione di tracce latenti, pur presentando limiti legati alla possibile insorgenza di falsi positivi e a specifiche condizioni operative. A tali metodiche si affiancano test immunocromatografici specifici per l’emoglobina umana, che consentono una prima distinzione di specie.

Per quanto concerne la saliva, la rilevazione si basa prevalentemente sull’identificazione dell’enzima α -amilasi mediante saggi di tipo colorimetrico o immunologico; tuttavia, la presenza dell’enzima anche in altri fluidi biologici ne limita il valore confermativo, mantenendo tali *test* nell’ambito delle indagini orientative. In maniera analoga, l’individuazione dello sperma prevede una combinazione di osservazione mediante fonti luminose forensi e l’impiego di *test* biochimici per enzimi specifici, quali la fosfatasi acida prostatica e l’antigene prostatico specifico, cui fanno seguito analisi citologiche e immunoistochimiche di conferma, comprendenti la ricerca di spermatozoi o di proteine caratteristiche come PSA e semenogelina.

Nel complesso, la fase preliminare di analisi delle tracce biologiche rappresenta un passaggio cruciale nell’ambito dell’indagine forense, in quanto consente di operare una selezione critica dei reperti, orientare le successive indagini e contribuire in parte alla ricostruzione della dinamica degli eventi [7,20].

Identificata la traccia di interesse, si procede al prelievo scegliendo la metodica più appropriata in funzione della tipologia di superficie e della natura del materiale biologico. Per le superfici

non rimovibili, per il prelievo di materiale cellulare è possibile l'impiego di tamponi in cotone e di tamponi floccati in *nylon*. Questi ultimi favoriscono un rilascio più efficiente delle cellule durante la fase estrattiva, producendo una resa di DNA superiore rispetto ai tamponi in fibra di cotone. Alternativamente è possibile procedere al prelievo di un frammento di tessuto del materiale da sottoporre direttamente ad estrazione [20].

1.6.3 L'estrazione

L'obiettivo principale di questa fase consiste nell'isolamento del DNA dalle componenti cellulari ed extracellulari presenti nei campioni biologici, garantendo al contempo la rimozione di proteine, lipidi e potenziali inibitori che potrebbero interferire con le reazioni enzimatiche successive. La complessità del materiale biologico che varia per tipologia di tessuto, substrato, quantità di DNA e stato di conservazione rende l'estrazione un processo delicato e critico per la validità dei risultati.

Ad oggi, sono riconosciute diverse metodologie di estrazione, scelte in base alla natura e allo stato dei campioni. Tra le tecniche storicamente impiegate [33] vi è il metodo con *Chelex100®* (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*), una resina a scambio ionico che lega ioni metallici come Mg^{2+} , necessari all'attività delle nucleasi, impedendo così la degradazione del DNA durante la preparazione del lisato. Il protocollo prevede la lisi cellulare e il trattamento termico, che liberano il DNA in soluzione. Questo approccio, sebbene semplice e rapido, produce tipicamente DNA a singolo filamento e può presentare variabilità nella resa a seconda della tipologia del campione, risultando meno indicato per materiali degradati o per la conservazione a lungo termine.

Per ottenere DNA di elevata qualità e quantità, i laboratori forensi hanno progressivamente adottato metodi basati su matrici di silice e su biglie magnetiche [34]: nel primo caso, il DNA liberato durante la lisi cellulare si lega selettivamente alla superficie della matrice in presenza di sali caotropici e alcool. Questo legame consente di rimuovere efficacemente contaminanti attraverso lavaggi successivi, mentre gli acidi nucleici possono essere successivamente rilasciati mediante eluizione in un buffer appropriato, ottenendo DNA puro e adatto alla PCR e alla tipizzazione STR. Nel secondo caso, le biglie magnetiche sfruttano particelle rivestite con leganti chimici specifici che attraggono e trattengono il DNA in condizioni di pH e sali definiti. La separazione dalle componenti indesiderate avviene tramite applicazione di un campo magnetico, permettendo la rimozione del surnatante contenente proteine, lipidi e inibitori, e facilitando successivi lavaggi e l'eluizione finale del DNA. Questo approccio risulta

particolarmente efficace per l'automazione dei processi di laboratorio, incrementando la riproducibilità, riducendo la manipolazione manuale e il rischio di contaminazione crociata.

La scelta della metodologia di estrazione viene determinata da vari fattori, tra cui la tipologia del campione, il grado di degrado del DNA e la necessità di integrare il protocollo in flussi di lavoro automatizzati [35].

1.6.4 La Quantificazione

Si procede quindi con le successive analisi volte alla determinazione quantitativa e qualitativa. Risulta infatti essenziale effettuare la quantificazione al fine di comprendere la reale concentrazione del campione e consentire l'utilizzo della quantità *target* ottimale per lo svolgimento della successiva reazione di PCR.

La quantificazione può essere effettuata tramite diverse tecniche. Fra quelle di maggiore impiego vi sono l'analisi spettrofotometrica UV/VIS, l'unica non distruttiva, fluorimetrica e la *real-time PCR* [8]. Le prime due forniscono un dato grezzo ed approssimativo, seppur l'impiego del fluorimetro conduce a risultati più attendibili. La loro imprecisione deriva dal meccanismo molecolare su cui si basa l'analisi. Difatti, nel caso dello spettrofotometro, la rilevazione avviene grazie alla capacità di assorbire la luce a 260nm da parte degli anelli benzenici che contraddistinguono le basi azotate degli acidi nucleici. Tuttavia, questo assorbimento può includere altre molecole che assorbono alla medesima lunghezza d'onda, ma soprattutto non discrimina fra le basi azotate di organismi differenti, comprese quelle dei numerosi microrganismi presenti nei reperti biologici. Quest'ultimo rappresenta lo svantaggio di maggior peso, a causa del quale spesso si verifica un'abbondante sovrastima del DNA contenuto nel campione.

La *Real-time PCR* è una PCR di tipo quantitativo che monitora, ciclo dopo ciclo, le variazioni del segnale fluorescente generate durante il processo di amplificazione. La stima della concentrazione iniziale dell'estratto avviene in corrispondenza della fase esponenziale della reazione.

L'analisi strumentale della *Real-time PCR* si basa su un parametro denominato *Cycle threshold* (Ct), definito come il ciclo di amplificazione in cui il segnale fluorescente supera una soglia prestabilita, fissata al di sopra del segnale di fondo (*baseline*) rilevato nelle fasi iniziali della reazione, quando la concentrazione di prodotto amplificato è ancora troppo esigua per essere distinta dal rumore strumentale. Il valore di Ct è inversamente proporzionale alla concentrazione iniziale di DNA presente nel campione: a una concentrazione iniziale elevata corrisponde un numero ridotto di cicli necessari al raggiungimento della soglia, e quindi un Ct basso, viceversa, un Ct elevato indica una bassa concentrazione iniziale dell'estratto.

Un elemento fondamentale per la quantificazione del DNA mediante *Real-time PCR* è la costruzione di una curva standard, ottenuta mediante l'analisi di campioni a concentrazione nota sottoposti alla medesima reazione di amplificazione. Tale curva rappresenta la relazione tra il valore di C_t e il logaritmo della concentrazione iniziale del DNA. In condizioni ideali, questa relazione è lineare e consente di stabilire un modello di riferimento matematico per la quantificazione dei campioni ignoti. La retta standard permette quindi di convertire il valore di C_t ottenuto per un campione sconosciuto in una stima quantitativa della concentrazione iniziale di DNA, assumendo che le condizioni di amplificazione siano comparabili tra standard e campioni. La validità della quantificazione dipende strettamente dall'efficienza della reazione e dal mantenimento di una relazione lineare tra il valore di C_t e la concentrazione iniziale di DNA, che deve essere verificata per garantire l'affidabilità del sistema analitico.

Esistono diversi approcci per l'esecuzione della *real-time PCR*; tra i più diffusi si annovera l'impiego di sonde marcate che emettono fluorescenza a diversa lunghezza d'onda, come le sonde *TaqMan*TM, oppure l'utilizzo di coloranti specifici per DNA a doppio filamento, come *SYBR Green*TM. Nel primo caso la sonda si ibridizza in maniera altamente specifica alla regione *target* tra i *primers*, mentre nel secondo il segnale fluorescente viene generato in presenza di qualsiasi prodotto a doppio filamento di PCR, inclusi eventuali dimeri di *primers* o amplificazioni aspecifiche.

Le sonde *TaqMan*TM sono costituite da un oligonucleotide specifico alle cui estremità sono legati un fluoroforo *reporter* (R) in posizione 5' e un *quencher* (Q) in posizione 3'. Uno dei due fluorofori agisce come donatore (R), mentre l'altro funge da accettore (Q); quando lo spettro di emissione del donatore si sovrappone a quello di assorbimento dell'accettore e le due molecole sono in stretta prossimità, l'energia viene trasferita senza emissione di luce da parte del donatore. Questo fenomeno è noto come FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Di conseguenza, finché la sonda rimane integra e il *reporter* è in prossimità del *quencher*, il segnale fluorescente risulta soppresso.

Durante la fase di estensione, l'attività esonucleasica 5'→3' della DNA polimerasi determina la degradazione della sonda ibridata alla sequenza bersaglio, consentendo il rilascio del fluoroforo *reporter* che, libero dal legame del *quencher*, può emettere fluorescenza rilevabile strumentalmente

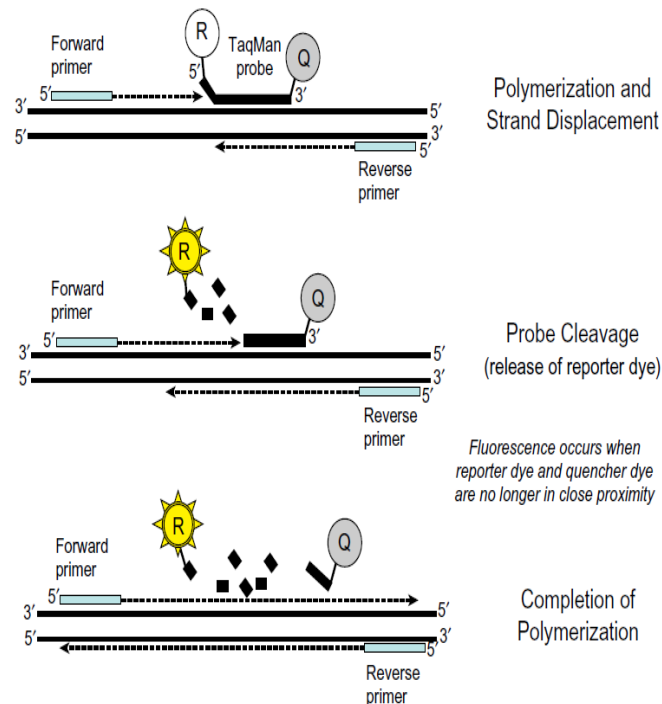


Figura 8: Meccanismo della qPCR con sonda TaqMan. Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. 2nd ed. revised. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2015.

In ambito forense sono attualmente disponibili diversi *kit* commerciali per la quantificazione del DNA genomico basati sulla tecnologia *TaqMan*TM che consentono la quantificazione del DNA umano e dell'eventuale componente maschile.

Nel complesso, la Real-time PCR costituisce attualmente la metodologia più accurata e sensibile per la quantificazione del DNA in campioni destinati ad analisi successive di biologia molecolare [7,8].

1.6.5 L'Amplificazione

La successiva fase di amplificazione rappresenta una fase analitica fondamentale, finalizzata alla generazione di un numero estremamente elevato, fino a miliardi di copie, di specifiche regioni di DNA *target*. Tale processo viene effettuato mediante la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) precedentemente descritta [36] ed eseguita all'interno di appositi strumenti denominati termociclatori, i quali consentono l'incubazione dei reagenti a temperature controllate e programmate per specifici intervalli di tempo.

Considerata la necessità di analizzare simultaneamente numerosi polimorfismi genetici STRs, l'amplificazione viene eseguita mediante una *PCR multiplex*. Il termine *multiplex* indica una reazione di co-amplificazione di più loci genetici, per ciascuno dei quali è prevista una specifica coppia di *primers*. In ambito forense vengono comunemente utilizzati *kit* commerciali

standardizzati e validati, progettati per l'amplificazione simultanea di un elevato numero di marcatori STR. I sistemi inizialmente introdotti consentivano l'analisi di almeno 13 loci STR, mentre i *kit* di più recente sviluppo permettono la co-amplificazione di circa 30 marcatori genetici all'interno della medesima reazione analitica [37]. Tuttavia, l'analisi contemporanea di un elevato numero di microsatelliti risulta impraticabile qualora venga impiegato un unico segnale di rivelazione per tutti i marcatori, poiché la sovrapposizione delle dimensioni dei frammenti impedirebbe una discriminazione efficace degli STRs di lunghezza simile. Per ovviare a tale limitazione, i *primers* associati a marcatori che presentano una sovrapposizione dimensionale vengono marcati con fluorocromi differenti, in grado di emettere fluorescenza a diverse lunghezze d'onda quando opportunamente eccitati. Ne consegue che il segnale generato risulta discriminabile dal punto di vista spettrometrico, pur non essendolo in termini dimensionali. Questo approccio è definito analisi multicolore, nella quale sono generalmente presenti cinque o più canali di emissione, ciascuno corrispondente a un diverso fluorocromo impiegato. In tal modo, i fluorofori consentono di evidenziare gruppi di marcatori non sovrapposti, rendendoli indipendenti e rilevabili dall'unità ottica del sequenziatore.

Un aspetto cruciale ai fini dell'affidabilità analitica è rappresentato dall'inclusione, in ogni corsa di PCR, di un controllo positivo e di un controllo negativo. Entrambi i controlli vengono trattati in modo del tutto analogo ai campioni in esame e contengono tutti i reagenti precedentemente elencati. La differenza rispetto ai campioni analizzati risiede esclusivamente nella natura del DNA stampo aggiunto: nel controllo positivo viene impiegata un'aliquota di acido nucleico standard a tipizzazione nota, fornita con il *kit* commerciale utilizzato, mentre nel controllo negativo l'estratto di DNA viene sostituito con acqua sterile di grado molecolare. L'impiego di tali controlli consente di verificare il corretto funzionamento dei reagenti e della strumentazione, nonché di escludere la presenza di eventuali contaminazioni [8].

1.6.6 Sequenziamento

Il sequenziamento, nella tipizzazione dei marcatori STR, prende il nome di analisi di frammenti. Gli STR sono polimorfismi di lunghezza e il segnale rilevato è correlato al numero di unità ripetute presenti in ciascun allele: la lunghezza dei frammenti amplificati, espressa in paia di basi, costituisce il parametro analitico rilevante.

La separazione dei prodotti di amplificazione ottenuti dalla PCR sfrutta la proprietà del DNA di possedere carica negativa sui gruppi fosfato dello scheletro: in presenza di un campo elettrico, i frammenti migrano verso il polo positivo attraversando un setaccio molecolare,

costituito da una soluzione polimerica, che ne rallenta la migrazione in maniera differenziale in funzione delle loro dimensioni. L'elettroforesi capillare utilizza un capillare in silice fusa per garantire la migrazione di differenza di potenziale e rappresenta la tecnica attualmente in grado di garantire elevata capacità di risoluzione, ed è, pertanto, quella di riferimento nella pratica forense contemporanea [38].

La rilevazione dei frammenti avviene mediante fluorescenza: il segnale emesso dai fluorocromi, eccitati da un laser posto in prossimità dell'estremità anodica, viene registrato da un rilevatore attraverso una finestra — presente nel punto in cui manca il rivestimento esterno del capillare. Il rilevatore è costituito da una fotocamera CCD (*Charged-Coupled Device*) in grado di rilevare la lunghezza d'onda della luce emessa dal fluorocromo eccitato.

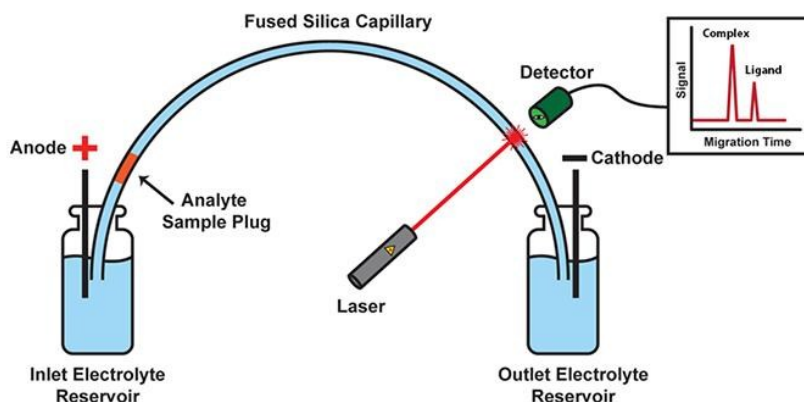


Figura 9: Schema del principio di funzionamento dell'elettroforesi capillare per l'analisi del DNA. Sawant RC, Somkuwar SR, Luo SY, Kamble RB, Panhekar DY, Bhorge YR, Chaudhary RR, Kader SA. *Novel extraction and characterization methods for phytochemicals*. In: Pati S, Sarkar T, Lahiri D, editors. *Recent Frontiers of Phytochemicals: Applications in Food, Pharmacy, Cosmetics and Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier; 2023.

Il risultato di tale processo è la formazione di gruppi di STRs. I segnali ottenuti, rappresentati graficamente sotto forma di picchi colorati, sono ordinati in base alla lunghezza crescente dei frammenti. Questi dati grezzi richiedono un'elaborazione informatica per poter essere associati ai rispettivi alleli. Tale conversione viene effettuata mediante *software* dedicati, che producono un grafico finale denominato elettroferogramma.

