

TRIBUNALE DI VIGEVANO

SEZIONE G.I.P.

PERIZIA MEDICO-LEGALE

NEL PROCEDIMENTO N. 1699/07 R.G. G.I.P. – 2025/07 R.G.N.R.

Ill.mo Signor Giudice per l'Udienza Preliminare,

il giorno 13 maggio 2009 la S.V. ci nominava periti proponendoci i seguenti quesiti:

“1) Letti gli atti, i documenti prodotti relativi alle cause e alle modalità della morte di Chiara Poggi ed eseguito ogni più opportuno ulteriore accertamento, qualora ritenuto utile, anche con riguardo al controverso dato del peso corporeo di Chiara Poggi, forniscano i periti ogni più completa valutazione sull'epoca della morte. Considerato altresì il tempo di sopravvivenza dopo la produzione delle lesioni traumatiche, riferiscano i periti sul momento dell'aggressione subita da Chiara Poggi. In riferimento al tema dei quesiti precedenti, dicano ogni altra notizia utile ai fini di giustizia.

2) Letti gli atti, i documenti prodotti ed eseguito ogni più opportuno ulteriore accertamento, qualora ritenuto utile, forniscano ogni più completa valutazione, anche in relazione al punto 1), sui periodi di essiccazione delle plurime tracce ematiche rinvenute nell'abitazione della famiglia Poggi il giorno 13 agosto 2007 in relazione al momento del riferito ingresso di Alberto Stasi nella suddetta abitazione. In riferimento al tema del quesito suddetto, dicano ogni altra notizia utile ai fini di giustizia.

3) *Alla luce degli accertamenti di laboratorio effettuati dal R.I.S. sui pedali della bicicletta marca “Umberto Dei Milano”, nonché di eventuali ulteriori analisi da effettuarsi sui pedali stessi e sul vetrino allestito con aliquota della traccia “bu-p1”, ove ancora disponibile, dicano i periti: se sia possibile determinare la natura delle tracce evidenziate sui pedali, in particolare se si tratti di sangue umano e se a sangue umano sia riferibile il profilo genetico della vittima, ricavato dal campione “bu-p1”. In riferimento al tema del quesito suddetto, dicano ogni altra notizia utile ai fini di giustizia.*

4) *Letti gli atti e i documenti prodotti, eseguito ogni più opportuno ulteriore accertamento qualora possibile, dicano se sul portasapone liquido rinvenuto nel bagno dell’abitazione di Chiara Poggi sia presente DNA attribuibile alla vittima ed in caso positivo se si tratti di liquido ematico e comunque valuti quale significato possa avere la presenza contemporanea di un’impronta digitale riferibile all’imputato e di DNA attribuito alla vittima sul portasapone di cui sopra: riferendo in proposito ogni altra notizia utile secondo scienza ed esperienza.*

5) *Dicano i periti, letti gli atti ed i documenti prodotti¹, se sulle suole delle scarpe Lacoste in uso ad Alberto Stasi ed indossate da Alberto Stasi, secondo le sue dichiarazioni, al momento dell’ingresso nell’abitazione di Chiara Poggi, siano rilevabili tracce di sangue umano. In caso negativo, si collabori in concerto con il perito sub C) agli accertamenti e valutazioni peritali sub C)²”.*

¹ Tale inciso fu aggiunto su sollecitazione della parte civile.

² Quesito sub C): *“Letti gli atti, i documenti prodotti con particolare riguardo alle memorie tecniche depositate dalle parti in merito alla questione controversa dell’”idrorepellenza” delle suole delle scarpe Lacoste indossate dall’imputato come da lui dichiarato al momento dell’ingresso nell’abitazione di Chiara Poggi, tenuto conto dei risultati ottenuti dall’esame medico-legale sulla presenza di tacce di sangue umano sulle scarpe in parola, accerti l’esatta composizione chimico-organica delle suole delle scarpe suddette e, in concerto e con la collaborazione del collegio medico-legale, svolga ogni ulteriore esame ed accertamento (anche di natura sperimentale) al fine di valutare – tenuto conto delle circostanze di fatto prospettate e prospettabili dalle parti, degli accertamenti e valutazioni medico-legali in merito al processo di essiccazione delle diverse tipologie di tracce ematiche di cui al quesito sub B2) e della utilità e validità di basarsi anche su evenienze emergenti dagli accertamenti e valutazioni peritali sub D): specie con riguardo ai valori minimi, medi e massimi dei passi che intercettano tracce ematiche ricavabili dalle sperimentazioni virtuali, di cui, appunto, alla perizia sub D) – la effettiva capacità delle suole in questione di acquisire e trattenere sangue”.*

Per il deposito di relazione scritta veniva concesso termine sino al 30 settembre 2009. La discussione della perizia veniva fissata nei giorni 4 e 11 novembre 2009, alle ore 09.30.

Con la presente relazione assolviamo l'incarico affidatoci.

INDICE

Premessa.....	Pag. 5
Parte prima: quesito B1 – epoca della morte e momento dell’aggressione.....	Pag. 14
Parte seconda: quesito B2 – essiccamento delle macchie di sangue.....	Pag. 33
Premessa alle parti terza, quarta, quinta.....	Pag. 56
Parte terza: quesito B3 – tracce sui pedali della bicicletta “Umberto Dei Milano”.....	Pag. 65
Parte quarta: quesito B4 – tracce sul portasapone.....	Pag. 91
Parte quinta: quesito B5 – tracce di sangue sulle scarpe di Alberto Stasi.....	Pag. 107