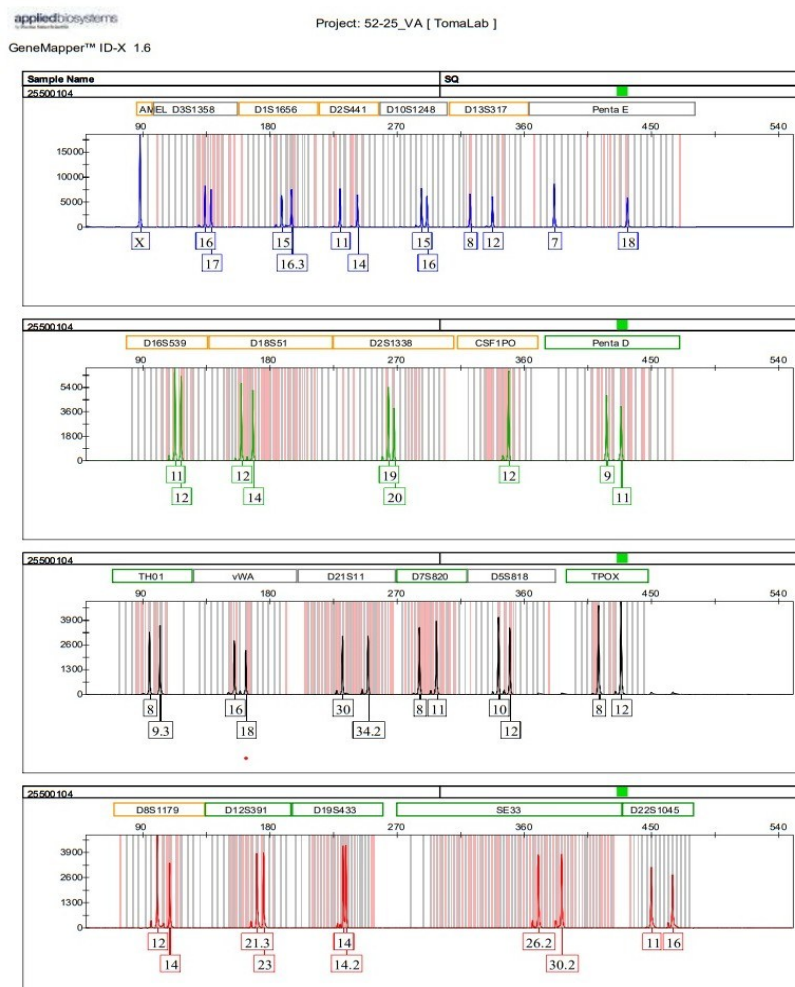


Figura 10: Elettroferogramma ottenuto mediante analisi capillare di un campione di DNA umano generato mediante analisi con il software GeneMapper™ ID-X versione 1.6 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)

Poiché l'elettroforesi è un metodo di misura relativo e non assoluto, la stima della taglia degli alleli richiede il confronto con sistemi di riferimento standardizzati. Essi sono rappresentati rispettivamente dal *size standard* e dall'*allelic ladder*.

Più nel dettaglio, con *size standard* o *standard* interno, ci si riferisce ad una miscela di frammenti di DNA a lunghezza nota marcati con un unico fluorocromo dedicato, aggiunta al campione di analisi. Esso è utilizzato per determinare la lunghezza degli STRs ignoti presenti all'interno del campione di riferimento.

L'*allelic ladder* invece è una collezione standardizzata di frammenti di DNA di lunghezze note, ciascuno rappresentante un allele specifico di un determinato locus STR, analizzato congiuntamente al campione di interesse. Questi frammenti sono selezionati per includere gli alleli più comuni dei loci presenti nei diversi *kit*. L'*allelic ladder* funge da riferimento universale, consentendo al *software* di analisi di assegnare correttamente il numero di ripetizioni a ciascun

picco osservato e permette quindi la nomina allelica attraverso la sovrapposizione dei segnali fluorimetrici dei picchi elaborati tramite il *size standard* [8,20].

Sotto ciascun picco sono riportati due valori numerici:

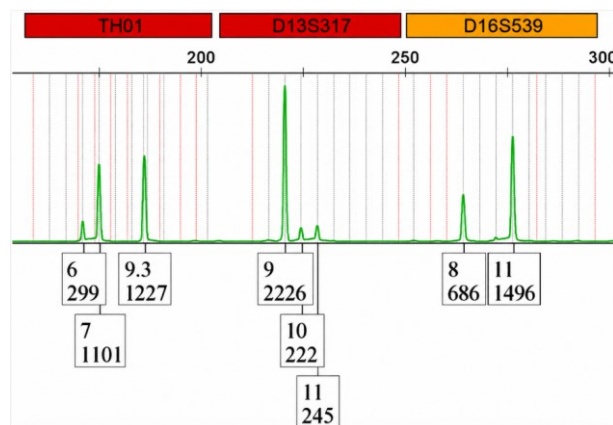


Figura 11: Elettroferogramma relativo a tre loci STR (TH01, D13S317, D16S539). Sotto ciascun picco sono riportati due valori numerici: ad esempio, per il locus TH01 il valore "6 / 299" indica che l'allele è 6 (numero di ripetizioni dell'unità nucleotidica) e l'intensità massima del picco è 299 RFU (Unità di Fluorescenza Relativa). Il profilo mostra tre alleli per TH01 (6, 7, 9.3), tre per D13S317 (9, 10, 11) e due per D16S539 (8, 11). Buckleton JS, Bright J-A, Taylor D, editors. *Forensic DNA Evidence Interpretation*. 1st edition Boca Raton: CRC Press; 2016.

- il primo indica l'allele, determinato in base al numero di ripetizioni dell'unità nucleotidica
- il secondo rappresenta l'intensità massima del segnale, espressa in *Relative Fluorescence Units* (RFU). Le RFU costituiscono l'unità di misura delle ordinate, mentre sull'asse delle ascisse è riportata la lunghezza dei frammenti in paia di basi, ordinata in modo crescente. In questo modo, gli STRs più corti compaiono nella parte sinistra dell'elettroferogramma, mentre quelli più lunghi nella parte destra.

Quando il DNA proviene da un singolo individuo, ogni marcatore autosomico presenta due alleli. In caso di omozigosi al locus considerato, si osserva un unico picco di maggiore altezza, mentre in caso di eterozigosi compaiono due picchi distinti, ciascuno con altezza inferiore rispetto al picco unico in omozigosi.

Nei profili di DNA derivanti da contributori multipli è comune osservare più di due alleli per singolo locus [39].

1.7 Degradazione del DNA nucleare

La degradazione del DNA nucleare rappresenta una delle sfide più rilevanti nell'ambito dell'analisi forense del materiale biologico, in quanto compromette direttamente la qualità la quantità e conseguentemente la completezza dei profili genetici ottenibili dai reperti. Il DNA è una molecola chimicamente reattiva, la cui struttura primaria è suscettibile di alterazioni attraverso

molteplici meccanismi: reazioni chimico-fisiche a carico delle basi azotate e processi di lisi enzimatica che determinano la frammentazione della doppia elica. Questo fenomeno è particolarmente evidente nei campioni forensi complessi, nei quali il materiale genetico può risultare danneggiato per effetto del decadimento spontaneo dei tessuti *post-mortem*, di una conservazione non ottimale o dell'esposizione prolungata a condizioni ambientali sfavorevoli.

Tra i principali agenti degradativi endogeni si annoverano le nucleasi, enzimi che idrolizzano i legami fosfodiesterici tra nucleotidi e si distinguono in esonucleasi, che operano alle estremità della molecola, ed endonucleasi, che agiscono all'interno del filamento.

Sul piano chimico, la degradazione del DNA si esplica attraverso meccanismi distinti e spesso sinergici. Il principale è l'idrolisi, processo spontaneo la cui velocità dipende da fattori quali il pH e la concentrazione di ioni calcio e magnesio, che può verificarsi sia a livello del legame N-glicosidico tra la base azotata e lo zucchero desossiribosio — con formazione di siti apurinici o apirimidinici (AP) — sia a livello del legame fosfodiesterico tra nucleotidi adiacenti, con conseguente rottura della doppia elica. La presenza di siti AP può indurre il fenomeno del *jumping PCR*, nel quale la Taq polimerasi salta da un filamento danneggiato a un altro generando alleli chimera, ossia artefatti di reazione che non corrispondono ad alcun allele biologicamente reale dell'individuo, ma che possono apparire nel profilo come se lo fossero. Il danno ossidativo rappresenta un'ulteriore categoria di modificazioni chimiche: radicali derivati dall'ossigeno, come il superossido e il perossido di idrogeno, generati da radiazioni ionizzanti o dal metabolismo di microrganismi aerobici, danneggiano prevalentemente le pirimidine attraverso processi di deaminazione [40].

L'irradiazione ultravioletta, ad esempio per esposizione diretta alla luce solare, promuove invece la formazione di dimeri di ciclobutano tra basi adiacenti, con conseguente *cross-linking* che impedisce il transito della polimerasi durante la PCR.

Nei campioni forensi è frequente la copresenza di sostanze inibitorie estratte insieme al DNA, tra cui emoglobina, melanina, collagene, polisaccaridi complessi e alcuni coloranti tessili. Questi inibitori possono interferire con la lisi cellulare durante l'estrazione, legarsi al DNA degradandolo ulteriormente o impedire il corretto funzionamento della Taq polimerasi determinando amplificazioni incomplete.

Affinché la PCR vada a buon fine, il filamento stampo deve essere integro in tre punti distinti: nel sito di legame del *primer forward*, del *primer reverse*, e nell'intera regione compresa tra i due. Una singola rottura in qualsiasi punto di questa sequenza è sufficiente a bloccare

l'estensione della polimerasi, rendendo il template non amplificabile. Non esiste un meccanismo di riparazione durante l'amplificazione. Pertanto, la probabilità di amplificazione è inversamente proporzionale alla lunghezza dell'amplicone: all'aumentare della sequenza bersaglio aumenta proporzionalmente l'estensione del filamento stampo che deve risultare privo di interruzioni.

In presenza di DNA degradato, questo comportamento si manifesta chiaramente come una diminuzione progressiva dei segnali degli ampliconi più lunghi rispetto a quelli più corti durante l'analisi tramite elettroforesi capillare, fenomeno noto come *ski slope effect* (Figura 12). Nell'elettroferogramma, i picchi relativi ai frammenti più corti risultano alti e ben definiti, mentre quelli dei frammenti più lunghi mostrano un progressivo abbassamento dell'altezza dei picchi (RFU) o possono addirittura non comparire. Questo profilo caratteristico crea una sorta di "pendenza" visibile da sinistra verso destra che ricorda idealmente la pendenza di una discesa su una pista da sci, da qui il termine *ski slope effect*. Esso costituisce un indicatore affidabile di DNA degradato, pur in presenza di un'amplificazione complessivamente efficiente [41,42].

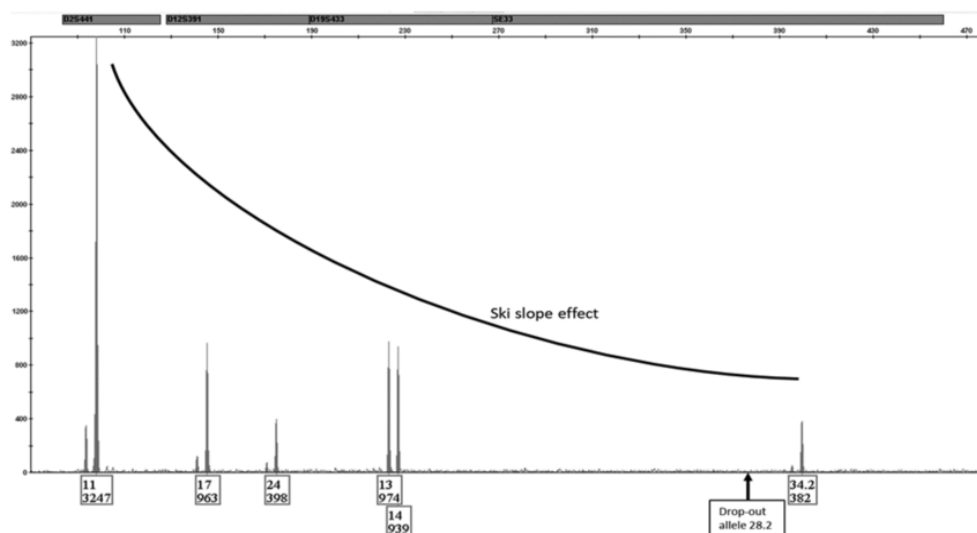


Figura 12: Esempio di *ski slope effect* in un elettroferogramma STR: la degradazione del DNA provoca la frammentazione della molecola, determinando una minore efficienza di amplificazione degli ampliconi più lunghi rispetto a quelli più corti. Schulze Johann K, Bauer H, Wiegand P, Pfeiffer H, Vennemann M. Detecting DNA damage in stored blood samples (2023).

1.8 Effetti stocastici

La qualità e la completezza del profilo genetico STR dipendono in misura critica dallo stato del materiale genetico in ingresso e dall'efficienza della reazione di amplificazione. Degradazione del DNA, presenza di inibitori della PCR e insufficiente quantità di template rappresentano le principali cause di insuccesso analitico, con ricadute dirette sulle fasi di quantificazione e amplificazione, ovvero i passaggi del *workflow* in cui le proprietà qualitative e quantitative del

DNA risultano determinanti per l'interpretabilità del profilo. Queste condizioni si traducono nell'elettroferogramma in una serie di artefatti riconducibili a due categorie distinte per origine e meccanismo: effetti stocastici, associati a basse concentrazioni di DNA, e artefatti correlati a eccesso di DNA o alle caratteristiche fisiche della strumentazione.

Quando la concentrazione di DNA disponibile scende al di sotto di circa 100 picogrammi [7,8] la PCR diventa suscettibile di fluttuazioni stocastiche, ovvero di campionamenti asimmetrici dei due alleli presenti in un individuo eterozigote. In tali condizioni possono manifestarsi fenomeni come:

- L'allele *drop-out*, che consiste nella mancata amplificazione di uno dei due alleli di un locus eterozigote, con conseguente comparsa di un profilo apparentemente omozigote. Il profilo risultante non consente di distinguere la vera omozigosi dalla falsa omozigosi, introducendo un'incertezza interpretativa. Si osserva inoltre
- L'allele *drop-in*, cioè la comparsa nell'elettroferogramma di alleli spuri, non appartenenti al profilo del donatore.
- Gli *stutter* che costituiscono gli artefatti di origine biologica più frequenti e sono presenti indipendentemente dalla concentrazione di DNA. Originano da un meccanismo di slittamento e appaiamento erroneo (*slipped-strand mispairing*) a livello della regione ripetuta durante la reazione di PCR: uno dei due filamenti va incontro a sfasamento tale che una ripetizione rimane non appaiata, producendo un amplicone più corto di una unità ripetitiva rispetto all'allele principale.

Ulteriori effetti, in questo caso correlati ad un'eccessiva quantità di DNA sono:

- *pull-up peaks* si manifestano quando la concentrazione di DNA è eccessiva e l'intensità di fluorescenza emessa da un allele supera la capacità di risoluzione spettrale del *software* di analisi, generando picchi nei canali di rilevazione degli altri fluorocromi, alla medesima posizione dimensionale dell'allele causante.
- I picchi sdoppiati (*split peaks*) derivati da un'adenilazione incompleta degli ampliconi. La Taq polimerasi aggiunge normalmente un residuo di adenina all'estremità 3' del prodotto di PCR, producendo la forma +A, che risulta un paio di basi più lunga rispetto alla forma -A (priva dell'adenina). Quando tale processo è parziale coesistono nell'elettroferogramma le forme +A e -A dello stesso allele come due picchi adiacenti, impedendo una corretta attribuzione allelica [43].

Appare quindi evidente ed essenziale definire la quantità di *input* di DNA per minimizzare qualsiasi effetto stocastico che possa compromettere l'interpretazione del profilo genetico.

1.9 Indici di valutazione statistica e *software* di calcolo

L'identificazione forense attraverso l'analisi del DNA non si esaurisce nella verifica della corrispondenza tra il profilo genetico di un sospettato e quello estratto da una traccia biologica. Una corrispondenza, di per sé, non dice quanto sia probabile che si tratti di una coincidenza casuale: due profili che risultano identici potrebbero corrispondere perché appartengono alla stessa persona, ma anche, seppur con probabilità molto bassa, perché due individui distinti condividono per caso gli stessi alleli ai loci analizzati [44,45]. Per rispondere rigorosamente a questa domanda è necessario passare da una valutazione puramente qualitativa, basata sulla presenza o assenza di corrispondenza, a una valutazione quantitativa, che traduca la corrispondenza osservata in una misura numerica del suo peso probatorio.

Il potere discriminante dei marcatori STR dipende dall'elevata variabilità allelica che caratterizza questi loci: ciascun locus può presentare numerosi alleli distinti, la cui frequenza varia in funzione della comunità etnica e geografica di riferimento [44].

La stima delle frequenze genotipiche si fonda sul principio dell'equilibrio di *Hardy Weinberg* (HWE) ossia un modello teorico che descrive la distribuzione attesa dei genotipi in una popolazione in assenza di forze evolutive perturbanti quali ad esempio selezione naturale, migrazione, deriva genetica e *inbreeding*. In condizioni di HWE, la frequenza attesa di un genotipo omozigote (aa) è pari al quadrato della frequenza allelica (p^2), mentre quella di un genotipo eterozigote (ab) equivale doppio del prodotto delle frequenze dei due alleli ($2p \cdot pb$): questi valori derivano dalla regola moltiplicativa (*product rule*), secondo cui la probabilità congiunta di due eventi indipendenti è pari al prodotto delle loro probabilità individuali [45]. L'assunzione di indipendenza statistica tra i loci —giustificata dalla loro distribuzione su cromosomi distinti o in *linkage equilibrium* — consente di moltiplicare le frequenze genotipiche di questi ultimi al fine di ottenere la frequenza complessiva del profilo.

Tuttavia, le popolazioni umane non sono geneticamente omogenee, esse infatti, si articolano in sottopopolazioni caratterizzate da diversa storia demografica, isolamento geografico e preferenziale endogamia generando così differenze nelle frequenze alleliche tra gruppi. Questo fenomeno, noto come struttura di popolazione, ha una conseguenza rilevante per l'analisi forense: se la banca dati di riferimento utilizzata per stimare le frequenze alleliche non rappresenta adeguatamente la comunità di origine del contribuente della traccia vi è il rischio di sovrastimare

la rarità del profilo attribuendogli un peso probatorio superiore a quello reale. Per tenere conto di questo effetto, si utilizza un parametro di correzione, indicato con la lettera greca θ (*Theta*), che misura il grado di differenziazione genetica tra i sottogruppi di una popolazione [44].