PREMESSA

DOCUMENTI IN ATTI

- Verbale di assunzione di informazioni da Stasi Alberto in data 13/08/2007 – ore 16.00.
- Verbale di sommarie informazioni rese da Rubbi Elisabetta in data 13/08/2007.
- Verbale di sommarie informazioni rese da Stasi Alberto in data 13/08/2007 – ore 23.45 (sospeso alle ore 04.05 del 14/08/2007, riaperto alle ore 04.25, chiuso alle ore 07.00 del 14/08/2007).
- Relazione di consulenza tecnica sulle cause della morte di Poggi Chiara, a firma del dott. Marco Ballardini, con allegati documentazione fotografica, pellicole, compact disc e referto di TAC encefalo datato 16/08/2007.
- Relazione tecnica 3306IT2007 del R.I.S di Parma datata 15/11/ 2007 (accertamenti biologici) e 16/11/ 2007 (accertamenti dattiloscopici).
- Relazione tecnica del R.I.S. di Parma datata 12/12/2007.
- Relazione di consulenza tecnica medico-legale a firma del prof. Francesco Maria Avato e del dott. Matteo Fabbri datata 04/08/ 2008.
- Considerazioni relative a relazione tecnica difensiva (accertamenti biologici) del R.I.S. di Parma datate 29/08/2008.
- Relazione tecnica del C.T. di parte offesa datata 14/02/2009.
- Relazione di consulenza tecnica medico-legale (5) a firma del prof. Francesco Maria Avato e del dott. Matteo Fabbri datata 19/02/2009.
- Considerazioni relative a ulteriore relazione tecnica difensiva e relazione tecnica del C.T. di parte offesa (accertamenti biologici) del R.I.S. di Parma datate 05/03/2009.
- Considerazioni relative a ulteriore relazione tecnica difensiva (accertamenti biologici) del R.I.S. di Parma datate 21/04/2009

- Rilievi sulla consulenza tecnica di parte del prof. Avato a firma del dott. Marco Ballardini.
- Verbale di dichiarazioni rese da Poggi Giuseppe in data 14/07/2008.
- Ordinanza del G.U.P. presso il Tribunale di Vigevano datata 30/04/2009.
- Verbale di audizione di Serra Andrea, Muscatelli Gaetano, Rubbi Elisabetta, Riboldi Antonio, Bermani Franca.
- Alcuni compact disc con cartelle contenenti immagini denominate: “foto autopsia”, “Poggi Ciara” (*sic*, sopralluogo del dott. Ballardini), “100CANON” (Carabinieri Vigevano), “CC Garlasco 13_8_07”, “CC Pavia 13_8_07”, “CC Pavia 14_8_07”, “CC Vigevano 13.8.07”, “Sopralluogo 16.08.2007”, “Sopralluogo 17.08.2007”, “Sopralluogo 20.08.2007”, “Sopralluogo 27.08.2007”, “Sopralluogo 29.08.2007”, “Sopralluogo 05.09.2007”, “Foto Luminol tappeto bagno 11.09.2007”, “Sopralluogo 12.09.2007”, “Sopralluogo 03.10.2007”.

DOCUMENTI ACQUISITI

Nel corso delle operazioni peritali del 27 giugno 2009, presso l'abitazione della famiglia Poggi in Garlasco, la dott.ssa Silvia Castagnoli, il dott. Giovanni Maria Drovanti ed il dott. Giancarlo La Rosa ci hanno consegnato documentazione medica varia, che alleghiamo alla presente relazione.

Il c.t. prof. Avato ci ha consegnato n. 3 stampe fotografiche ritraenti a suo dire Chiara Poggi nel luglio 2007, allegate a missiva inviata per posta elettronica dall'avvocato prof. Giarda. Anch'esse vengono allegate alla presente relazione.

Nel corso dello svolgimento delle operazioni peritali il Cap. Marino ha fatto pervenire tramite posta elettronica i seguenti file contenenti allegati tecnici:

- Q14092007MAR_1_prima_della_purificazione.sds
- Q17092007MAR_1_dopo_la_purificazione.sds
- Elettroferogramma del campione "67_miscelatore"
- Elettroferogramma del campione "bu_p"
- Elettroferogramma del campione "ds_tot" (Minifiler)
- Elettroferogramma di "Poggi Giuseppe"
- Elettroferogramma di "Poggi Marco"
- Elettroferogramma di "Poggi RMA"
- Elettroferogramma di "Preda Rita"
- Elettroferogramma di "Cappa_Stefania".

MEMORIE DI AVVOCATI E CONSULENTI

- Missiva dell'avvocato Angelo Giarda inviata per posta elettronica in data 09/07/2009 all'indirizzo ambmedleg@unife.it, consegnataci in forma stampata dal c.t. prof. Avato.
- Appunto di quattro pagine consegnatoci dal c.t. Cap. Marino, datato 09/07/2009.
- Considerazioni sull'epoca della morte a firma dei cc.tt. dott. Ballardini e prof. Pierucci in data 20/07/2009.
- E-mail inviata dal c.t. Cap. Marino in data 11/08/2009 (allegata a verbale di operazioni peritali del 12/08/2009).
- Relazione di "Considerazioni tecniche e osservazioni preliminari inerenti l'attività peritale di tipo medico legale svolta nel merito dell'omicidio di Chiara Poggi" redatta dal c.t. Cap. Marino e datata 19/08/2009.
- Relazione di "Valutazioni biologico e genetico-forensi su risultati di analisi di laboratorio" elaborata dal c.t. dott. Capra e datata 31/08/2009.

ATTIVITÀ SVOLTE PER LA PERIZIA

13 maggio 2009

Conferimento incarico.

Acquisizione di reperti presso i Carabinieri della Compagnia di Vigevano (verbale allegato).

18 giugno 2009

Consegna delle scarpe Lacoste di Alberto Stasi al perito prof. Ciardelli, presso l'Università di Pisa (verbale allegato).

23 maggio 2009

Inizio operazioni peritali in Torino (si veda verbale allegato).