La sola stima della rarità di un profilo genetico non esaurisce il problema interpretativo: attribuire all'evidenza biologica un peso scientificamente fondato richiede un quadro logico-probabilistico capace di integrare le informazioni sperimentali con le ipotesi investigative alternative, aggiornandone il grado di plausibilità in modo coerente; a questo scopo, la genetica forense si avvale dell'approccio *bayesiano*.

$$\frac{P(H_p | E)}{P(H_d | E)} = \frac{P(H_p)}{P(H_d)} \cdot \frac{P(E | H_p)}{P(E | H_d)}$$

posterior odds prior odds likelihood ratio

Figura 13: rappresentazione del teorema di Bayes. Doyle K. *Bayes' theorem: can statistics help guide a verdict in the courtroom? ISHI Report. (2021)*

Dove:

- *Prior odds*: rapporto tra la probabilità *a priori* dell'ipotesi dell'accusa (H_p) e quella della difesa (H_d), calcolato prima di considerare qualsiasi evidenza biologica. Incorporano tutto il contesto non-biologico del caso: testimonianze, circostanze investigative, alibi, prove fisiche indipendenti dal DNA. Si tratta di un termine di natura giuridica, non scientifica
- *Likelihood ratio*: quantifica quanto i dati dell'analisi del DNA rendano più probabile l'ipotesi dell'accusa rispetto a quella della difesa
- *Posterior odds*: rapporto aggiornato di plausibilità tra le due ipotesi dopo aver incorporato l'evidenza biologica

L'LR rappresenta quindi l'unico termine del prodotto *bayesiano* che dipende esclusivamente dai dati sperimentali e può essere stimato con rigore statistico. È pertanto l'unico contributo che il genetista forense può comunicare in modo fondato, lasciando al giudice il compito di moltiplicarlo per la propria stima delle *prior odds* [46,47].

Formalmente, l'LR viene rappresentato attraverso la seguente equazione:

$$LR = \frac{P(E | Hp)}{P(E | Hd)}$$

In tale *framework*, ogni valutazione viene inquadrata attraverso due proposizioni alternative, mutualmente esclusive:

- quella sostenuta dall'accusa (Hp), secondo la quale il soggetto di interesse è il contributore della traccia biologica,
- quella sostenuta dalla difesa (Hd), per la quale la traccia proviene da un differente individuo ignoto.

Pertanto

- $P(E | Hp)$ = indica la probabilità di osservare l'evidenza E assumendo vera l'ipotesi dell'accusa.
- $P(E | Hd)$ = la probabilità della stessa evidenza assumendo vera l'ipotesi della difesa.

Ciò esprime quanto è più probabile osservare i risultati dell'analisi del DNA se il soggetto di interesse è contributore alla traccia rispetto ad altro soggetto diverso non noto.

Un LR maggiore di 1 significa che l'evidenza biologica è più compatibile con lo scenario accusatorio; un LR inferiore ad 1 supporta invece lo scenario della difesa; un LR pari ad 1 indica che l'evidenza non aiuta a distinguere tra i due scenari.

È tuttavia fondamentale precisare che l'LR non è una misura della colpevolezza del soggetto: esso quantifica esclusivamente l'evidenza biologica lasciando al giudice il compito di valutare il quadro complessivo del caso [45].

Nel caso di profili STR singoli— ovvero profili provenienti da un unico donatore — il calcolo dell'LR si basa sulla stima di quanto frequentemente quel profilo genotipico compaia nella popolazione di riferimento. Ma la casistica forense comprende sempre più frequentemente tracce miste, ovvero riferibili a più contributori. In questi casi appare dirimente l'approccio probabilistico al fine di verificare l'evidenza dei contributori. Sono disponibili due differenti approcci di *probabilistic genotyping* [42]:

- i modelli semi-continui che si basano sulla sola presenza o assenza degli alleli nella traccia, senza utilizzo dell'informazione quantitativa delle altezze dei picchi elettroforetici. Essi

incorporano esplicitamente le probabilità di *drop-out* e di *drop-in* come parametri stimabili del modello e applicano la correzione θ per la struttura di popolazione,

- i modelli continui che invece, integrano l'informazione quantitativa delle altezze dei picchi, oltre all'elaborazione algoritmica degli effetti stocastici

Lo sviluppo di *software* per l'interpretazione probabilistica dei profili STR risponde quindi all'esigenza di automatizzare calcoli complessi garantendone la riproducibilità e la conformità agli *standard* scientifici internazionali [44,45].

1.10 Storia delle impronte digitali

Lo studio delle impronte digitali, noto come dattiloscopia (dal greco δάκτυλος, dito, e σκοπέιν, guardare), rappresenta una delle tecniche di identificazione individuale più consolidate nell'ambito delle scienze forensi. Le prime testimonianze documentate del loro utilizzo risalgono al III secolo a.C., nell'antico impero cinese, dove l'imperatore *Qin Shi Hang* le impiegava per siglare documenti ufficiali [48]. Tuttavia, la sistematizzazione scientifica della disciplina è un fenomeno più recente, collocabile tra la seconda metà del XIX e l'inizio del XX secolo.

Un contributo pionieristico è attribuito a *William Herschel*, ufficiale britannico in servizio nel Bengala, che nel 1858 utilizzò per la prima volta un'impronta della mano per certificare l'autenticità di un documento. A partire dall'anno successivo, *Herschel* avviò una raccolta sistematica delle impronte di indice e pollice di conoscenti impiegandole come tecnica di autenticazione per le ricevute delle pensioni governative tra il 1877 e il 1878 [49]. Il prolungato arco temporale delle sue osservazioni gli permise di identificare una delle proprietà fondamentali delle impronte: la loro immutabilità nel tempo [50].

Parallelamente, *Henry Faulds*, medico missionario in Giappone, conduceva studi indipendenti sulle impronte digitali. Nel 1880 egli pubblicò sulla rivista *Nature* [51] il primo articolo scientifico che illustrava il potenziale delle impronte digitali nell'ambito dell'investigazione criminale. Nello stesso anno tentò di coinvolgere *Charles Darwin* nello sviluppo di questa tecnica, inviandogli una lettera esplicativa; Darwin, anziano e in precarie condizioni di salute, trasmise la corrispondenza al cugino *Sir Francis Galton* [50].

Il contributo di *Francis Galton* si rivelò determinante per il consolidamento scientifico della dattiloscopia. A partire dal 1884, nell'ambito del suo più ampio progetto di raccolta di dati fisici e psicologici sulla popolazione si dedicò allo studio sistematico delle impronte digitali. *Galton* dimostrò che, anche nel confronto tra le impronte di gemelli monozigoti — pur presentando uno schema generale simile — i dettagli specifici non risultavano mai coincidenti. Questi

elementi peculiari dell'impronta furono denominati dallo stesso Galton *minutiae*. Nel 1892 pubblicò *Finger Prints*, opera nella quale fornì una prova della base scientifica delle impronte digitali, contribuendo in maniera decisiva al loro riconoscimento pubblico [52]. Il primo caso giudiziario risolto mediante il riconoscimento di impronte risale proprio al 1892, in Argentina, dove un'impronta ematica rinvenuta sulla scena del crimine consentì di identificare il responsabile di un duplice omicidio [2].

Un ulteriore contributo di rilievo fu apportato da *Sir Edward Henry*, che nel 1899 elaborò un sistema di classificazione delle impronte che semplificò notevolmente il processo di identificazione, sino ad allora condotto manualmente da esperti. Tale sistema costituisce la base dell'attuale metodologia classificatoria, di cui conserva ancora oggi alcuni elementi originari [50].

Il processo di integrazione della dattiloscopia nelle istituzioni prese avvio con l'incontro internazionale svoltosi nel Principato di Monaco nel 1914, durante il quale fu proposta per la prima volta l'adozione uniforme del riconoscimento delle impronte come procedura di identificazione *standard*; l'iniziativa fu però interrotta dallo scoppio del primo conflitto mondiale. Un significativo impulso alla raccolta dei dati dattiloscopici fu determinato dal secondo conflitto mondiale, durante il quale le operazioni di schedatura si estesero anche a consistenti fasce della popolazione civile, portando l'FBI ad accumulare archivi di dimensioni considerevoli [53].

La svolta verso l'automazione del processo di acquisizione e analisi delle impronte si colloca negli anni Sessanta del Novecento, quando il NIST (*National Institute of Standards and Technology*), avviò le prime ricerche finalizzate alla realizzazione di sistemi automatizzati di scansione, riconoscimento e classificazione — i cosiddetti *minutia-based fingerprint identification systems*. Nel 1969, su incarico diretto dell'FBI, il NIST sviluppò un sistema automatizzato per far fronte ai crescenti costi in termini di tempo e risorse umane legati all'acquisizione e alla catalogazione manuale delle impronte [54].

Nel 1975 fu messo in funzione un primo prototipo di lettore di impronte basato su tecniche conoscitive, in grado tuttavia di memorizzare esclusivamente informazioni relative alle minuzie, poiché la conservazione dell'immagine completa dell'impronta comportava costi tecnologici insostenibili per l'epoca. Successivamente, il NIST indirizzò le proprie attività di ricerca verso la digitalizzazione delle impronte a inchiostro, l'estrazione delle minuzie e la messa a punto di tecniche di confronto (*matching*) [55]. Nel 1993 fu costituito il *BioLab* ovvero il laboratorio di sistemi biometrici dell'Università di Bologna, la cui attività di ricerca si concentrò inizialmente sullo sviluppo di tecnologie informatiche per il riconoscimento di impronte

digitali, ampliandosi successivamente ad altri ambiti dei sistemi biometrici, tra cui il riconoscimento dei volti e la generazione di impronte artificiali [56].

1.10.1 Anatomia delle impronte digitali

Le impronte digitali costituiscono il prodotto morfologico caratteristico della cute presente sulla superficie volare delle dita e delle regioni palmari, una struttura biologica che si forma già durante lo sviluppo fetale, organizzandosi in tre schemi fondamentali: vortice (*whorl*), ansa (*loop*) e arco (*arch*) (Figura 6). Dal punto di vista istologico, la cute è organizzata in tre strati distinti: l'ipoderma, il derma e l'epidermide. L'epidermide rappresenta lo strato più esterno e svolge una funzione di barriera protettiva, è composta da cheratinociti compatti che migrano progressivamente dalla base verso la superficie cutanea, dove vengono infine eliminati come cellule morte attraverso il processo di desquamazione. Il derma, situato al di sotto dell'epidermide, è costituito da tessuto connettivo ricco di fibre collagene e di altre fibre elastiche tenute insieme da una matrice extra-fibrillare; essa incorpora al suo interno ghiandole sudoripare, vasi sanguigni, recettori tattili e termici. L'ipoderma, infine, è composto prevalentemente da tessuto adiposo organizzato in lobuli separati da fibre connettivali; tale tessuto presenta una funzione di ammortizzazione e si comporta come un mezzo viscoso, contribuendo a determinare il profilo morfologico delle dita e del palmo. La distribuzione dei lobuli adiposi nell'ipoderma è di primaria importanza nel definire la deformabilità del polpastrello. Quando il dito viene applicato su una superficie con una forza compressiva, i lobuli si deformano per distribuire uniformemente lo *stress* applicato.

Le creste dell'impronta digitale (*friction ridge skin*), sono le strutture anatomiche in rilievo che, alternate a solchi interdigitali (*furrows*), costituiscono la morfologia dell'impronta stessa. A livello microscopico, la superficie delle creste è irregolare, determinando un'area di contatto effettiva con la superficie significativamente inferiore all'area apparente: in assenza di sudore, meno del 40% della cresta entra in contatto con la superficie; in presenza di depositi sudoripari, tale percentuale aumenta considerevolmente. A basse forze applicate, solo i punti più elevati delle creste entrano in contatto con la superficie, producendo creste discontinue; a forze medie, tutte le creste possono stabilire un contatto continuo; ad alte forze, le creste stesse possono deformarsi lateralmente, riducendo la spaziatura reciproca. Nelle regioni dei solchi possono essere presenti le cosiddette *incipient ridges*, ovvero creste parzialmente formate che divengono visibili nell'impronta al crescere della forza applicata. La larghezza tipica di una cresta è di circa 125 μm con una forza di 0,5 Newton, aumentando fino a circa 250 μm con una forza di 10 Newton [57].

L'analisi delle creste si articola convenzionalmente su tre livelli. Il primo livello descrive il flusso generale delle creste, identificabile nei tre pattern fondamentali — vortice, ansa e arco — che consentono una prima classificazione dell'impronta. Il secondo livello comprende le discontinuità nel flusso delle creste, tra cui le terminazioni di cresta e le biforcazioni, nelle quali una singola cresta si divide in due; tali caratteristiche, note anche come minuzie, rappresentano gli elementi di maggiore rilevanza operativa sia per i confronti condotti dagli specialisti in identificazione sia per gli algoritmi automatizzati di ricerca nelle banche dati dattiloscopiche. Il terzo livello include caratteristiche associate alle creste, quali i pori, la morfologia dei margini delle creste e le discontinuità interne alla cresta stessa; vi rientrano talvolta anche cicatrici permanenti e pieghe cutanee.

Sul piano ghiandolare, tre tipologie di ghiandole contribuiscono alla composizione del residuo delle tracce latenti: le ghiandole eccrine, le ghiandole sebacee e le ghiandole apocrine. Le ghiandole eccrine sono distribuite su tutto il corpo con densità variabile e sono le uniche presenti nelle regioni palmari e plantari, costituendo la componente predominante del residuo delle impronte digitali. Le ghiandole sebacee sono invece associate ai follicoli piliferi e sono particolarmente abbondanti nel cuoio capelluto e nel viso; le regioni palmari ne sono prive, tuttavia il sebo e i lipidi epidermici si possono trovare nel residuo delle impronte latenti in conseguenza al contatto delle dita con altre regioni corporee. Le ghiandole apocrine si trovano nelle regioni ascellari e genitali, diventano attive a partire dalla pubertà e possono contribuire al residuo delle impronte latenti per trasferimento secondario. La composizione complessiva di ciascuna traccia papillare è una miscela eterogenea di componenti, rendendo il profilo chimico di ogni impronta depositata essenzialmente unico [58,59].

1.10.2 Esaltazione delle impronte digitali

Le tecniche di esaltazione delle impronte digitali latenti rappresentano il nucleo operativo della dattiloscopica forense, poiché consentono di rendere visibili tracce che, nella loro configurazione originale, non sarebbero percepibili a occhio nudo. La selezione del metodo più appropriato dipende in misura determinante dalla natura della superficie esaminata, dalla composizione chimica del residuo papillare e dalle condizioni ambientali e temporali a cui l'impronta è stata esposta. Tra le tecniche utilizzate per l'esaltazione delle impronte digitali rientrano: trattamento con cianoacrilato, lumiciano, ninidrina, *mall Particle Reagent* (SPR) e polveri magnetiche [59].

Il trattamento con cianoacrilato in fase di vapore (*superglue fuming* o *cyanoacrylate fuming*) è riconosciuto come una delle tecniche più efficaci per lo sviluppo di impronte latenti su superfici non porose. La tecnica si fonda sul principio della polimerizzazione anionica del monomero di cianoacrilato etilico, la cui catena insatura e il gruppo ciano lo rendono un ottimo elettrofilo: in presenza di nucleofili presenti nel residuo papillare si innesca una reazione che porta alla formazione di depositi di policianoacrilato bianco, preferenzialmente sulle creste dell'impronta (Figura 14). Le proprietà ottimali del deposito si ottengono a un'umidità relativa dell'80% e a una temperatura di circa 20 °C. Valori di umidità inferiori al 75% producono depositi morfologicamente scarsamente definiti, mentre al di sopra del 90% si osserva uno sviluppo eccessivo dello sfondo con riduzione della definizione delle creste. Il processo viene condotto in camere di fumigazione dotate di un piatto riscaldante portato a circa 120°C — temperatura sufficiente all'evaporazione del cianoacrilato etilico senza produrre prodotti di degradazione tossici come il cianuro di idrogeno — e di una sorgente di umidità controllata.

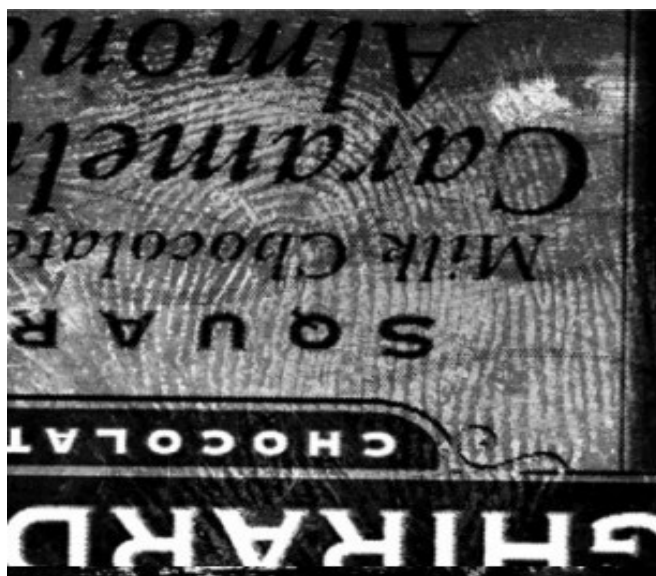


Figura 14: Impronta polimerizzata con cianoacrilato su un involucro di plastica. Yamashita B, French M, Bleay S, Cantu A, Inlow V, Ramotowski R, Sears V, Wake M. Latent print development. In: Yamashita B, French M, editors. Latent print development. Washington (DC): U.S. Department of Justice, Federal Bureau of Investigation; 2013.

Un ulteriore tecnica di esaltazione è quella con il lumiciano che rappresenta un'evoluzione del processo di fumigazione con cianoacrilato tradizionale, con il quale condivide il medesimo principio chimico-funzionale: la polimerizzazione selettiva dell'etilcianoacrilato sui residui delle creste dermopapillari. La sua caratteristica distintiva risiede nell'incorporazione di un fluoroforo direttamente nella matrice polimerica, rendendo il deposito intrinsecamente fluorescente (Figura 15). Il protocollo operativo ricalca quello della fumigazione con cianoacrilato e risulta compatibile con le camere di fumigazione esistenti senza alcuna modifica strumentale. Una

volta polimerizzato, il deposito può essere eccitato sia in UV (315–340 nm) sia nel visibile (450–550 nm), con emissione rilevabile attorno a 560 nanometri. La principale limitazione del prodotto riguarda la stabilità della fluorescenza: il segnale degrada rapidamente in presenza di luce diurna, risultando difficilmente apprezzabile già dopo 24 ore, rendendo necessaria la documentazione fotografica entro 48 ore dalla fumigazione [60].



Figura 15: Impronta digitale latente sviluppata mediante trattamento con lumicyano su un sacchetto di plastica nero. Putra S. Recovery of fresh latent fingerprints on black clothing fabrics using Lumicyano.

Il meccanismo d'azione della ninidrina si basa invece sulla reazione chimica tra la molecola di ninidrina e il gruppo aminico degli amminoacidi presenti nel sudore eccrino, con formazione di prodotto colorato denominato *Porpora di Ruhemann* (Figura 16), avente colorazione tipicamente violacea. La ninidrina è in grado di reagire non soltanto con gli amminoacidi liberi, ma anche con un'ampia gamma di altre sostanze contenenti gruppi aminici; può altresì sviluppare impronte contaminate con sangue, grazie alla reazione con i gruppi aminici nelle proteine presenti. Dal punto di vista della composizione, il residuo delle impronte trattate con ninidrina non contiene unicamente il prodotto cromatico della *porpora di Ruhemann*, potendo accumularsi anche prodotti intermedi colorati quali l'imina e l'aldimina, la cui tonalità dipende dai gruppi -R legati alle specie reattive. La formazione della *Porpora di Ruhemann* richiede un pH inferiore a 5; in condizioni di acidità insufficiente la reazione può fermarsi all'intermedio colorato, o proseguire verso il prodotto incolore dell'idrantantina se il pH scende al di sotto di 2. Il processo prevede l'applicazione della soluzione di ninidrina per immersione o pennellatura, seguita dal trattamento in un forno umidificato a 80°C e al 65% di umidità relativa per almeno cinque minuti, sebbene lo sviluppo completo possa protrarsi. L'umidità ottimale del 65% è determinante poiché, al di sopra di tale soglia, si osservano reazioni anomale con lo sfondo, mentre al di sotto non tutte le impronte riescono ad essere sviluppate. Una delle caratteristiche più

importanti della ninidrina in relazione alla sua applicazione su carta è la capacità degli amminoacidi di formare legami idrogeno con la cellulosa del substrato, il che impedisce la migrazione degli amminoacidi dalla zona di deposito originale e consente la persistenza del dettaglio delle creste in impronte invecchiate, a meno che non siano state esposte ad alta umidità. Per contro, la ninidrina non è efficace su superfici che siano state bagnate o esposte ad alta umidità, poiché gli amminoacidi, essendo idrosolubili, vengono dilavati [59].

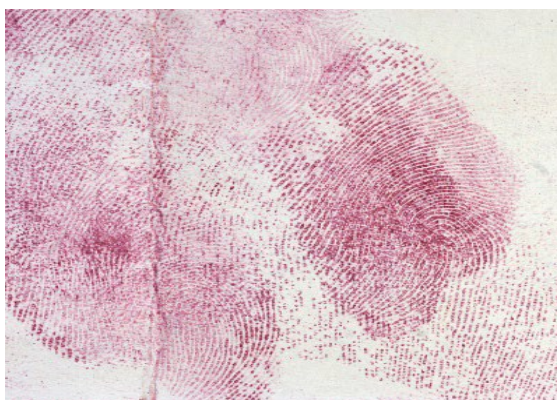


Figura 16: Impronta digitale latente sviluppata mediante trattamento con ninidrina su supporto cartaceo. La ninidrina reagisce con gli amminoacidi presenti nei residui sudoripari formando il caratteristico prodotto cromatico violaceo noto come porpora di Ruheman. Bleay SM, Croxton RS, de Puit M. Fingerprint Development Techniques: Theory and Application

Lo *Small Particle Reagent* (SPR) è un reagente in fase liquida che reagisce con i costituenti lipidici delle impronte digitali. La sua principale utilità operativa risiede nella capacità di sviluppare impronte su superfici non porose che siano già state bagnate, caratteristica rara tra i metodi disponibili. Il principio attivo del formulato è il disolfuro di molibdeno (MoS_2), un solido insolubile in acqua con una struttura cristallina a strati, mantenuto in sospensione acquosa da un tensioattivo anionico quale il diottilsolfosuccinato sodico (DOSS). Il meccanismo di sviluppo è di tipo fisico-chimico: il tensioattivo forma micelle stabili attorno alle particelle di MoS_2 , tenendole momentaneamente in sospensione; quando le particelle si avvicinano alla superficie dell'impronta, i costituenti lipidici delle creste destabilizzano le micelle, interagendo con le code idrofobiche del tensioattivo e favorendo la deposizione preferenziale delle particelle di MoS_2 sulle creste stesse, mentre il successivo lavaggio con acqua rimuove le particelle in eccesso non legate alla superficie. La tecnica si presta a due modalità applicative: lo sviluppo in vasca, riservato a oggetti di dimensioni trattabili in laboratorio come buste di plastica, involucri, oggetti di vetro e polistirene espanso (Figura 17) e l'applicazione a spruzzo, indicata per superfici inamovibili, di grandi dimensioni o in ambienti esterni [61].

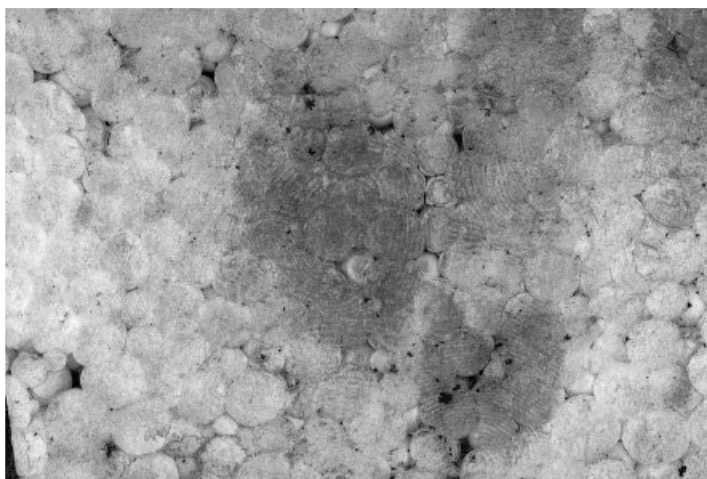


Figura 17: Impronte digitali sviluppate su polistirene espanso mediante Small Particle Reagent (SPR). Bleay SM, Croxton RS, de Puit M. Fingerprint Development Techniques: Theory and Application

Per quanto riguarda le polveri magnetiche, dal punto di vista della composizione, si distinguono due tipologie principali: le polveri magnetiche granulari e le polveri magnetiche a lamelle. Le polveri magnetiche granulari, le più diffuse in colore nero, sono composte da grandi particelle vettori di ferro elementare (con dimensioni comprese tra 20 e 200 μm) e da particelle più piccole e non magnetiche di ossido di ferro (Fe_3O_4) con un diametro di 3-12 μm ; le particelle vettori fungono da mezzo di trasporto per le particelle più fini, le quali si depositano selettivamente sulle creste dell'impronta. Le polveri magnetiche a lamelle invece, sono prodotte per macinazione di carbonile di ferro sferico con acido stearico al 3-5% in un solvente adatto, ottenendo lamelle a bordi smussati con dimensioni di 10-60 μm ; il rivestimento di acido stearico svolge un ruolo cruciale nel meccanismo di adesione alle creste, favorendo interazioni di tipo lipofilo con gli acidi grassi strutturalmente affini presenti nel residuo papillare. Entrambe le tipologie di polveri magnetiche vengono applicate tramite applicatori a bacchetta magnetica (Figura 18): il magnete posto all'estremità attira la polvere, che si dispone in una piccola massa compatta che

viene fatta scorrere sulla superficie da esaminare, in questo modo si evita il contatto diretto tra lo strumento e il substrato, riducendo al minimo il rischio di danneggiare l'impronta [59].



Figura 18: Bacchetta magnetica utilizzata per l'applicazione di polveri magnetiche nello sviluppo di impronte digitali latenti, caratterizzata da un'estremità magnetica che consente l'adesione e il rilascio controllato della polvere senza contatto diretto con il substrato. Yamashita B, French M, Bleay S, Cantu A, Inlow V, Ramotowski R, Sears V, Wake M. Latent print development. In: Yamashita B, French M, editors. Latent print development. Washington (DC): U.S. Department of Justice, Federal Bureau of Investigation; 2013.

2. MATERIALI E METODI

Il presente progetto sperimentale è stato strutturato seguendo uno schema sistematico, con l'obiettivo di valutare comparativamente l'efficacia di diverse metodologie di prelievo, estrazione e quantificazione del DNA da contatto (*touch DNA*) su superfici di vetro, considerando gli effetti indotti dalle tecniche di esaltazione delle impronte. Lo scopo principale consiste nell'identificare la combinazione di tecniche più efficiente e riproducibile per il prelievo e l'analisi di tracce biologiche latenti in ambito forense.

2.1 Preparazione dei campioni

Un singolo donatore ha provveduto al deposito della relativa impronta digitale utilizzando il primo dito di ciascuna mano su supporto di vetro (vetrini da laboratorio) in tempi differenti al fine di eliminare eventuali *byass* associabili al deposito e garantire variabilità. Complessivamente per ciascuna condizione sperimentale sono state allestite in totale n.10 impronte, di cui cinque sottoposte a trattamento e ulteriori cinque utilizzate a controllo di raffronto, per permettere così una valutazione statistica dei risultati.

I campioni sono stati sottoposti a trattamento di esaltazione con cianoacrilato (2 grammi di cianoacrilato a 120 °C, 70% di umidità, ciclo di 6 minuti).

2.2 Prelievo

Per consentire quindi di identificare la tecnica di prelievo più efficiente sono state confrontate tre differenti modalità di prelievo:

- Tampone 4N6FLOQSwabs® (*Copan Flock™*) imbibito con etanolo (20 µL di EtOH)
- Tampone 4N6FLOQSwabs® (*Copan™*) imbibito con acqua sterile (20 µL di H₂O)
- Tampone a secco 4N6FLOQSwabs® (*Copan™*) senza solvente aggiuntivo.

Adottando le misure atte a prevenire la contaminazione dei campioni, quali l'utilizzo di guanti, mascherina, camice e cuffia, nonché la disposizione di un telo sterile sul piano di lavoro, ciascun tampone è stato strofinato sull'intera superficie dell'impronta assicurando un trasferimento completo del materiale biologico, per procedere poi alla successiva fase estrattiva.

Di seguito, in tabella 2, è riassunto lo schema del disegno sperimentale: i 60 campioni complessivi sono suddivisi in due gruppi principali:

- VST (vetro senza trattamento, n = 30)

- VCA (vetro con fumigazione al cianoacrilato, n = 30)

ulteriormente suddivisi per modalità di prelievo, variante del kit di estrazione e replica (I–V).

Tabella 2: Schema del disegno sperimentale dei campioni in analisi.

Gruppo	Modalità di prelievo	Kit estrazione	N° replica	N° vetrini	Codice campione
VST (vetro senza trattamento)	Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VST 1
			II		VST 2
			III		VST 3
			IV		VST 4
			V		VST 5
		<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VST 6
			II		VST 7
			III		VST 8
			IV		VST 9
			V		VST 10
	Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VST 11
			II		VST 12
			III		VST 13
			IV		VST 14
			V		VST 15
		<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VST 16
			II		VST 17
			III		VST 18
			IV		VST 19
			V		VST 20
	Etanolo (EtOH)	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VST 21
			II		VST 22
			III		VST 23
			IV		VST 24
			V		VST 25
		<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VST 26
			II		VST 27
			III		VST 28

VCA (vetro con cianoacrilato)			IV		VST 29
			V		VST 30
	Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VCA 1
			II		VCA 2
			III		VCA 3
			IV		VCA 4
			V		VCA 5
		<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VCA 6
			II		VCA 7
			III		VCA 8
			IV		VCA 9
			V		VCA 10
	Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VCA 11
			II		VCA 12
			III		VCA 13
			IV		VCA 14
			V		VCA 15
		<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VCA 16
			II		VCA 17
			III		VCA 18
			IV		VCA 19
			V		VCA 20
	Etanolo (EtOH)	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VCA 21
			II		VCA 22
			III		VCA 23
			IV		VCA 24
			V		VCA 25
		<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	I	3	VCA 26
			II		VCA 27
			III		VCA 28
			IV		VCA 29
			V		VCA 30

2.3 Estrazione

I campioni sono stati processati mediante l'impiego di due differenti *kit* di estrazione, entrambi basati su una metodica di purificazione su biglie magnetiche: il *PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit* e il *PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit* [62].

Per il *PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit*, si è provveduto a preparare una miscela di reazione moltiplicando il volume dei reagenti di seguito riportati per il numero di campioni in analisi, comprensivo di un campione negativo di estrazione:

- 220 µL di *lysis buffer*,
- 3 µL di ditionotritolo (DTT)
- 7 µL di Proteinasi K.

Per ciascun campione processato nella relativa fase analitica.

I campioni sono quindi stati incubati a 56°C per 40 minuti in agitazione a 750 rpm avvalendosi del *ThermoMixer®* (Eppendorf)

Per il *kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit* invece, è stata preparata una miscela di reazione:

- 500 µL di *lysis buffer* e
- 5 µL di DTT

Per ciascun campione quindi incubato a 70°C per 40 minuti in agitazione a 750 rpm in *ThermoMixer®* (Eppendorf).

Al termine dell'incubazione i campioni sono stati centrifugati per circa 2 minuti a 10.000 g per procedere poi alla fase estrattiva su strumentazione *AutoMate Express™* (*Applied Biosystems™*) selezionando il volume di eluizione finale di 30 µL.

2.4 Quantificazione

La quantificazione del DNA estratto è stata condotta in *Real-Time* PCR, utilizzando il *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit* (*Applied Biosystems™*) su strumentazione *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems™*) secondo protocollo. Il *kit* consente la quantificazione simultanea del DNA umano totale, del DNA umano maschile e la definizione di un indice di degradazione del DNA calcolato come rapporto tra la quantità del *target* autosomico

a basso peso molecolare (*Small Autosomal*) e quella del target autosomico ad alto peso molecolare (*Large Autosomal*)

Per ciascun campione è stata allestita una miscela di reazione composta da 5 μL *Master Mix* e 4 μL di *Primer Mix*, per un volume totale di 9 μL per pozzetto, a cui sono stati aggiunti 1 μL di campione. Come controllo negativo (NTC/*No Template Control*) è stato utilizzato 1 μL di acqua, mentre come controllo positivo è stato impiegato il DNA *Control* 007 (a concentrazioni *standard* di 0.1 ng/ μL) alle stesse condizioni di analisi. La curva di taratura è stata preparata utilizzando lo *standard Quantifiler™ Trio THP DNA Standard* fornito dal kit secondo diluizione (Tabella 3). Ogni standard è stato analizzato in duplicato.

Tabella 3: Schema di preparazione della curva di taratura per il *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit*. (*Quantifiler™ Trio User Guide*, Thermo Fisher Scientific).

Standard	Concentrazione (ng/ μL)	Volumi impiegati	Fattore di diluizione
Standard 1	50	5 μL [stock 100 ng/ μL] + 5 μL <i>Quantifiler™ Trio THP DNA Dilution Buffer</i>	2×
Standard 2	5	5 μL [Standard 1] + 45 μL <i>Quantifiler™ Trio THP DNA Dilution Buffer</i>	10×
Standard 3	0,5	5 μL [Standard 2] + 45 μL <i>Quantifiler™ Trio THP DNA Dilution Buffer</i>	10×
Standard 4	0,05	5 μL [Standard 3] + 45 μL <i>Quantifiler™ Trio THP DNA Dilution Buffer</i>	10×
Standard 5	0,005	5 μL [Standard 4] + 45 μL <i>Quantifiler™ Trio THP DNA Dilution Buffer</i>	10×

Una volta completato il caricamento della piastra, questa è stata centrifugata per 20 secondi a 3.000 rpm prima di essere inserita nello strumento.

I dati ottenuti sono stati elaborati con il *software HID Real-Time PCR Analysis v 1.4* (*Applied Biosystems™*) per ottenere i valori di concentrazione del DNA da utilizzare nella fase di amplificazione.

2.5 Analisi statistiche

Le analisi statistiche condotte sui dati di quantificazione hanno riguardato tre confronti distinti: il confronto della concentrazione di DNA estratto (ng/ μL) tra campioni trattati con vapori di cianoacrilato (VCA) e campioni non trattati (VST), per ciascuna modalità di prelievo; il

confronto della concentrazione di DNA (ng/ μ L) tra le sei condizioni sperimentali definite dalla combinazione di modalità di prelievo e *kit* di estrazione; e il confronto del *Degradation Index* (DI) tra le medesime sei condizioni sperimentali nei soli campioni trattati (VCA).

I primi due confronti, riguardando una variabile con distribuzione compatibile con l'assunzione di normalità, sono stati condotti mediante analisi della varianza (ANOVA) a un fattore; il terzo, riguardando una variabile con distribuzione asimmetrica, è stato condotto mediante il *test* non parametrico di *Mann-Whitney U*.

2.5.1 Analisi della varianza (ANOVA) a un fattore

l'ANOVA consente di valutare in un'unica analisi se esiste una differenza significativa tra le medie di tutti i gruppi confrontati simultaneamente. È il *test* statistico inferenziale più comunemente impiegato per confrontare le medie di due o più gruppi indipendenti e verificare se le differenze osservate siano statisticamente significative, ossia difficilmente attribuibili al solo caso.

Il *test* si basa sul confronto tra un'ipotesi nulla (H_0), secondo cui le medie dei gruppi considerati sono uguali, e un'ipotesi alternativa (H_1), secondo cui almeno una media differisce dalle altre. Il principio su cui si fonda il *test* è la scomposizione della variabilità complessiva, osservata nei dati, in due componenti: la variabilità tra i gruppi, attribuibile all'appartenenza a condizioni sperimentali diverse, e la variabilità entro i gruppi, attribuibile alla dispersione individuale delle osservazioni all'interno di ciascun gruppo. Il rapporto tra queste due componenti, opportunamente normalizzate per i rispettivi gradi di libertà, costituisce la statistica *test* F: valori di F superiori a 1 indicano che la variabilità tra i gruppi eccede quella attesa sulla base della sola variabilità casuale interna ai gruppi, fornendo evidenza contro l'ipotesi nulla.