22 giugno 2009

Prosecuzione operazioni peritali in Torino (si veda verbale allegato).

23 giugno 2009

Invio ai consulenti delle parti di missiva per l'organizzazione delle operazioni del 27/06/2009.

27 giugno 2009

Prosecuzione operazioni peritali in Garlasco e in Pavia (si veda verbale allegato).

1 luglio 2009

Invio ai consulenti delle parti di schema dei risultati del 27/06/2009 e di pro memoria circa la seduta del successivo 10/07/2009.

10 luglio 2009

Prosecuzione operazioni in Torino (si veda verbale allegato).

13 luglio 2009

Invio ai consulenti delle parti di pro memoria della seduta del 14/07/2009.

14 luglio 2009

Prosecuzione operazioni in Torino (si veda verbale allegato).

14 luglio 2009

Invio ai consulenti delle parti di pro memoria della seduta del 20/07/2009.

17 luglio 2009

Invio ai consulenti delle parti di pro memoria della seduta del 23/07/2009.

20 luglio 2009

Prosecuzione operazioni in Torino (si veda verbale allegato).

23 luglio 2009

Prosecuzione operazioni in Pisa (si veda verbale allegato).

28 luglio 2009

Invio ai consulenti delle parti di copia di tutti i verbali delle operazioni peritali svolte.

3 agosto 2009

Invio ai consulenti delle parti di schema riassuntivo dei risultati ottenuti nelle sperimentazioni compiute sulle scarpe.

7 agosto

Invio ai consulenti delle parti di avviso di prosecuzione operazioni peritali in Torino nella data del 12/08/2009.

12 agosto

Prosecuzione operazioni peritali in Torino (si veda verbale allegato).

Invio ai consulenti delle parti di copia del verbale delle operazioni peritali svolte.

Invio ai consulenti delle parti di schema riassuntivo dei risultati ottenuti nelle indagini biomolecolari svolte su scarpe di Alberto Stasi, pedali della bicicletta e portasapone liquido.

8 settembre

Consegna al perito ing. Porta della scatola con indicazione “Regione Carabinieri Lombardia – Compagnia di Vigevano – Nucleo Operativo” contrassegnata con numero 237/2007 “Reperto E” (verbale allegato).

MATERIALE ACQUISITO ED UTILIZZATO NEL CORSO DELLE OPERAZIONI

I reperti acquisiti presso l'Ufficio Corpi di Reato del Tribunale di Vigevano e presso la Compagnia Carabinieri di Vigevano sono descritti nel verbale delle operazioni del 23 maggio 2009.

Il 23 maggio 2009 il consulente dott. Ballardini ci ha consegnato n. 24 preparati istologici (vetrini) allestiti da prelievi effettuati durante l'autopsia.

Sono state acquistate due paia di scarpe Lacoste Swerve Strap 33 S di taglia 43, per gli esperimenti di calpestamento del sangue. Esauriti tali esperimenti, il 23 luglio 2009 esse sono state consegnate al perito prof. Ciardelli.

Le scarpe Lacoste originali, sequestrate ad Alberto Stasi, sono state sottoposte a prelievi il 23 maggio 2009, recapitate al perito prof. Ciardelli il 18 giugno 2009, e quindi utilizzate per sperimentazioni nel corso delle operazioni peritali del 23 luglio 2009 in Pisa. Al termine, sono state lasciate nella disponibilità del prof. Ciardelli.

Nel corso delle operazioni peritali del 27 giugno 2009 i coniugi Poggi ci hanno consegnato una confezione contenente cinque piastrelle, che riferiscono essere identiche a quelle del pavimento del piano terreno della loro abitazione, in sovrannumero al momento della posa del pavimento stesso.

In data 2 luglio 2009, il Mar. Sergio Festa, in servizio presso "RONINV" Carabinieri di Torino ci ha consegnato la provetta contenente il residuo dell'estratto di DNA del campione "ds_tot", a sua volta consegnatagli – il giorno precedente – dal Cap. Marino presso il R.I.S. di Parma.

PARTE PRIMA

*QUESITO B1 – EPOCA DELLA MORTE E
MOMENTO DELL'AGGRESSIONE*

MATERIALI E METODI

Dati documentali

Risulta dagli atti che alle 13.50 del 13 agosto 2007 Alberto Stasi si presentò alla Stazione Carabinieri di Garlasco riferendo di avere rinvenuto il corpo di Chiara Poggi. Il dato viene confermato dai Carabinieri operanti, dal personale del Servizio Emergenze 118 e, successivamente, dal consulente tecnico dott. Ballardini.

La dott.ssa Rubbi del 118 riferisce di non aver riscontrato la presenza di rigidità cadaverica, né di macchie ipostatiche (l'arrivo dell'ambulanza medicalizzata all'abitazione della famiglia Poggi risulta essere avvenuto alle ore 14.11). Il certificato di constatazione del decesso riporta l'orario 14.15.

Il dott. Ballardini, alle ore 17.00, rilevò una temperatura rettale pari a 33,1°C, una temperatura ambientale di 23°C, macchie ipostatiche “*ventrali, scarse, roseo-violacee, improntabili*”, rigidità cadaverica “*sfumata nei vari distretti corporei*”.

Il successivo 16 agosto, in sede di autopsia, furono osservate macchie ipostatiche alle regioni dorsali e rigidità cadaverica valida e generalizzata, con temperatura come da permanenza in ambiente refrigerato. La lunghezza del cadavere fu misurata pari a 157 cm.

Il contenuto gastrico era rappresentato da “*scarso materiale poltaceo, di colorito bruno-grigiastro, dall'odore indifferente*”.

Dichiarazioni circa il peso di Chiara Poggi

Nel corso delle operazioni peritali del 27 giugno 2009 i genitori di Chiara Poggi ci hanno dichiarato che la figlia non pesava più di 50 Kg e che la taglia dei suoi indumenti oscillava tra la 38 e la 42; di analogo tenore, seppur meno precise, le dichiarazioni della dott.ssa Castagnoli e del dott. La Rosa.

Esame degli indumenti di Chiara Poggi

Durante le operazioni svoltesi il 27 giugno 2009 presso l'abitazione della famiglia Poggi ci sono stati esibiti alcuni indumenti, appartenuti, secondo le dichiarazioni dei genitori, a Chiara Poggi; in particolare si sono osservati:

- calzoni marca Zara Basic con etichetta, di taglia 38 (USA 6; Mex 28; GB 10); ci è stato riferito che furono acquistati nell'estate del 2007 e mai utilizzati
- calzoni tipo jeans marca Zara Woman usati, di taglia europea 36 (USA 4, Mex 26)
- una maglia taglia S (Mex 26)
- un maglione taglia S (Mex 26)
- un maglione taglia 38
- una maglietta bianca taglia S
- un reggiseno nero marca Yamamay taglia 3
- altri reggiseni taglia 3
- mutande a slip taglia S
- altri slip taglia 3A marca Intimissimi; ci è stato riferito che erano stati acquistati recentemente
- altre mutande a slip taglia 2
- mutande tipo perizoma di taglia 4
- altre mutande tipo perizoma taglia M/L
- giubbotto blu marca Calvin Klein taglia S.

Rilievo delle temperature ambientali

Nel corso delle operazioni peritali del 27 giugno 2009 sono state rilevate in diversi orari le temperature al piano terra dell'abitazione, lungo la scala che conduce al seminterrato ed all'esterno, ottenendo i risultati riportati nella tabella che segue.

Orario	Termometro scala	Termostato piano terra	Termometro pilone portico presso ingresso	Termometro cortile lato nord
08.00	22,5	24,6	21	
09.00	22	24,6		21,5
09.50	22	24,8		23
13.55	22	24,8		25
15.55	22	24,8		26
17.00	22	25,1		26

Legenda – Le temperature sono espresse in gradi centigradi (°C). Per le misurazioni ci si è avvalsi di due termometri a colonna uguali e nuovi. Il termometro utilizzato per ricavare le temperature in corrispondenza del luogo di rinvenimento del cadavere è stato posizionato sull’ottavo gradino (a partire dal piano terra) della scala che scende verso la cantina. La porta a soffietto che dà accesso alla scala è stata tenuta chiusa fino alla misurazione delle ore 13.55, successivamente è rimasta aperta. A partire dalle ore 16.30 è stata tenuta aperta anche la porta di accesso all’abitazione.

La corrispondenza tra la temperatura rilevata dal termostato presente al piano terra dell’abitazione ed i termometri utilizzati per le altre misurazioni è stata verificata piazzando per circa 20 minuti uno dei termometri sul tavolino presente proprio al di sotto della sede del termostato (fissato alla parete): al termine di tale intervallo di tempo (alle ore 08.30), la temperatura rilevata dal termostato è risultata di 24,6°C, mentre quella misurata dal termometro a colonna era di circa 24,5°C.

Il termometro impiegato per la determinazione della temperatura ambientale esterna all’abitazione è stato dapprima posizionato ai piedi di uno dei piloni del portico antistante l’ingresso della casa e successivamente (a partire dalle ore 08.30) nel giardinetto, in corrispondenza del lato nord della casa, all’ombra e sotto un cespuglio.

Nuovo esame dei preparati istologici

È stato effettuato presso l’Istituto di Medicina Legale di Torino. I preparati sono quelli consegnatici dai consulenti tecnici prof. Pierucci e dott. Ballardini il 23 maggio 2009.

L’osservazione al microscopio nulla aggiunge rispetto a quanto descritto nella consulenza del dott. Ballardini.

DISCUSSIONE

Il problema dell'accertamento dell'epoca della morte è oggetto di discussione nella comunità scientifica medico-legale da secoli e non è ancora risolto.

I contributi di letteratura e l'esperienza quotidiana ci insegnano come anche i più raffinati (e spesso complicati) metodi di valutazione siano caratterizzati essenzialmente dalla fallibilità dei risultati.

Consci di questi limiti, spesso risulta comunque utile fornire un dato, a titolo orientativo, soprattutto nella prima fase delle indagini, delimitandone onestamente i confini di attendibilità.

Per la valutazione del caso in oggetto abbiamo cercato di porci nelle migliori condizioni, acquisendo tutti gli elementi di giudizio possibili, in particolar modo in relazione a due dati che erano incerti: peso corporeo e eventuali oscillazioni della temperatura ambientale nel luogo del rinvenimento del cadavere.

Il peso corporeo di Chiara Poggi era con ogni probabilità non superiore a 50 Kg. Il giudizio deriva non solo dalle dichiarazioni dei genitori, ma soprattutto dal fatto che le informazioni fornite sono del tutto coerenti con i dati antropometrici disponibili (lunghezza del cadavere, taglia degli indumenti, complessione somatica generale come apprezzabile in fotografia).

Per serietà scientifica possiamo ammettere un margine di errore, in eccesso o in difetto, di cinque chilogrammi (e quindi considerare un peso compreso tra 45 e 55 Kg circa).

La temperatura dell'ambiente ove fu rinvenuto il cadavere, pari a 23°C in occasione del sopralluogo del dott. Ballardini, è stata da noi misurata circa due anni dopo, ottenendo valori di poco differenti. Il dato più significativo è rappresentato però dalla pressoché nulla variazione della temperatura nell'arco della giornata, non modificata neppure dalla prolungata apertura della porta di comunicazione con il piano terreno della casa.

Sulla base dei dati noti, la **teorica epoca della morte** risulta quindi essere, secondo diversi metodi, la seguente.