Il *p-value* rappresenta invece la probabilità di osservare, assumendo vera l'ipotesi nulla, un risultato uguale o più estremo rispetto a quello ottenuto. Il *p-value* associato alla statistica F viene confrontato con una soglia critica di significatività, fissata a $\alpha = 0,05$: valori di p inferiori a tale soglia comportano il rifiuto di H_0 e la conclusione che le medie confrontate differiscano in modo statisticamente significativo.

Inoltre, l'applicazione corretta dell'ANOVA a un fattore richiede che siano soddisfatte tre assunzioni fondamentali: l'indipendenza delle osservazioni, sia tra i gruppi sia al loro interno; la normalità della distribuzione dei dati in ciascun gruppo; e l'omogeneità delle varianze tra i gruppi confrontati (omoschedasticità) [63].

2.5.2 Test non parametrico di *Mann-Whitney U*

Il test di *Mann-Whitney U* è un test statistico non parametrico impiegato per confrontare due gruppi indipendenti quando non è possibile assumere la normalità della distribuzione dei dati. Esso opera sui ranghi delle osservazioni: i valori dei due gruppi a confronto vengono ordinati in un'unica serie crescente, e a ciascuna osservazione viene assegnato il rango corrispondente alla propria posizione nella serie (il valore più basso riceve rango 1, il successivo rango 2, e così via).

I ranghi vengono quindi sommati separatamente per ciascun gruppo, e dalla somma dei ranghi deriva la statistica *test U*, secondo la formula:

$$U = n_1 n_2 + [n_1(n_1+1)/2] - R_1$$

dove:

n_1 e n_2 = numerosità campionarie dei due gruppi

R_1 = la somma dei ranghi del primo gruppo

La statistica *U* quantifica il grado di sovrapposizione tra le distribuzioni dei ranghi dei due gruppi: valori di *U* più piccoli indicano una maggiore separazione tra i due gruppi, pertanto, i ranghi di un gruppo si concentrano ai valori più bassi o più alti della serie ordinata; viceversa, valori di *U* maggiori indicano una distribuzione dei ranghi sostanzialmente equivalente tra i due gruppi.

Il *test* verifica un'ipotesi nulla (H_0) secondo cui le distribuzioni dei gruppi confrontati sono identiche, ossia non vi è una differenza sistematica tra i ranghi, contro un'ipotesi alternativa (H_1) secondo cui le due distribuzioni differiscono tra loro: le osservazioni di un gruppo risultano, nel complesso, più elevate o più contenute rispetto a quelle dell'altro, riflettendo una differenza tra le condizioni sperimentali confrontate.

Alla statistica *U* calcolata è associato un *p-value*, che esprime quanto sia verosimile ottenere una separazione dei ranghi pari a quella osservata se i due gruppi fossero realmente equivalenti, il *p-value* viene confrontato con la soglia di significatività $\alpha = 0,05$: se è inferiore a 0,05, si esclude che lo scostamento sia attribuibile alla sola variabilità casuale, e si conclude che tra i due gruppi esiste una differenza statisticamente significativa; se è pari o superiore a 0,05, i dati non permettono di escludere che lo scostamento sia dovuto alla sola variabilità campionaria ($p \geq 0,05$: nessuna differenza statisticamente significativa; $p < 0,05$: differenza statisticamente significativa).

Le assunzioni richieste dal *test* sono: l'indipendenza delle osservazioni, una scala di misura almeno ordinale, e una forma di distribuzione simile tra i due gruppi confrontati, condizione quest'ultima necessaria affinché il *test* possa essere interpretato come un confronto tra le tendenze centrali (mediane) dei due gruppi e non semplicemente tra le loro forme distributive [64].

2.6 Amplificazione

Adottando gli opportuni accorgimenti atti al fine di prevenire contaminazioni, le operazioni di preparazione della miscela di amplificazione e di dispensazione sono state condotte separatamente in due cappe biologiche a flusso laminare distinte: una dedicata alla preparazione dei reagenti della *master mix*, l'altra alla dispensazione del DNA template.

L'amplificazione dei loci STR è stata eseguita con il *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit* (*Applied Biosystems™*) su strumentazione *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems™*) in volume finale di 12.5 µL con 0.25 ng di DNA *input* ove possibile o volume massimo parti a 7.5 µL.

Per ogni sessione analitica sono stati amplificati anche controlli positivi, allestiti utilizzando 0.25 ng di DNA *Control 007* (*Thermo Fisher Scientific™*) in volume di 7.5 µL e controlli negativi preparati con 7.5 µL di sola acqua di amplificazione.

2.7 Elettroforesi capillare

La separazione e la rilevazione dei frammenti STR amplificati sono state eseguite mediante elettroforesi capillare su sequenziatore *3500 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems™*).

Per la preparazione della piastra, in ciascun pozzetto sono stati dispensati 9 µL di formammide *Hi-Di™* (*Applied Biosystems™*) e 0,4 µL di *GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0* (*Applied Biosystems™*); a questi sono stati aggiunti 1 µL di prodotto PCR per i campioni, i controlli positivi, i controlli negativi, e 1 µL di *Allelic Ladder* (fornito nel kit *GlobalFiler™*).

La corsa elettroforetica è stata condotta secondo i parametri raccomandati dal produttore, con polimero *POP-4™* (*Applied Biosystems™*): iniezione a 1,2 kV per 15 secondi e corsa a 13 kV per 1.550 secondi.

I profili STR ottenuti sono stati acquisiti mediante il *software* dedicato allo strumento e successivamente analizzati con *GeneMapper™ ID-X v1.7* [65].

2.8 Analisi biostatistica con *software LRMixStudio*

Per i profili genetici ottenuti dai campioni si è provveduto ad eseguire valutazione probabilistica di contribuzione, rispetto al profilo genetico del soggetto di riferimento, avvalendosi del *software* LRMix Studio versione 2.1.5 [66].

L'analisi è stata strutturata confrontando due proposizioni alternative:

- Hp (ipotesi dell'accusa): il soggetto di interesse (POI) è contributore della traccia biologica analizzata
- Hd (ipotesi della difesa): la traccia proviene da altro contributore ignoto.

Parametri di analisi:

- frequenze alleliche: NIST (*Routine NIST All Pop*) [67]
- *Drop-in*: 0.05
- $\theta = 0.01$
- *Dropout*: inizialmente definito pari a 0.1 poi individualmente determinato mediante la funzionalità predisposta del *software*

Infine, è stato eseguito il *Non-contributor test*: il *software* genera un insieme di profili genetici casuali, campionati dalle frequenze alleliche della popolazione di riferimento, e ne calcola il relativo LR. La distribuzione degli LR così ottenuti fornisce un riferimento che permette di verificare il valore di LR ottenuto per il POI rispetto ai valori di LR ottenuti dai profili simulati.

Il *Non Contributor test*, come descritto da Gill P. e Haned H. [68] non è un *test* di significatività statistica né uno strumento per stabilire l'identità del contributore, ma una procedura di validazione del modello probabilistico impiegato dal *software*, volta a verificarne la capacità di distinguere il profilo compatibile con la traccia da profili generati casualmente.

Lo scarto tra $\log_{10}$ (LR) del POI e valore massimo del *Non Contributor test* indica che il modello impiegato per il calcolo del LR si comporta in modo coerente con quanto atteso per un vero contributore, distinguendolo nettamente da un insieme di profili non correlati alla traccia. Tale risultato non implica, di per sé, una conclusione automatica circa il contributo del POI alla traccia biologica, la cui valutazione complessiva richiede la considerazione congiunta di tutti gli elementi dell'analisi, incluso il valore assoluto del LR, la qualità del profilo genetico e le ipotesi Hp/Hd adottate

I parametri applicati alle 23 elaborazioni sono riportati in tabella 4.

Tabella 4: Parametri di analisi applicati al software *LRmixStudio*.

Parametro	Descrizione
<i>Software</i>	<i>LRmixStudio</i> v2.1.5
Ipotesi accusatoria (H_p)	POI
Ipotesi difensiva (H_d)	1 ignoto
$\text{Pr}(\text{drop-in})$	0,05 parametro definito di <i>default</i>
Correzione theta (θ)	0,01 Corregge la stima delle frequenze alleliche per la sottostruttura di popolazione (ossia la tendenza di individui appartenenti allo stesso sottogruppo a condividere più alleli tra loro rispetto alla popolazione generale) la cui mancata considerazione porterebbe a sovrastimare la rarità del profilo e quindi il valore del LR [44]
$\text{Pr}(\text{drop-out})$	Inizialmente impostata a 0.1 quale parametro di <i>default</i> . Poi stimata singolarmente per ciascuna traccia; valore = 95° percentile della stima empirica, <i>software</i> (1000 simulazioni Monte Carlo)
Banca dati frequenze alleliche	<i>NIST All Populations, database</i> di frequenze alleliche per 29 loci STR autosomici, costruito aggregando i dati di più gruppi di popolazione in un unico insieme combinato [67]
<i>Non Contributor test</i>	1000 interazioni Monte Carlo; considerato il valore massimo.

La probabilità di *drop-out* è stata determinata tramite un protocollo in due fasi. Nella prima elaborazione, è stata impostata una *drop-out variation* nell'intervallo [0; 0,99] consentendo al *software* di eseguire 1000 simulazioni Monte Carlo per la stima empirica del *drop-out*, secondo l'approccio descritto da *Haned et al.* (2012) [69]. L'*output* di questa fase è il grafico di *sensitivity analysis* (Figura 19), che riporta $\log_{10}(\text{LR})$ in funzione di $\text{Pr}(\text{drop-out})$; su di esso è sovrapposta la distribuzione della stima empirica come regione colorata corrispondente al 5°–95° percentile della distribuzione Monte Carlo.

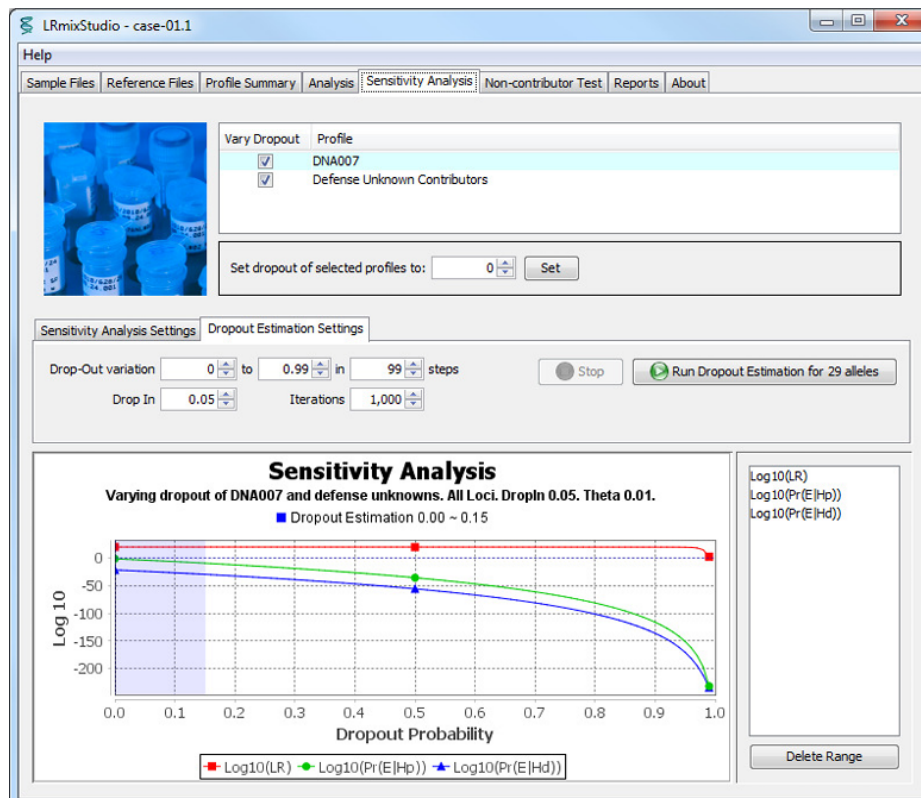


Figura19: Analisi di sensibilità condotta in LRmix Studio v2.1.5 per il campione case-01.1, con variazione della probabilità di drop-out da 0 a 0,99 in 99 step (Drop-In = 0,05; $\theta = 0,01$). Il grafico riporta in funzione della probabilità di drop-out i valori di $\log_{10}(LR)$ (rosso), $\log_{10}(\Pr(E|H_p))$ (verde) e $\log_{10}(\Pr(E|H_d))$ (blu). La banda azzurra indica l'intervallo di drop-out stimato dal software (0,00–0,15).

Nella seconda fase è stato identificato, sulla base del grafico di *sensitivity analysis*, il valore di $\Pr(drop-out)$ a cui corrisponde il valore di LR più basso in quanto rappresentativo dello scenario più conservativo: poiché la relazione tra $\Pr(drop-out)$ e il valore di LR non è lineare, un valore di $\Pr(drop-out)$ più elevato non corrisponde necessariamente a un LR più basso, e può anzi produrre un LR più alto, meno cautelativo ai fini della valutazione statistica. Tale valore è stato quindi inserito manualmente come $\Pr(drop-out)$ nell'analisi LR.

3. RISULTATI

3.1 Risultati di quantificazione

In tabella 5 sono riportati i risultati di quantificazione relativi ai campioni ottenuti da vetro non sottoposto a trattamento.

Tabella 5: Risultati di quantificazione dei campioni VST (vetro non trattato). Media e deviazione standard del gruppo Secco/No BTA calcolate escludendo il campione VST_13, il cui valore è stato considerato anomalo

Modalità di prelievo	Kit di estrazione	Campione	Concentrazione DNA (ng/μL)	DI	Media gruppo (ng/μL)	Dev.STD gruppo (ng/μL)	Media DI gruppo	Dev.STD DI gruppo
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_1	0,0062	0,88	0,0111	0,0061	1,07	0,18
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_2	0,0080	0,92				
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_3	0,0122	1,16				
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_4	0,0078	1,08				
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_5	0,0212	1,31				
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_6	0,0036	0,69	0,0079	0,0036	1,20	0,43
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_7	0,0089	1,85				
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_8	0,0105	0,95				
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_9	0,0046	1,26				
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_10	0,0117	1,24				

Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_11	0,0166	1,07	0,0232	0,0242	0,93	0,16
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_12	0,0082	0,70				
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_13	63,6263	979,55				
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_14	0,0091	1,00				
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_15	0,0591	0,94				
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_16	0,0177	1,07	0,0124	0,0046	1,57	0,65
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_17	0,0104	1,81				
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_18	0,0085	1,19				
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_19	0,0084	2,61				
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_20	0,0169	1,17				
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_21	0,0111	1,16	0,0145	0,0087	1,42	0,26
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_22	0,0120	1,17				
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_23	0,0087	1,76				
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_24	0,0300	1,53				

Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_25	0,0109	1,49				
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_26	0,0056	1,12	0,0136	0,0098	1,32	0,23
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_27	0,0147	1,16				
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_28	0,0290	1,58				
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_29	0,0144	1,17				
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_30	0,0044	1,56				

In tabella 6 sono invece riportati i risultati di quantificazione relativi ai campioni ottenuti da vetro sottoposto a trattamenti con vapori di cianoacrilato.

Tabella 6: Risultati di quantificazione dei campioni VCA (vetro trattato con cianoacrilato).

Modalità di prelievo	Kit di estrazione	Campione	Concentrazione DNA (ng/μL)	DI	Media gruppo (ng/μL)	Dev.ST D gruppo (ng/μL)	Media DI gruppo	Dev.ST D DI gruppo
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_1	0,0087	0,82	0,0065	0,0026	1,45	0,83
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_2	0,0056	1,15				
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_3	0,0063	1,36				
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_4	0,0027	1,02				
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_5	0,0090	2,89				
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_6	0,0078	2,04	0,0056	0,0019	2,86	1,06

Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_7	0,0069	2,39				
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_8	0,0056	2,76				
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_9	0,0032	4,71				
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_10	0,0043	2,42				
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_11	0,0067	1,16	0,0059	0,0011	1,68	0,76
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_12	0,0061	1,39				
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_13	0,0041	1,55				
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_14	0,0056	1,28				
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_15	0,0070	3,02				
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_16	0,0032	1,43	0,0056	0,0018	1,61	0,42
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_17	0,0055	2,13				
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_18	0,0082	1,92				
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_19	0,0050	1,06				
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_20	0,0063	1,53				
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_21	0,0406	1,27	0,0182	0,0176	1,19	0,19

Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_22	0,0340	1,02				
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_23	0,0061	1,08				
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_24	0,0052	1,49				
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_25	0,0050	1,10				
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_26	0,0084	1,99	0,0072	0,0018	2,53	1,80
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_27	0,0078	1,58				
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_28	0,0045	1,25				
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_29	0,0090	5,69				
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_30	0,0061	2,15				

Considerando i dati di quantificazione sono stati condotti *test* statistici volti a:

- 1) definire l'influenza del trattamento con vapori di cianoacrilato, considerando la concentrazione (ng/ μ L), con l'analisi della varianza ad un fattore
- 2) confrontare i kit di estrazione impiegati in associazione alla tecnica di prelievo, considerando la concentrazione (ng/ μ L), con l'analisi ANOVA
- 3) confrontare i kit di estrazione impiegati in associazione alla tecnica di prelievo, considerando l'indice di degradazione (DI), con il *test* non parametrico di *Mann-Whitney U*

3.1.1 Effetto del trattamento con vapori di cianoacrilato sulla concentrazione di DNA

Al fine di valutare se il trattamento con vapori di cianoacrilato (VCA) influenzi significativamente i parametri di quantificazione del DNA rispetto ai campioni non trattati (VST), sono state

condotte analisi della varianza ad un fattore. Le variabili dipendenti considerate sono: la concentrazione di DNA totale (ng/μL) e il *Degradation Index* (DI).

Il campione VST_13 è stato escluso dall'analisi in quanto i valori di concentrazione di DNA e di *Degradation Index* registrati (rispettivamente 63,6263 ng/μL e 979,55) risultano del tutto incompatibili con la distribuzione degli altri campioni del gruppo e sono verosimilmente riconducibili a una contaminazione esogena del campione.

I risultati sono riportati nella tabella 7.