Metodo fondato esclusivamente sul rilievo della temperatura rettale³

Si considera a questo riguardo che la letteratura scientifica è unanimemente concorde⁴ nel descrivere una prima fase di decremento termico del cadavere della durata di circa 3-4 ore, in cui la temperatura rettale cala di 0,5°C all'ora, seguita da una seconda fase di decremento più rapido (della durata di 6-12 ore), in cui la temperatura scende di 1°C all'ora. Applicando tali nozioni al caso concreto (33,1°C alle ore 17.00) ed ipotizzando una temperatura corporea *ante mortem* di 37°C, si otterrebbe un'epoca del decesso risalente a circa 5 ore e ½ – 6 ore prima del sopralluogo, ovvero attorno alle ore 11.00-11.30.

Metodo di Henssge (calcoli forniti dal sito internet www.pathguy.com)

- ✓ Per un peso corporeo di 50 Kg → 7,1 ore prima della misurazione delle temperature (sopralluogo delle ore 17.00) – con probabilità del 95% tra 4,3 e 9,9 ore⁵
- ✓ Per un peso di 46 Kg⁶ → 6,6 ore – con probabilità del 95% tra 3,8 e 9,4 ore
- ✓ Per un peso di 56 Kg → 7,8 ore – con probabilità del 95% tra 5 e 10,6 ore

³ Da alcuni Autori, il metodo è indicato con il patronimico “Greggio e Valtorta”.

⁴ Si vedano, a titolo di esempio:

- Umani Ronchi G, Bolino G, Traditi F. *La diagnosi di epoca della morte. Moderni orientamenti e limiti razionali*, pp. 48-57. 2002. Giuffrè Editore Milano.
- Canuto G, Tovo S. *Medicina Legale e delle Assicurazioni*, pp. 346-7. 1996. 12^a edizione, Piccin Padova.
- Macchiarelli L, Arbarello P, Di Luca NM, Feola T. *Medicina Legale*, pp. 185-6. 2005. II edizione, Edizioni Minerva Medica Torino.

⁵ Tale risultato è stato confermato anche mediante utilizzo del nomogramma di Henssge (applicazione grafica del metodo).

⁶ Il programma prevede intervalli minimi di peso corporeo di 2 Kg (42 Kg, 44 Kg, 46 Kg, 48 Kg, ecc.).

Metodo di Henssge (calcoli forniti dal sito internet www.swisswuff.ch)⁷

- ✓ Per un peso corporeo di 50 Kg → 5h 30min (ossia 5,5 ore) – con probabilità del 95% tra 3h e 8h 30min
- ✓ Per un peso di 45 Kg → 5h – con probabilità del 95% tra 2h 30min e 8h
- ✓ Per un peso di 55 Kg → 6h – con probabilità del 95% tra 3h 30min e 9h

Metodo di Moritz A

[intervallo *post-mortem* (PMI) = temperatura rettale al momento del decesso (°F⁸) – temperatura rettale al tempo T1 (°F) / 1,5]

$$98,6 - 91,6 / 1,5 = 4,7 \text{ ore}$$

Metodo di Moritz B

[PMI = temperatura rettale al momento della morte (°C) – temperatura rettale al tempo T1 (°C) + 3]

$$37 - 33,1 + 3 = 6,9 \text{ ore}$$

⁷ Il programma prevede la selezione di un fattore empirico di correzione in relazione agli eventuali indumenti indossati dal cadavere e ad alcune caratteristiche ambientali: per il calcolo si è utilizzato il fattore 1,1, corrispondente a condizioni di assenza di ventilazione (“*still air*”) ed alla presenza di uno-due strati sottili di indumenti. I risultati esposti non variano molto se si opta per un fattore di correzione 1, che si riferisce al cadavere nudo.

⁸ °F = °C x 1,8 + 32.

I risultati ottenuti con i metodi citati vengono riassunti, con riferimento ai teorici orari della morte, nello schema sottostante.

	Metodo fondato sul decremento termico	Metodo di Henssge (www.pathguy.com)	Metodo di Henssge (www.swisswuff.ch)	Metodo di Moritz A	Metodo di Moritz B
Orario teorico della morte	11.00-11.30	Per 50 Kg di peso: 10.00 circa (95% tra le 07.00 e le 12.30)	Per 50 Kg di peso: 11.30 circa (95% tra le 08.30 e le 14.00)	12.30 circa	10.00 circa
		Per 46 Kg di peso: 10.30 circa (95% tra le 07.30 e le 13.00)	Per 45 Kg di peso: 12.00 circa (95% tra le 09.00 e le 14.30)		
		Per 56 Kg di peso: 09.00 circa (95% tra le 06.30 e le 12.00)	Per 55 Kg di peso: 11.00 circa (95% tra le 08.00 e le 13.30)		

Come prima accennato in termini generali, i margini d'errore sono molto ampi. È in proposito da condividere sul piano metodologico quanto affermato dal dott. Ballardini nella sua consulenza (*"Ribadiamo il carattere orientativo, non tassativo, di questa ricostruzione..."*), confermato del tutto recentemente dallo stesso dott. Ballardini e dal prof. Pierucci nelle ultime righe delle considerazioni del 20/07/2009.

Eloquente al riguardo appare anche quanto riportato da Guy N. Ratty (dell'Università di Leicester, UK) nell'introduzione ad una sua recente pubblicazione scientifica⁹: *"... The popular press and writers of fictional crime novels would have us believe that the pathologist can determine the time of death with precise accuracy. Unfortunately, nothing can be further from the truth. Unless the death is witnessed or recorded ... all that can be said with any certainty is that the death occurred sometime between the last time the person was seen alive and the time when the body was discovered. ... The quest for a reliable method that will calculate the time of death has become akin to the quest for the Holy Grail of forensic pathology. ..."*. La considerazione potrebbe essere così tradotta in italiano: *"La stampa popolare e gli scrittori di romanzi gialli tendono a far credere che il patologo possa determinare l'epoca della morte con precisione e accuratezza. Sfortunatamente, nulla è più lontano dalla realtà. Senza che la morte sia testimoniata o registrata ... tutto ciò che si può dire con una qualche sicurezza è che la morte è avvenuta in qualche momento compreso tra l'ultima volta che la persona è stata vista viva e la scoperta del cadavere. ... La ricerca di un metodo affidabile che permetta di calcolare l'ora della morte è divenuto una sorta di ricerca del Sacro Graal della patologia forense. ..."*.

⁹ GN Ratty. *The estimation of the time since death using temperatures recorded from the external auditory canal. Part I: Can a temperature be recorded and interpreted from this site?* Forensic Sci Med Pathol 2005;1:41-51.

Ricordiamo che i metodi tradizionalmente utilizzati per i tentativi di valutazione tanatocronologica sono basati essenzialmente sul rilievo dell'andamento di alcuni dei cosiddetti fenomeni negativi consecutivi della morte (formazione e migrabilità delle macchie ipostatiche, comparsa ed evoluzione della rigidità cadaverica, modificazioni della temperatura del cadavere).

Tra questi parametri, che nelle loro caratteristiche generali sono descritti nelle consulenze Ballardini e Avato-Fabbri, le alterazioni della temperatura corporea, generalmente in decremento, sono ritenute l'indicatore più affidabile.

Nel corso dei decenni sono stati proposti diversi metodi da parte di vari Autori; alcuni di essi si basano su indicazioni di ordine generale, mentre altri utilizzano più parametri (peso corporeo, temperatura ambientale, ecc.).

Non ci risulta essere mai stato effettuato un ampio studio comparativo dei diversi metodi proposti dalla letteratura scientifica.

In epoca recente si è diffusa alquanto l'applicazione del cosiddetto nomogramma di Henssge, metodo sul quale sono prevalentemente fondate le argomentazioni iniziali dei consulenti tecnici dott. Ballardini e prof. Avato. Uno dei motivi che stanno alla base della popolarità di questo metodo è la possibilità di ricavare un risultato in modo poco laborioso, poiché l'accesso gratuito ad alcuni siti internet consente, inserendo i dati conosciuti, di ottenere il risultato calcolato da appositi programmi. La serietà di questi siti è fuori discussione, ma i risultati forniti, così come quelli che si ottengono con qualsiasi sistema per la valutazione dell'epoca della morte, devono essere analizzati con onestà e con attenzione per la loro applicazione giudiziaria.

A questo proposito, si è visto che il sito www.pathguy.com, che abbiamo interpellato fornendo alcuni dati relativi a questo caso, ha elaborato una stima dell'epoca della morte di 7,1

ore prima delle 17.00, ma con *range* compreso tra 4,3 e 9,9 ore con una probabilità del 95%. Questo significa che se consideriamo 100 cadaveri che presentino le stesse caratteristiche di quello di Chiara Poggi in occasione del rinvenimento, per 95 di essi la morte è avvenuta tra le ore 07.00 e le ore 12.30 circa di quel giorno.

La prima osservazione da fare è che esiste il 5% di probabilità che la morte sia avvenuta prima delle ore 07.00 o dopo le 12.30.

Considerazioni più complesse riguardano il restante 95% dei casi, che, come in tutti i fenomeni biologici, si distribuiscono statisticamente in una curva a campana detta gaussiana¹⁰ (Fig. 1).

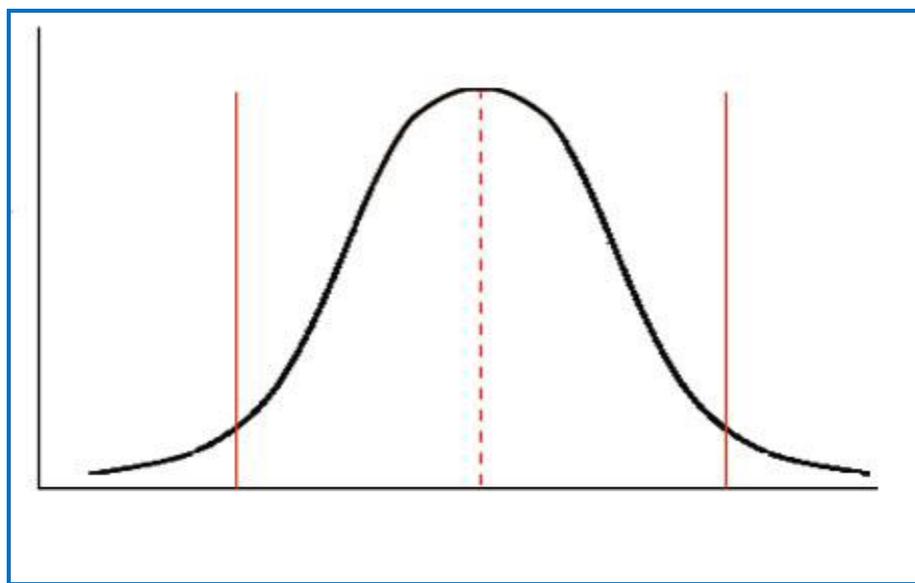


Figura 1

La quantità di casi è determinata dall'estensione dell'area al di sotto della curva, nell'ambito dello spazio compreso tra i limiti orari che si vogliono definire, cosicché se restringiamo di molto la fascia oraria che vogliamo prendere in considerazione, la percentuale di casi che vi rientra risulta fortemente ridotta, aumentando parallelamente la possibilità di errore.