Tabella 7: Confronto concentrazione DNA (ng/μL) tra campioni non trattati (VST) e trattati con cianoacrilato (VCA) per tipo di prelievo. * $p < 0,05$

Tipo di prelievo	VST – media (ng/μL)	VCA – media (ng/μL)	F	p-value	Sig.
Acqua	0,0095	0,0060	4,0265	0,0601	No
Secco	0,0172	0,0058	4,9696	0,0396	Si *
EtOH	0,0141	0,0127	0,0794	0,7813	No

Trattandosi di condizioni di prelievo indipendenti tra loro, i risultati sono stati valutati singolarmente per ciascuna modalità ($p < 0,05$):

– Acqua: la concentrazione media di DNA non differisce significativamente tra VST (0,0095 ng/μL) e VCA (0,0060 ng/μL) [F (1,18) = 4,03; $p = 0,060$].

– Secco: la concentrazione media di DNA è significativamente più bassa nei campioni VCA (0,0058 ng/μL) rispetto ai VST (0,0172 ng/μL) [F (1,17) = 4,97; $p = 0,040$].

– Etanolo: la concentrazione media di DNA non differisce significativamente tra VST (0,0141 ng/μL) e VCA (0,0127 ng/μL) [F (1,18) = 0,08; $p = 0,781$].

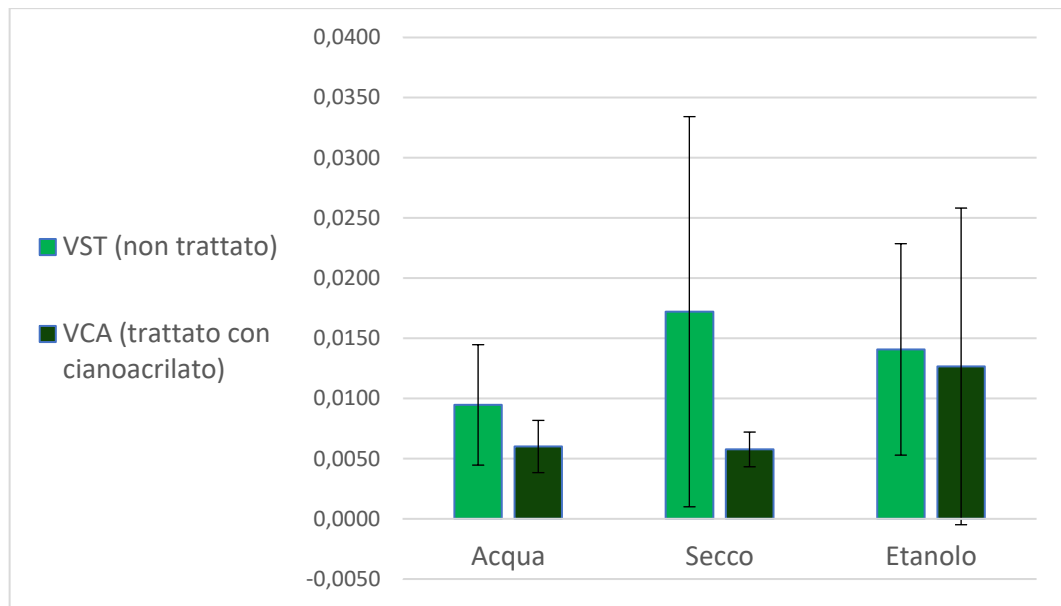


Figura 20: Concentrazione di DNA (media $\pm$ deviazione standard) per modalità di prelievo, a confronto tra vetro non trattato (VST) e vetro trattato con cianoacrilato (VCA). L'unico confronto statisticamente significativo è: Secco; $p = 0,0396$

Sebbene la differenza non raggiunga la significatività statistica per le modalità Acqua ed Etanolo, in tutte e tre le condizioni si osserva una riduzione della concentrazione media di DNA dopo il trattamento con cianoacrilato, pari al 36,5% per l'acqua, al 66,5% per il prelievo a secco e al 10,0% per l'etanolo, rispetto alla corrispondente condizione non trattata (VST).

3.1.2 Confronto della concentrazione di DNA tra *kit* di estrazione e tecnica di prelievo

Per verificare se la scelta del *kit* di estrazione e il tipo di prelievo producano differenze nella concentrazione di DNA estratto, è stata condotta un'analisi ANOVA con sei gruppi, definiti dalla combinazione: tipo di prelievo $\times$ *kit* estrattivo (Tabella 8).

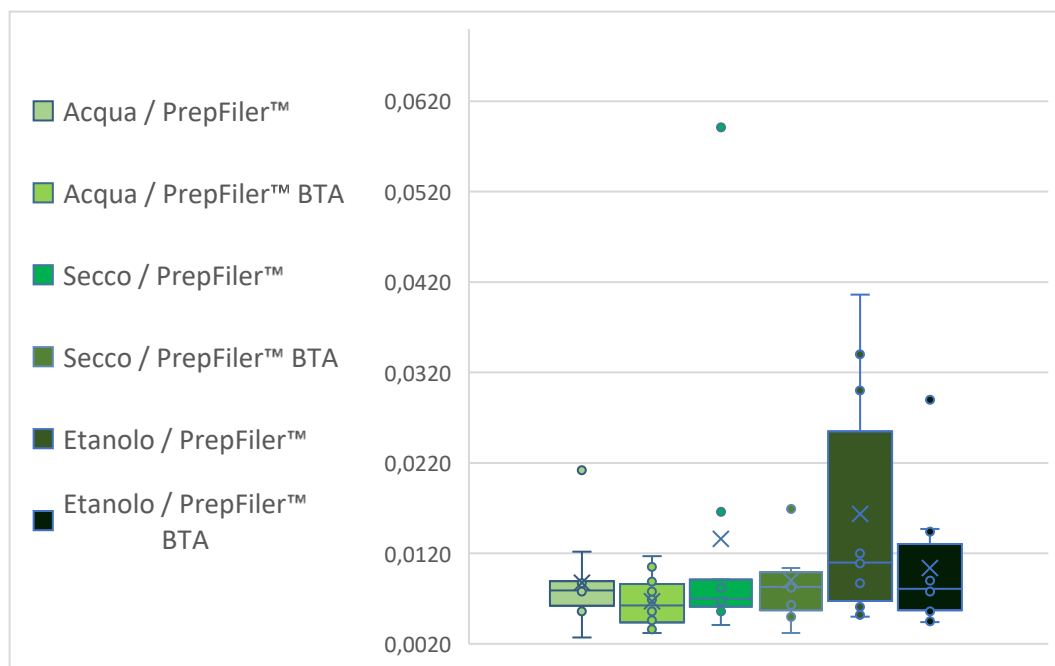


Figura 21: Distribuzione della concentrazione di DNA nei sei gruppi sperimentali (modalità di prelievo $\times$ *kit* di estrazione), con campioni VST e VCA unificati, rappresentata mediante grafico a scatola e baffi (box-and-whisker plot): la linea all'interno della scatola indica la mediana, la scatola racchiude l'intervallo interquartile (IQR), i baffi si estendono fino al valore più estremo che rientra nel limite di normalità definito dal criterio escludendo eventuali valori anomali.

In ciascun gruppo i campioni VST e VCA sono stati unificati, poiché l'obiettivo è confrontare le condizioni di raccolta e di estrazione indipendentemente dal trattamento con cianoacrilato.

L'ANOVA non evidenzia differenze statisticamente significative tra i sei gruppi [$F(5,53) = 1,31$; $p = 0,273$].

Non vi è evidenza significativa tra il tipo di prelievo ed il *kit* estrattivo applicati.

Il gruppo Etanolo/PrepFiler™ presenta una dispersione dei valori nettamente superiore a quella delle altre condizioni sperimentali ($IQR \approx 0,019$ ng/μL rispetto a 0,003–0,007 ng/μL). Tale variabilità è attribuibile a tre campioni (VST_24, VCA_22 e VCA_21), le cui concentrazioni risultano più elevate rispetto ai restanti sette. Poiché questi campioni appartengono sia alla serie trattata sia a quella non trattata, la dispersione osservata non è riconducibile al trattamento con cianoacrilato, bensì alla variabilità intrinseca del deposito di *touch* DNA. L'elevata varianza

intra-gruppo riduce la potenza statistica dell'ANOVA e spiega l'assenza di differenze significative. Tale risultato non consente tuttavia di concludere che le condizioni sperimentali siano equivalenti. In ambito forense, infatti, una differenza di un ordine di grandezza (da 0,002 a 0,02 ng/ μ L) corrisponde a un *input* di amplificazione di circa 15 pg anziché 150 pg di DNA, collocando il campione in prossimità della soglia del *low template* DNA, al di sotto della quale si accentuano gli effetti stocastici. Tale evidenza trova riscontro nei profili ottenuti all'interno del medesimo gruppo: il campione VCA_21 (0,0406 ng/ μ L) ha prodotto un profilo completo, mentre il campione VCA_24 (0,0052 ng/ μ L) ha mostrato un *drop-out* allelico pari al 23,9%.

Tabella 8: Medie di concentrazione DNA (ng/ μ L) nei sei gruppi sperimentali (tipo di prelievo $\times$ kit estrattivo), campioni VST e VCA unificati, DS= deviazione standard

Condizione (gruppo)	Media conc. (ng/ μ L)	DS
I – Acqua PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit	0,0088	0,0050
II – Acqua PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit	0,0067	0,0030
III – Secco PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit	0,0136	0,0174
IV – Secco PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit	0,0090	0,0048
V – EtOH PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit	0,0164	0,0132
VI – EtOH PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit	0,0104	0,0075

3.1.3 Confronto del *Degradation Index* tra kit di estrazione e tecnica di prelievo

La distribuzione del DI nei campioni trattati presenta asimmetria e valori estremi, rendendo inappropriato il ricorso a test parametrici che assumono la normalità. I confronti tra gruppi sono stati pertanto eseguiti con il test non parametrico di *Mann-Whitney U* (Tabella 9).

Tabella 9: *Degradation Index (DI)* dei campioni VCA nei sei gruppi sperimentali. Il gruppo con DI medio più elevato (Acqua BTA) è evidenziato in rosso. il gruppo con DI medio più basso (EtOH NO BTA) è evidenziato in verde.

Condizione (gruppo)	Media DI (VCA)	DS
I – Acqua PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit	1,448	0,830
II – Acqua PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit	2,864	1,063
III – Secco PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit	1,680	0,763
IV – Secco PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit	1,614	0,421
V – EtOH PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit	1,192	0,191
VI – EtOH PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit	2,532	1,801

Il gruppo Etanolo/PrepFiler™ è quello con il DI medio più basso tra quelli analizzati ($1,19 \pm 0,19$), nettamente inferiore al valore massimo osservato (2,86). Si distingue inoltre per la deviazione *standard* più contenuta tra tutti i gruppi sperimentali (0,191), a indicare una maggiore omogeneità e quindi una minore variabilità dei valori di DI tra i campioni in esame.

All'interno del gruppo Acqua/PrepFiler™ BTA, il valore di DI = 4,71 (campione VCA_9) rappresenta un valore estremo secondo il criterio di Tukey [70]: applicando la regola del *range* interquartile ai cinque valori del gruppo ($Q1 = 2,39$; $Q3 = 2,76$; $IQR = 0,37$), il limite superiore di accettabilità è pari a $Q3 + 1,5 \times IQR = 3,32$, valore superato dal DI di VCA_9.

È importante notare che, escludendo tale valore estremo, la media del gruppo si attesta a $\approx 2,40$, un valore che, pur costituendo il risultato peggiore tra i sei gruppi, non indica una frammentazione severa del DNA.

3.2 Risultati elettroforesi capillare

Sulla base dei risultati di quantificazione, per ciascuna condizione sperimentale sono stati selezionati, per la successiva tipizzazione, i campioni con la maggiore e la minore concentrazione di DNA rilevata, come riportato in tabella 10.

Tabella 10: Campioni selezionati per la tipizzazione in base alla concentrazione (maggiore e minore), per ciascuna combinazione di modalità di prelievo e kit di estrazione nelle serie VST e VCA.

Modalità di prelievo	Kit estrazione	Campione	Large Autosomal (ng/μL)	Small Autosomal (ng/μL)	DI
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_5 (maggiore)	0,0162	0,0212	1,31
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_1 (minore)	0,0071	0,0062	0,88
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_10 (maggiore)	0,0094	0,0117	1,24
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_6 (minore)	0,0053	0,0036	0,69
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_15 (maggiore)	0,0632	0,0591	0,94
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_12 (minore)	0,0118	0,0082	0,7

Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_16 (maggiore)	0,0166	0,0177	1,07
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_19 (minore)	0,0032	0,0084	2,61
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_24 (maggiore)	0,0196	0,03	1,53
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_23 (minore)	0,005	0,0087	1,76
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_28 (maggiore)	0,0184	0,029	1,58
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VST_30 (minore)	0,0028	0,0044	1,56
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_1 (maggiore)	0,0107	0,0087	0,82
Acqua	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_4 (minore)	0,0026	0,0027	1,02

Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_6 (maggiore)	0,0039	0,0078	2,04
Acqua	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_9 (minore)	0,0007	0,0032	4,71
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_11 (maggiore)	0,0058	0,0067	1,16
Secco	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_13 (minore)	0,0027	0,0041	1,55
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_18 (maggiore)	0,0043	0,0082	1,92
Secco	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_16 (minore)	0,0022	0,0032	1,43
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_21 (maggiore)	0,0321	0,0406	1,27
Etanolo	<i>PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_24 (minore)	0,0035	0,0052	1,49

Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_26 (maggiore)	0,0042	0,0084	1,99
Etanolo	<i>PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit</i>	VCA_28 (minore)	0,0036	0,0045	1,25

I profili ottenuti dei 24 campioni sono stati confrontati con il genotipo del campione di raffronto (Tabella 11), al fine di determinare eventuali eventi di *stutter*, *drop-in* e *drop-out* allelico nei campioni di *touch* DNA analizzati.

Tabella 11: Profilo genetico del campione di raffronto.

Locus	Allele 1	Allele 2
D3S1358	15	16
vWA	15	16
D16S539	12	15
CSF1PO	12	12
TPOX	8	8
Yindel	2	—
AMEL	X	Y
D8S1179	12	13
D21S11	30.2	32.2
D18S51	16	16
DYS391	9	—
D2S441	11	14
D19S433	13	16.2
TH01	6	8
FGA	23	24
D22S1045	14	17

D5S818	11	12
D13S317	11	12
D7S820	11	12
SE33	24.2	29.2
D10S1248	12	16
D1S1656	14	15.3
D12S391	18	18.3
D2S1338	17	17

In tabella 12 e 13 sono quindi riportati i profili genetici dei campioni analizzati evidenziando le differenze riscontrate rispetto al campione di riferimento.

Tabella 12: profili genetici ottenuti per i campioni del gruppo VCA (trattati). Il trattino (–) indica l'assenza di segnale allelico rilevabile al locus indicato; i valori in giallo indicano il rilevamento di un solo allele a fronte di due alleli attesi in eterozigosi (eventi di drop-out).

Locus	VCA_ 1	VCA_ 4	VCA_ 6	VCA_ 9	VCA_ 11	VCA_ 13	VCA_ 16	VCA_ 18	VCA_ 21	VCA_ 24	VCA_ 26	VCA_ 28
D3S1358	15,16 <i>stutter</i>	15,16	15,16	15,16	15,16 <i>stutter</i>	15,16	15,16	15,16	15,16	15	15,16	15,16
vWA	15,16	15	15,16	16	15,16	15,16	15	15,16	15,16	16	15,16	16
D16S539	12,15	15 <i>drop-in</i>	12,15	–	12,15	15	–	12 <i>stutter</i>	12,15	12 <i>stutter</i>	12,15	–
CSF1PO	12,12	12,12	12,12	–	12 <i>stutter</i>	–	–	12,12	12,12	12,12	–	–
TPOX	8,8	8,8	–	8,8	8 <i>drop-in</i>	8,8	8,8	8,8	8,8	–	–	–
Yindel	2	–	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
AMEL	X,Y	X,Y	Y	X	X,Y	X,Y	Y	X,Y	X,Y	X	X,Y	X,Y
D8S1179	12,13	13 <i>drop-in</i>	12,13	12	12,13	12,13	12,12	12,13	12,13	12,13	12,13	12,13 <i>stutter</i>
D21S11	30.2,32 .2	30.2,32 .2	30.2	–	30.2,32 .2	30.2,32 .2	30.2	32.2	30.2,32 .2	30.2,32 .2	30.2,32 .2	–
D18S51	16,16	16,16	16,16	–	16,16	16,16	–	16,16	16,16	16,16	–	16
DYS391	9	9	9	–	9	–	9	9,9	9	9	9	–
D2S441	11,14	11,14 <i>stutter</i>	11,14	11 <i>stutter</i>	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14

D19S433	13,16.2	13,16.2	13,16.2	13,16.2	13,16.2	13,16.2 <i>stutter</i>	13,16.2	13	13,16.2	13,16.2	13,16.2	13,16.2
TH01	6,8	6	6,8	6	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	8 <i>stutter</i>	6,8
FGA	23,24	24	24	23	23,24	– <i>drop-in</i>	23,24	23,24	23,24	23,24	24 <i>drop-in</i>	24
D22S1045	14,17	14,17	14,17 <i>drop-in</i>	14	14,17 <i>stutter</i>	14	14	14,17	14,17	14,17	14,17	14,17
D5S818	11,12	11	11,12	–	11,12	11,12	–	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12
D13S317	11,12	12	11	12	11,12	–	–	–	11,12	11,12	11,12	12
D7S820	11,12	– <i>drop-in</i>	–	–	11 <i>stutter</i>	11	–	12	11,12	–	11,12	12
SE33	29.2	29.2 <i>drop-in</i>	24.2	–	24.2,29 .2	–	29.2	24.2	24.2,29 .2	– <i>drop-in</i>	24.2,29 .2	29.2
D10S1248	12,16	12,16	12,16	–	12,16 <i>stutter</i>	12,16	12	12,16	12,16	12,16	16 <i>stutter</i>	12,16
D1S1656	14,15.3	14,15.3	14,15.3	14,15.3	14,15.3	14	14,15.3	14,15.3	14,15.3	14,15.3	–	14,15.3
D12S391	18,18.3	–	18,18.3	–	18,18.3	18.3	18	18	18,18.3	–	18,18.3 <i>drop-in</i>	18,18.3
D2S1338	17,17	–	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17 <i>drop-in</i>	17,17

Tabella 13: Profili ottenuti per i campioni del gruppo VST (non trattati) ai 24 marcatori analizzati (notazione come in Tabella 12).