¹⁰ Per la verità, la costruzione di una curva gaussiana per quanto riguarda l'epoca della morte è del tutto arbitraria, poiché non abbiamo reperito nella letteratura consultata i dati utili negli studi su grandi popolazioni. Quello che proponiamo è pertanto un modello paradigmatico; si consideri tuttavia che esso rappresenterebbe la migliore delle ipotesi per chi abbia come obiettivo una valutazione il più possibile precisa. In altre parole, se la distribuzione casistica non fosse nell'ambito di una gaussiana (e vi fosse invece una totale irregolarità nella distribuzione dei risultati), ogni tentativo di individuare con una certa accuratezza l'epoca della morte sarebbe completamente inutile.

Estremizzando questo modo di procedere, vediamo che al di sotto del risultato medio (7,1 ore), non esiste un'area ma solo una linea, sicché diventa assai probabile che la morte per nessuno dei cadaveri considerati risalga effettivamente a 7,1 ore prima della misurazione della temperatura (Fig. 2).

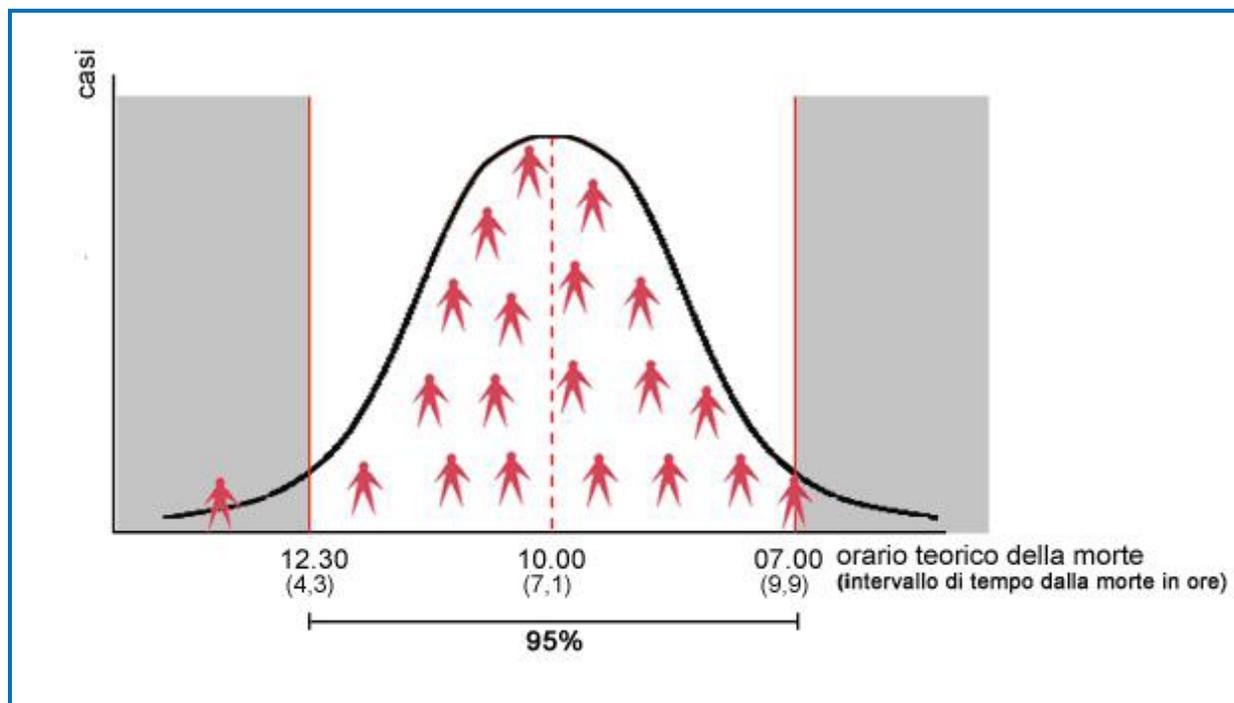


Figura 2 – Si noti che nessuno dei casi rappresentati si posiziona esattamente sul valore medio (7,1 h) e che uno dei venti casi (5%) è al di fuori dei limiti orari considerati

Questa rappresentazione grafica si riferisce alla situazione nella quale accettiamo un margine di errore del 5% e comporta una fascia di possibili intervalli di tempo dalla morte assai ampia (tra le ore 07.00 circa e le ore 12.30 circa del 13 agosto 2007 – calcolo basato sul metodo di Henssge per un peso corporeo di 50 chilogrammi).

Se vogliamo restringere questa fascia, e considerare per esempio un'epoca della morte compresa tra le ore 09.00 e le ore 11.00, il risultato è quello illustrato nella Figura 3.