Locus	VST_1	VST_5	VST_6	VST_10	VST_12	VST_15	VST_16	VST_19	VST_23	VST_24	VST_28	VST_30
D3S1358	15,16	15,16	15,16 <i>drop-in</i>	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16
vWA	16	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16	15,16
D16S539	–	12,15	12,15	12,15	12,15	12,15	12,15	12,15	12,15	12,15	12,15	12,15
CSF1PO	12,12	12,12	12,12	12,12	12,12	12,12	12,12	12,12	–	12,12	12,12	12,12
TPOX	–	8,8	–	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8
Yindel	–	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
AMEL	X,Y	X,Y	X,Y	X,Y	X	X,Y	X,Y	X,Y	X,Y	X,Y	X,Y	X,Y
D8S1179	12,13	12,13	12,13 <i>stutter</i>	12,13	12,13	12,13	12,13	12,13	12,13	12,13	12,13	12,13
D21S11	32.2	30.2,32 .2	30.2,32 .2	30.2,32 .2 <i>drop-in</i>	32.2	30.2,32 .2	30.2,32 .2	30.2,32 .2	30.2,32 .2	30.2,32 .2	30.2,32 .2	30.2,32 .2

D18S51	16,16	16,16	16,16	16,16	16,16	16,16 <i>stutter</i>	16,16	16,16	16,16	16,16	16,16	16,16
DYS391	9	9	9	9 <i>stutter</i>	9	9	9	9	9	9	9	9
D2S441	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14
D19S433	13,16.2	13,16.2	16.2	13,16.2	13,16.2	13,16.2	13,16.2	13,16.2	13,16.2	13,16.2	13,16.2	13,16.2
TH01	6,8	6,8	6	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
FGA	23,24	23,24	23,24	23,24	23,24	23,24	23,24	23,24	23	23,24	23,24	23,24
D22S1045	14	14,17	14,17	14,17	14,17	14,17	14,17	14	14,17	14,17	14,17	14,17
D5S818	–	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12
D13S317	11,12	11,12	12	11,12	11,12	11,12	11,12	11	11,12 <i>drop-in</i>	11,12	11,12	11,12
D7S820	–	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12
SE33	24.2,29 .2	24.2,29 .2	– <i>drop-in</i>	24.2,29 .2 <i>drop-in</i>	24.2,29 .2	24.2,29 .2	24.2,29 .2	29.2	29.2	24.2,29 .2	24.2,29 .2	24.2,29 .2
D10S1248	12	12,16	12,16	12,16	12,16	12,16	12,16	12,16	12,16	12,16	12,16	12,16
D1S1656	15.3	14,15.3	14 <i>drop-in</i>	14,15.3	14,15.3	14,15.3	14,15.3	14,15.3	14,15.3	14,15.3	14,15.3	14,15.3
D12S391	–	18,18.3	18,18.3	18,18.3	18,18.3	18,18.3	18,18.3	18,18.3	18,18.3	18,18.3	18,18.3	18,18.3 <i>drop-in</i>
D2S1338	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17	17,17

Oltre alla corrispondenza allelica rispetto al profilo di raffronto, i campioni sono stati comparati tra loro considerando: altezza media dei picchi espressa in RFU, il numero di eventi di *stutter*, *drop-in* e *drop-out* allelico. Gli eventi di *drop-out* sono riportati in valore assoluto e in percentuale, quest'ultima calcolata rispetto al numero totale di posizioni alleliche attese sulla base del profilo di raffronto (n = 46, ottenuto sommando gli alleli attesi ai 24 loci del pannello STR: due per ciascun locus eterozigote, uno per ciascun locus omozigote). La percentuale di *drop-out* rappresenta pertanto la proporzione di alleli attesi non rilevati nel profilo del campione, e consente un confronto standardizzato tra campioni, indipendentemente dal numero di loci tipizzabili

I risultati per i singoli campioni sono riportati in tabella 14 (gruppo VCA, trattati) e in tabella 15 (gruppo VST, non trattati).

Tabella 14: Valutazione dei profili genetici ottenuti in relazione all'altezza media, espressa in RFU, e agli effetti stocastici rilevabili quali stutter, drop-in, drop-out, rispetto all'atteso.

Campione	Altezza media (RFU)	n. stutter	n. drop-in	n. drop-out	% drop-out
VCA_1	457,1	1	0	1	2,2%
VCA_4	269,1	0	4	15	32,6%
VCA_6	451,9	0	1	9	19,6%
VCA_9	218,7	1	0	27	58,7%
VCA_11	413,8	4	1	1	2,2%
VCA_13	236,0	1	1	14	30,4%
VCA_16	223,0	0	0	19	41,3%
VCA_18	238,5	1	0	8	17,4%
VCA_21	1057,7	0	0	0	0,0%
VCA_24	264,5	1	2	11	23,9%
VCA_26	314,6	2	3	11	23,9%
VCA_28	221,0	1	0	15	32,6%

Tabella 15: Valutazione dei profili genetici ottenuti in relazione all'altezza media, espressa in RFU, e agli effetti stocastici rilevabili quali stutter, drop-in, drop-out, rispetto all'atteso

Campione	Altezza media (RFU)	n. stutter	n. drop-in	n. drop-out	% drop-out
VST_1	228,3	0	0	16	34,8%
VST_5	1503,4	0	0	0	0,0%
VST_6	314,1	1	3	8	17,4%
VST_10	1194,2	0	2	0	0,0%
VST_12	448,6	0	0	2	4,3%
VST_15	1233,6	1	0	0	0,0%
VST_16	3342,4	0	0	0	0,0%
VST_19	348,4	0	0	3	6,5%
VST_23	539,1	0	1	4	8,7%
VST_24	1223,0	0	0	0	0,0%
VST_28	2220,3	0	0	0	0,0%
VST_30	892,0	0	1	0	0,0%

Il confronto tra i due gruppi evidenzia una differenza sia nell'intensità del segnale sia nella completezza dei profili. Infatti, nei campioni VCA (trattati) l'altezza media dei picchi allelici è pari a 363,8 RFU, con una percentuale media di *drop-out* del 23,7% e un solo campione (VCA_21) privo di eventi di *drop-out*. Nei campioni VST (non trattati) l'altezza media è pari a 1123,9 RFU, circa tre volte superiore, con una percentuale media di *drop-out* del 6,0% e sette campioni su dodici privi di eventi di *drop-out*.

3.3 Risultati analisi software *LRmixStudio*

I risultati della valutazione statistica di contribuzione per ciascun campione sono riportati in tabella 16.

Tabella 16: Risultati dell'analisi probabilistica con LRmix Studio v2.1.5 per i 23 campioni analizzati (12 VCA, 11 VST). Per ciascun campione sono riportati: il numero di loci inclusi nel calcolo su 21 analizzati (esclusi Amelogenina, Yindel e DYS391), la percentuale di drop-out allelico osservato, la probabilità di drop-out stimata dal software ($Pr(drop-out)$), il likelihood ratio complessivo (LR) e il corrispondente $\log_{10}(LR)$. I loci disabilitati sono quelli esclusi dall'analisi poiché caratterizzati da drop-out allelico completo (profili parziali).

Campione	Loci LRmix (su 21)	Loci disabilitati		%drop-out	$Pr(drop-out)$	LR complessivo	$\log_{10}(LR)$	Non Contributor test – valore massimo
VCA_1	21/21	—		2,2%	0,19	$6,43413 \times 10^{26}$	26,808	-29,272
VCA_4	18/21	D2S1338 D12S391 D7S820		32,6%	0,44	$3,72981 \times 10^{14}$	14,572	-14,621
VCA_6	19/21	D7S820 TPOX		19,6%	0,32	$4,47801 \times 10^{21}$	21,651	-15,539
VCA_9	12/21	D10S1248 D16S539 D21S11 D18S51 D12S391 D7S820 CSF1PO D5S818 SE33		58,7%	0,54	$1,74476 \times 10^8$	8,242	-2,599
VCA_11	21/21	—		2,2%	0,21	$1,82027 \times 10^{26}$	26,260	-28,662
VCA_13	17/21	FGA CSF1PO D13S317 SE33		30,4%	0,35	$2,05221 \times 10^{18}$	18,312	-15,541
VCA_16	14/21	D16S539 D18S51 D7S820 CSF1PO D13S317 D5S818 SE33		41,3%	0,47	$2,38808 \times 10^{12}$	12,378	-3,920
VCA_18	20/21	D13S317		17,4%	0,36	$1,54583 \times 10^{18}$	18,189	-9,358
VCA_21	21/21	—		0,0%	0,17	$2,74661 \times 10^{28}$	28,439	-25,273
VCA_24	18/21	D12S391 D7S820 TPOX		23,9%	0,31	$1,18639 \times 10^{19}$	19,074	-15,376
VCA_26	17/21	D18S51 D1S1656 CSF1PO TPOX		23,9%	0,25	$1,92762 \times 10^{21}$	21,285	-21,173
VCA_28	17/21	D16S539 D21S11 CSF1PO TPOX		32,6%	0,33	$5,22220 \times 10^{17}$	17,718	-5,085

VST_1	16/21	D16S539 D12S391 D7S820 TPOX D5S818		34,8%	0,37	$1,36716 \times 10^{16}$	16,136	-11,319
VST_5	21/21	—		0,0%	0,16	$3,06233 \times 10^{28}$	28,486	-31,442
VST_6	19/21	TPOX SE33		17,4%	0,28	$2,06719 \times 10^{18}$	18,315	-20,054
VST_10	21/21	—		0,0%	0,16	$3,06233 \times 10^{28}$	28,486	-32,282
VST_12	21/21	—		4,3%	0,19	$5,69499 \times 10^{26}$	26,755	-28,382
VST_15	21/21	—		0,0%	0,16	$3,06233 \times 10^{28}$	28,486	-32,400
VST_16	21/21	—		0,0%	0,16	$3,06233 \times 10^{28}$	28,486	-30,563
VST_19	21/21	—		6,5%	0,25	$1,10197 \times 10^{25}$	25,042	-24,592
VST_23	20/21	CSF1PO		8,7%	0,20	$1,32312 \times 10^{25}$	25,122	-28,747
VST_24	21/21	—		0,0%	0,17	$2,74661 \times 10^{28}$	28,439	-30,125
VST_30	21/21	—		0,0%	0,17	$2,74661 \times 10^{28}$	28,439	-30,790

Il confronto tra il $\log_{10}$ (LR) del POI e il valore massimo del *Non Contributor test* mostra, per tutti i campioni, uno ampio scarto tra le due grandezze.

4. DISCUSSIONI

I risultati ottenuti sono stati analizzati e confrontati al fine di valutare l'effetto del trattamento con cianoacrilato sulla qualità e sulla concentrazione del DNA estratto da impronte latenti depositate su vetro. Il seguente capitolo integra i dati di quantificazione, i profili genetici ottenuti mediante elettroforesi capillare e gli esiti dell'analisi statistica, evidenziando le principali differenze riscontrate tra le condizioni sperimentali.

Le concentrazioni di DNA misurate in tutti i campioni (con la sola eccezione di VST_13, escluso per probabile contaminazione) si collocano in un intervallo compreso tra circa 0,003 e 0,059 ng/ μ L, coerente con quanto riportato in letteratura per il *touch* DNA da impronte digitali, dove le quantità trasferite sono tipicamente nell'ordine di pochi nanogrammi [71].

Il confronto tra campioni provenienti da vetro non trattato (VST) e vetro trattato con vapori di cianoacrilato (VCA) mostra che in tutti e tre i tipi di prelievo la concentrazione media del gruppo VST è superiore a quella del gruppo VCA. Tuttavia, questa differenza raggiunge la significatività statistica solo per il prelievo a secco [$F(1,17) = 4,97$; $p = 0,040$], mentre per i prelievi con acqua [$p = 0,060$] e con etanolo [$p = 0,781$] non si osserva differenza statisticamente significativa. Pertanto, non è corretto affermare in modo generalizzato che il trattamento con cianoacrilato riduca il DNA recuperabile: i dati supportano questa conclusione soltanto per la modalità di prelievo a secco nelle condizioni testate.

La letteratura offre un quadro interpretativo plausibile per la riduzione osservata. *Holtkötter et al.* (2002) [72] hanno dimostrato che il cianoacrilato può interferire con l'efficienza della PCR, in particolare nei campioni di dimensioni ridotte, suggerendo che il polimero formatosi durante la fumigazione possa agire sia come barriera fisica all'accesso degli enzimi durante l'estrazione, sia come inibitore dell'amplificazione. I presenti dati su substrato vetro, pur non consentendo di stabilire il meccanismo causale, sono compatibili con questa ipotesi. La differenza osservata per il prelievo a secco potrebbe riflettere il fatto che tale modalità non prevede l'utilizzo di solventi che possano veicolare il DNA attraverso il polimero di cianoacrilato, rendendo la barriera fisica più rilevante.

La distribuzione del *Degradation Index* nei campioni trattati presenta asimmetria e valori estremi, rendendo inappropriato il ricorso a test parametrici che assumono la normalità; i confronti tra gruppi sono stati pertanto eseguiti con il test non parametrico di *Mann-Whitney U*. I campioni VCA mostrano tendenzialmente valori di DI superiori rispetto ai corrispondenti VST. I due gruppi con la media più elevata sono Acqua BTA (DI medio = $2,86 \pm 1,06$) ed EtOH BTA

(DI medio = $2,53 \pm 1,80$), entrambi caratterizzati da valori singoli estremi: nel gruppo Acqua BTA il campione VCA_9 raggiunge un DI di 4,71, mentre nel gruppo EtOH BTA il campione VCA_29 registra il valore massimo dell'intero *dataset* (DI = 5,69). È importante notare che, escludendo i rispettivi *outlier*, le medie dei due gruppi si attestano rispettivamente intorno a 2,40 e 2,03 — valori che, pur costituendo i risultati peggiori tra i sei gruppi VCA, non indicano una frammentazione incompatibile con la tipizzazione STR. Anche il DI più elevato osservato in assoluto (VCA_29: DI = 5,69) rimane in un *range* che la letteratura di settore non considera preclusivo di un'amplificazione efficace, sebbene associato a un rischio aumentato di *drop-out* allelico ai loci con frammenti di maggiori dimensioni [73].

La scelta del *kit* di estrazione non ha mostrato influenza sulla concentrazione del DNA [F (5,53) = 1,31; $p = 0,273$], indicando che le due metodiche garantiscono una resa estrattiva equivalente nelle condizioni testate.

L'analisi dell'elettroforesi capillare evidenzia una netta disparità nella completezza dei profili tra i due gruppi: tra i campioni VST, 7 su 12 presentano un profilo privo di *drop-out* (0%); tra i campioni VCA, solo 2 su 12 (VCA_1 e VCA_21) mostrano la stessa completezza. Il campione VCA_9 — il peggiore del gruppo VCA nella quantificazione (0,0027 ng/μL, DI = 4,71) — registra un *drop-out* del 58,7%. Per contro, VCA_21 (0,0406 ng/μL, DI = 1,27) produce un profilo completamente informativo. Si osserva pertanto, come nota, una correlazione tra concentrazione di DNA e completezza del profilo. Pertanto, la concentrazione del DNA rappresenta un predittore importante della qualità del profilo [74]. Coerentemente, l'altezza media dei picchi allelici risulta più che tre volte superiore nei campioni VST (1123,9 RFU) rispetto ai campioni VCA (363,8 RFU), con una percentuale media di *drop-out* allelico rispettivamente pari al 6,0% e al 23,7%. Il trattamento con cianoacrilato risulta pertanto associato, oltre che a una minore concentrazione di DNA, anche a una riduzione dell'intensità del segnale elettroforetico e a una maggiore incidenza di eventi di *drop-out* allelico.

L'aspetto più rilevante è che, nonostante la variabilità nei livelli di *drop-out* e nella completezza dei profili, tutti i 23 campioni analizzati producono valori di LR favorevoli all'ipotesi accusatoria, ovvero per i profili genetici analizzati è circa 10^{15} volte più probabile che il POI sia il contributore unico alla traccia rispetto ad altro soggetto casuale non noto, ovvero in accordo con la conversione verbale ENFSI [75] vi è un supporto estremamente forte alla proposizione di contribuzione del soggetto di riferimento rispetto ad altro soggetto casuale non noto, con nessun profilo casuale della popolazione capace di eguagliare o superare l'LR del POI.

I dati del presente studio forniscono importanti indicazioni sulle tecniche analitiche di prelievo ed estrazione da applicare un caso di impronte digitali latenti trattate con cianoacrilato. Si conferma infatti che la concentrazione e la qualità del DNA sono complessivamente minori rispetto ai campioni non trattati; tuttavia, si è dimostrata la possibilità di ottenere profili genetici utili anche a seguito di trattamento. Tra i campioni VCA, il prelievo in etanolo senza BTA appare associato ai DI più bassi (media = $1,19 \pm 0,19$), suggerendo che questa combinazione potrebbe rappresentare un approccio preferibile quando si intenda procedere con l'analisi del DNA dopo la fumigazione con cianoacrilato.

Alcune limitazioni devono essere trattate. La dimensione campionaria per sottogruppo limita il potere statistico delle analisi. In letteratura la potenza considerata adeguata è pari all'80% ($\alpha = 0,05$), e la numerosità necessaria per raggiungerla dipende dall'entità della differenza che si intende rilevare. Con 5 repliche per gruppo, una potenza dell'80% consente di rilevare soltanto differenze di entità molto elevata (d di *Cohen* $\geq 2,02$). È quindi verosimile che differenze reali ma di minore entità, non siano risultate statisticamente significative. Per rilevare un effetto di entità elevata ($d \approx 0,8$) con la medesima potenza sarebbero necessarie almeno 26 repliche per gruppo [76]. Inoltre, lo studio è stato condotto su un singolo substrato (vetro) e con un unico donatore limitando la valutazione dovuta alla variabilità interindividuale e inter-substrato. La deposizione delle impronte in condizioni controllate non replica la complessità delle tracce latenti rinvenute sulla scena del crimine, dove il materiale biologico può essere ulteriormente degradato da fattori ambientali, e il grado di contaminazione è incontrollabile.

5. CONCLUSIONI

Negli ultimi anni, il progressivo affinamento delle tecniche di genetica forense ha reso possibile l'analisi del DNA a partire da quantità infinitesimali di materiale biologico, aprendo la strada all'utilizzo del *touch* DNA come fonte di evidenza nell'indagine criminalistica [74]. Parallelamente, la dattiloscopia ha consolidato il proprio ruolo nell'identificazione forense, affinando i metodi di esaltazione delle impronte latenti [77]. La convergenza di queste due discipline sulla medesima traccia biologica configura uno scenario di notevole potenziale investigativo. Tuttavia, questa convergenza solleva una questione tecnica: le procedure chimiche impiegate per sviluppare l'impronta sono compatibili con il successivo recupero del DNA? La risposta a questa domanda determina se le due analisi possano essere condotte in sequenza sulla stessa traccia oppure se la priorità assegnata all'una precluda l'altra, con implicazioni dirette sul protocollo operativo adottato nella gestione del caso [78].

Sulla base dei risultati ottenuti è stato possibile verificare che il trattamento con vapori di cianoacrilato è compatibile con il successivo recupero di DNA dalle impronte digitali su vetro, sebbene sia associato ad una riduzione della concentrazione di DNA e a una maggiore frequenza di profili STR parziali. In ogni caso comunque è stato possibile ottenere profili genetici che possono consentire un'attribuzione statistica significativa.

Il presente studio costituisce un contributo preliminare, e come tale sconta i limiti intrinseci di un disegno sperimentale controllato: la ridotta numerosità campionaria per sottogruppo, l'impiego di un unico substrato e di un unico donatore, e la deposizione dell'impronta in condizioni standardizzate che non riproducono la complessità delle tracce reali.

Studi futuri con casistiche ampliate, substrati diversificati e donatori multipli saranno pertanto necessari.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Raven PH, Johnson GB, Mason KA, Losos JB, Singer SR. *Elementi di biologia e genetica*. 2^a ed. Padova: Piccin-Nuova Libreria; 2018.
2. Campbell NA, Reece JB. *Principi di biologia*. Milano: Pearson Italia; 2010.
3. Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Carroll S.B., Doebley J. *Introduzione all'analisi genetica*. 11^a ed. Bologna: Zanichelli; 2016.
4. Zhang Z. *Laws of genome nucleotide composition*. *Brief Bioinform*; 2024.
5. Watson, J., Crick, F. *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. *Nature*; 1953.
6. International Human Genome Sequencing Consortium. *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature*; 2001.
7. Tagliabracci A. *Introduzione alla genetica forense. Indagini di identificazione personale e paternità*. Milano: Springer; 2010.
8. Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. 2nd Edition. Elsevier Academic Press; 2010.
9. Caramelli D. *Antropologia molecolare: Il genoma umano*. Firenze University Press; 2009.
10. Sato M, Kakui Y. *Tell the difference between mitosis and meiosis: interplay between chromosomes, cytoskeleton, and cell cycle regulation*. *Cells*; 2021.
11. *Beyond STRs: The Role of Diallelic Markers in Forensic Genetics*. *Forensic Sci Int Genet*; 2012.
12. *Forensic DNA Typing: SNP Review*. *Electrophoresis*; 2005.
13. *Forensic Autosomal STRs and Their Potential Association With Phenotype*. *Forensic Sci Int Genet*; 2020.
14. *DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG). Recommendations on the use of STR sequence nomenclature*. *Forensic Sci Int Genet*; 2016.
15. *Common forensic Y-STR markers*. *Forensic Sci Int Genet*; 2018.
16. *CODIS Core Loci: FBI Combined DNA Index System*.

17. Purps, J., et al. *A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci*; 2014.
18. Butler E, Li R. *Forensic Science Program, Department of Sciences, John Jay College of Criminal Justice, The City University of New York, New York, NY 10019, USA. Genetic Markers for Sex Identification in Forensic DNA Analysis*.
19. Nothnagel M, Szibor R, Vollrath O, Augustin C, Edelmann J, Geppert M, et al. *Collaborative genetic mapping of 12 forensic short tandem repeat (STR) loci on the human X chromosome. Forensic Sci Int Genet*; 2009.
20. Butler, J.M. *Fundamentals of Forensic DNA Typing: Methodology (2nd ed.)*. Academic Press/Elsevier; 2012.
21. Shaler, R.C. *Modern forensic biology in: Forensic Science Handbook Volume I, 2^a edizione*; 2002.
22. Dobosz M. *Principi di medicina legale e di biologia forense nelle scienze per l'investigazione e la sicurezza*. Roma: Aracne; 2013.
23. Campbell IM, Shaw CA, Stankiewicz P, Lupski JR. *Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. Trends in Genetics*; 2015.
24. Bertillon A. *Identification anthropométrique, instructions signalétiques*. Melun: Imprimerie Administrative; 1893.
25. *How fingerprints came into use for personal identification. Journal of the American Academy of Dermatology*; 1990.
26. National Library of Medicine (NIH): *Forensic Views of the Body*.
27. Roewer L. *DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. Forensic Sci Int Genet*; 2013.
28. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. *Forensic application of DNA 'fingerprints'.* Nature; 1985.
29. Scialpi & Mengoni. *La PCR e le sue varianti*; 2008.
30. Pelotti, S., Tagliabracci, A. *Le linee guida del Gruppo Genetisti Forensi Italiani (Ge.F.I.) in tema di identificazione personale a scopo forense. Rivista Italiana di Medicina Legale*; 2016.
31. Ge.F.I. *Raccomandazioni Ge.F.I. nelle indagini di identificazione personale. (Documento ufficiale di raccomandazioni)*.

32. *ISFG DNA Commission recommendations.*
33. Klintschar M, Neuhuber F. *Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis. (Journal of Forensic Sciences; 2000.*
34. Marshall PL, Finley SJ, Hadly D, et al. *A high-volume extraction and purification method for recovering DNA from human bone. Forensic Sci Int Genet; 2014.*
35. Bukyya JL, Tejasvi MLA, Avinash AP, et al. *DNA Profiling in Forensic Science: A Review. Glob Med Genet; 2021.*
36. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction; 1986.*
37. *Developmental validation of the PowerPlex® Fusion System for analysis of casework and reference samples: A 24-locus multiplex for new database standards. Forensic Science International: Genetics; 2014.*
38. Gunn A. *Essential forensic biology. 2nd ed. Wiley; 2009. Capitolo 3.*
39. Goldberg M, Fischer JA, Hood L, Hartwell LH, et al. *Genetica. Dall'analisi formale alla genomica. Copertina flessibile. 1st ed.; 2022.*
40. R. Alaeddini, S.J. Walsh, A. Abbas, *Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA – a review, Forensic Science International: Genetics; 2010.*
41. S. Pääbo, D. M. Irwin, A. C. Wilson, *DNA damage promotes Jumping between templates during enzymatic amplification, J Biol Chem.; 1990.*
42. Gill P, Gusmão L, Haned H, Mayr WR, Morling N, Parson W, et al. *DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. Forensic Sci Int Genet; 2012.*
43. Karkar S, Alfonse LE, Grgicak CM, Lun DS. *Statistical modeling of STR capillary electrophoresis signal. BMC Bioinformatics; 2019.*
44. Buckleton JS, Bright J-A, Taylor D, Gill P, Benschop C, Hansson O, Haned H. *Forensic practitioner's guide to the interpretation of complex DNA profiles. London: Academic Press; 2020.*
45. Gill P, Bleka Ø, Hansson O, Benschop C, Haned H. *Forensic practitioner's guide to the interpretation of complex DNA profiles. London: Academic Press; 2020.*

46. McKenna L. *Understanding DNA results within the case context: importance of the alternative proposition*. *Frontiers in Genetics*; 2013.
47. Thompson W.C., Vuille J., Biedermann A., Taroni F. *The role of prior probability in forensic assessments*. *Frontiers in Genetics*; 2013.
48. Klatzow D. *Justice Denied: The Role of Forensic Science in the Miscarriage of Justice*. Penguin Random House South Africa; 2014.
49. Herschel WJ. *The origin of fingerprinting*. London: Oxford University Press; 1916.
50. D. Maltoni, D. Maio, A. Jain and S. Prabhakar. “*Handbook of Fingerprint Recognition*”, London: Springer London; 2022.
51. Faulds H. *On the skin-furrows of the hand*. *Nature*; 1880 Oct.
52. Galton F. *Fingerprints*. London: Macmillan and Co.; 1892.
53. *The fingerprint, 100 years in the service of the Swiss Confederation*. Police history document; 1995.
54. Wayman JL. *Fundamentals of biometric authentication technologies*. NIST Interagency/Internal Report (NISTIR) 7123. National Institute of Standards and Technology; 2004.
55. Wegstein JH, et al. *Automated fingerprint identification system development (FBI–NBS cooperative program)*. National Bureau of Standards / Federal Bureau of Investigation technical report; 1974–1983.
56. *Biometric System Laboratory (BioLab)*. University of Bologna.
57. Kücken M, Newell AC. *Fingerprint formation*. *J Theor Biol.*; 2005.
58. Cadd S, Islam M, Manson P, Bleay S. *Fingerprint composition and ageing: a literature review*. *Sci Justice*; 2015.
59. Bleay SM, Croxton RS, de Puit M. *Fingerprint development techniques: theory and application*. Chichester: Wiley; 2011.
60. Day, J.S., Edwards, H.G.M., Dobrowski, S.A., Voice, A.M. ‘*The detection of drugs of abuse in fingerprints using Raman spectroscopy II: cyanoacrylate-fumed fingerprints*’, *Spectrochim*; 2004.
61. Williams NH, Elliott KT. *Development of latent prints using titanium dioxide (TiO₂) in small particle reagent, white (SPR-W) on adhesives*. *J Forensic Identif*; 2005.

62. Thermo Fisher Scientific. *PrepFiler® and PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kits: quick reference guide*. Waltham (MA): Thermo Fisher Scientific; 2012. Publication Part No. 4468126, Rev. B.
63. Chatzi A, Doody O. *The one-way ANOVA test explained*. Nurse Researcher; 2023.
64. Chicco D, Sichenze A, Jurman G. *A simple guide to the use of Student's t-test, Mann-Whitney U test, Chi-squared test, and Kruskal-Wallis test in biostatistics*. BioData Mining; 2025.
65. Applied Biosystems™. *GeneMapper™ ID-X Software Reference Guide*. Waltham (MA): Thermo Fisher Scientific.
66. Haned H, de Jong J. *LRmix Studio 2.1.5 user manual*; 2016 Jul 5.
67. Steffen CR, Coble MD, Gettings KB, Vallone PM. *U.S. Population Data for 29 Autosomal STR Loci*. Forensic Sci Int Genet; 2017.
68. Gill P, Haned H. *A new methodological framework to interpret complex DNA profiles using likelihood ratios*. Forensic Sci Int Genet; 2013.
69. *LRmix Studio 2.0 User Manual*; 2015.
70. Tukey JW. *Exploratory Data Analysis*. Reading (MA): Addison-Wesley; 1977.
71. Wickenheiser, R.A. *Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact*. Journal of Forensic Sciences; 2002.
72. Holtkötter, H., et al. *The identification of individuals by means of DNA profiling from fingerprints*. International Congress Series; 2002.
73. Khuu, A., Chadwick, S., Moret, S., Spindler, X., Gunn, P., Roux, C. *Impact of one-step luminescent cyanoacrylate treatment on subsequent DNA analysis*. Forensic Science International; 2018.
74. Schulz, M.M., Reichert, W. *Archived or directly swabbed latent fingerprints as a DNA source for STR typing*. Forensic Science International; 2002.
75. Willis S, McKenna L, McDermott S, O'Donnell G, Barrett A, Rasmusson B, et al. *ENFSI guideline for evaluative reporting in forensic science*. European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI); 2015.
76. Serdar CC, Cihan M, Yücel D, Serdar MA. *Sample size, power and effect size revisited: simplified and practical approaches in pre-clinical, clinical and laboratory studies*. Biochemia Medica; 2021.

77. Bumbrab, G.S. *Cyanoacrylate fuming method for detection of latent fingerprints: a review. Egyptian Journal of Forensic Sciences*; 2017.
78. Risoluti, R., Filetti, V., Iuliano, G., Niola, L., Schiavone, S., Arcudi, G., Materazzi, S. *Updating procedures in forensic chemistry: One step cyanoacrylate method to develop latent fingerprints and subsequent DNA profiling. Microchemical Journal*; 2019.

RINGRAZIAMENTI

Arrivata alla fine di questo percorso, mi rendo conto che una tesi non racconta soltanto anni di studio, esami, difficoltà e traguardi. Racconta anche tutte le persone che, in modi diversi, hanno camminato accanto a me e che hanno reso possibile arrivare fin qui. Perciò, prima di chiudere questo capitolo, sento il bisogno di dedicare qualche parola a chi, in questi anni, c'è stato.

Alla mia famiglia, il mio punto fermo, e soprattutto ai miei genitori. Grazie per aver creduto in me anche quando io facevo fatica a farlo, per avermi dato la possibilità di studiare e di costruire il mio futuro e per aver sostenuto ogni mia scelta. So che dietro questo traguardo ci sono i vostri sacrifici, le vostre rinunce e tutto ciò che avete fatto senza mai farmelo pesare. Spero che un giorno possiate sentirvi ripagati, almeno in parte, di ciò che avete fatto per me. Se oggi sono arrivata fin qui, è anche grazie a voi. Vi sarò sempre grata.

A mio fratello, che riesce a farmi perdere la pazienza come pochi, ma che è anche uno dei miei punti di riferimento più importanti. Forse non te lo dico abbastanza, ma sapere di poterti avere accanto ha sempre significato molto per me. Grazie per esserci, a modo tuo, sempre.

Al Professor Vincenzo Agostini, per avermi dato la possibilità di intraprendere questo percorso e per la disponibilità dimostrata durante questi anni. Il tempo che ha sempre trovato per aiutarmi e i suoi consigli hanno contribuito non solo alla mia crescita universitaria, ma anche a quella personale.

Alle Dottoresse Selena Cisana e Monica Omedei, per avermi dato la possibilità di realizzare questo progetto di tesi e per le conoscenze e competenze che ho avuto modo di acquisire durante questo percorso.

Alle mie nonne, le mie stelle. Non so se esista un modo per ringraziarvi. Avete fatto di tutto per farmi superare gli esami e, in qualche modo, sono certa che una parte del merito sia anche vostra. Noi sappiamo. Grazie per il vostro amore, per le vostre attenzioni e per quella presenza che, anche nei momenti più difficili, è riuscita a farmi sentire protetta. Siete state e sarete sempre una parte preziosa di me.

A Giadi, Marti e Shani, le mie più care amiche, che sono state una delle scoperte più belle in assoluto. Grazie per aver condiviso con me risate, giornate infinite, ansie, soddisfazioni e momenti in cui sembrava tutto più difficile. Grazie soprattutto per avermi sostenuta, ma anche per avermi dato contro quando serviva: perché una vera amica non è quella che ti dà sempre ragione, ma quella che ha il coraggio di dirti ciò che hai bisogno di sentire. Siete state casa. E

sappiate che, dopo tutto quello che abbiamo passato insieme, non vi sbarazzerete facilmente di me. Vi voglio bene.

Ai miei amici Luca ed Ento, che da sette anni fanno parte della mia vita. Sette anni di risate, arrabbiate, momenti assurdi, confidenze e ricordi che porterò sempre con me. Grazie per esserci stati in questi anni e per essere diventati, con il tempo, una parte così importante della mia vita. Alcune persone entrano nella nostra storia quasi senza accorgersene e, quando ci fermiamo a guardare indietro, ci rendiamo conto di quanto spazio abbiano finito per occupare. Voi siete tra queste.

A Lisa, Giorgio, Erica, Alessio ed Elena, grazie per avermi supportata e sopportata per una parte importante di questo percorso. Grazie per avermi fatto sentire accolta, per la vostra presenza e per tutto l'affetto che mi avete sempre dimostrato. Anche questo traguardo porta con sé un pezzetto di ciò che mi avete dato.

Alle mie colleghe della “Tribù”, grazie per esserci state, per il sostegno, per le risate e per tutti quei momenti di leggerezza che hanno reso questi anni ancora più speciali. Grazie per aver fatto parte di una fase così importante della mia vita, condividendo con me tanti momenti che oggi sono diventati ricordi preziosi.

Un pensiero speciale va a tutti i bimbi che, in questi quasi sei anni, magari senza nemmeno saperlo, hanno avuto un posto importante in questo cammino. Con la loro spontaneità, il loro affetto e la loro capacità di rendere tutto più semplice, mi hanno regalato sorrisi nei momenti in cui ne avevo più bisogno e, senza saperlo, mi hanno aiutata a ritrovare ogni volta la voglia di continuare. A loro, che forse non immaginano nemmeno quanto siano stati importanti, va un grazie speciale: una parte di questo traguardo appartiene anche a voi.

Ad Andrea, che nell'ultimo periodo è diventato il mio fan numero uno. Grazie per avermi dato la carica quando ne avevo più bisogno, per aver creduto in me e per avermi ricordato, soprattutto nei momenti di stanchezza e sconforto, che ero ormai così vicina al traguardo da non potermi fermare. A volte abbiamo semplicemente bisogno di qualcuno che ci dica “puoi farcela” proprio quando noi non riusciamo più a crederci. Grazie per essere quella persona.

E infine, a tutte le persone che hanno fatto parte di questo percorso. A chi è rimasto, a chi oggi non c'è più, a chi ha preso una strada diversa e a chi, invece, continua a camminare accanto a me. Alcune persone restano per tutta la vita, altre ci accompagnano soltanto per un tratto, ma questo non significa che il loro passaggio sia stato meno importante. Ognuno di voi ha lasciato

qualcosa, un ricordo, un sorriso, una difficoltà superata o semplicemente un pezzo di vita condivisa. E per questo vi sono grata.

Oggi si conclude un percorso che, per tanto tempo, ho immaginato soltanto come un traguardo. Ora che sono arrivata qui, però, mi accorgo che la parte più importante non è soltanto il punto in cui sono arrivata, ma tutte le persone che ho incontrato lungo la strada.

Questa tesi porta il mio nome, ma questo traguardo non è soltanto mio.

Grazie a chi mi ha insegnato, a chi mi ha sostenuta, a chi mi ha spronata, e anche a chi, magari senza saperlo, mi ha aiutata a diventare la persona che sono oggi.

A tutti voi, semplicemente, grazie.