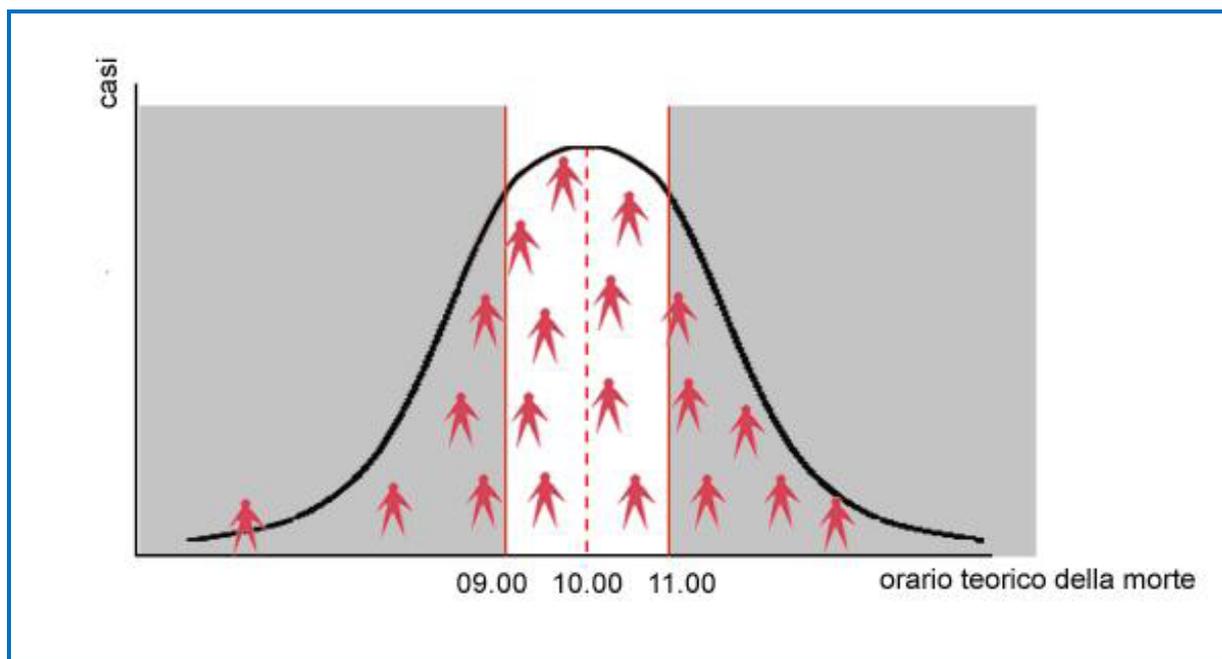


Figura 3

Come si vede, riducendo l'arco di tempo preso in considerazione aumentano le probabilità di errore (nel caso rappresentato graficamente i casi esclusi).

In sintesi, applicando il metodo di Henssge, possiamo ritenere che la morte di Chiara Poggi sia avvenuta tra le ore 07.00 e le ore 12.30 circa con il 5% di possibilità di errore e tra le ore 09.00 e le ore 11.00 con una possibilità di errore enormemente superiore.

La rappresentazione più realistica di questi risultati non consiste quindi nell'affermare che Chiara Poggi è morta circa 7,1 ore prima delle 17.00; asserire che la morte risale a 7,1 ore prima delle 17.00, con una oscillazione in più o in meno di 2,8 ore (4,3-9,9), è più corretto, ma rischia di indurre suggestione nel lettore, che può essere portato a ritenere del tutto marginale ed improbabile l'ipotesi di un ampio scostamento dal risultato "secco" delle 7,1 ore. La corretta rappresentazione sta nel dire onestamente che il 95% dei casi con le caratteristiche descritte si riferisce a delle morti avvenute tra le 4,3 e le 9,9 ore antecedenti la rilevazione della temperatura.

D'altra parte, se si esaminano le disparità dei risultati ottenuti applicando diversi metodi al caso concreto, così come illustrato anche dai consulenti Ballardini e Pierucci, si può

comprendere come gli stessi dati possano dar luogo ad interpretazioni diverse, da reputarsi tutte teoricamente legittime.

Anche il confronto tra i risultati forniti da due diversi siti internet, che utilizzano entrambi il metodo di Henssge con applicazione di diversi fattori di correzione, è eloquente: sulla base degli stessi dati, il sito www.swisswuff.ch indica una morte avvenuta 5 ore e ½ prima della rilevazione della temperatura, mentre, come già detto, il sito www.pathguy.com calcola 7,1 ore. La differenza, per chi abbia a mente le caratteristiche di questo caso giudiziario, non è da poco.

Tutto ciò senza prendere nemmeno in considerazione gli effetti dei possibili errori (anche piccoli) di misurazione nel corso del sopralluogo; un margine di errore è infatti intrinseco a ogni metodo di misurazione.

Un contributo solo apparentemente grossolano può essere fornito dall'esame del contenuto gastrico del cadavere e dai dati circostanziali.

Il corpo di Chiara Poggi era rivestito da un indumento estivo da notte; nello stomaco era contenuto materiale alimentare poltaceo (verosimilmente derivante dall'assunzione di alimenti per colazione). Questi dati fanno ritenere che la morte sia avvenuta probabilmente non molto tempo dopo il risveglio della ragazza.

Non riteniamo invece che possano essere di grande aiuto gli altri parametri tanatocronologici rilevati (rigidità cadaverica, macchie ipostatiche). In primo luogo, non crediamo che possano essere considerati attendibili, seppur valutati e riferiti senz'altro in buona fede, i riscontri della dott.ssa Rubbi (medico del 118 intervenuto). Le macchie ipostatiche, come è noto, si formano nelle parti declivi del cadavere che, nel caso di Chiara Poggi, erano ampiamente imbrattate di sangue ed in una posizione tale (appoggio ventrale su gradini, Fig. 4) da rendere oltremodo difficoltoso ogni apprezzamento anche da parte di medici legali esperti; le

Un ulteriore elemento di incertezza è rappresentato dall'intervallo di tempo intercorso tra l'inizio dell'aggressione e la morte. Questo arco di tempo deriva dalla somma della durata dell'aggressione stessa e della successiva sopravvivenza della vittima. Per questa valutazione risultano solo parzialmente utili, ma meritevoli comunque di discussione, i dati di sopralluogo e necroscopici.

Sappiamo che il primo significativo spargimento di sangue è avvenuto al piano terreno, probabilmente in prossimità della larga macchia di sangue situata alla base della scala che conduce al primo piano (Figg. 5,6). Le pantofole rinvenute non lontano (Fig. 7) fanno supporre che la ragazza le abbia perdute proprio a causa dell'aggressione, probabilmente in una fase iniziale. Seguono, accanto a gocce sparse nel soggiorno non facili da interpretare (Fig. 8), le strisciate determinate dalle dita della vittima¹², che evidentemente fu trascinata, afferrata per gli arti inferiori, sino nei pressi della porta che conduce alla scala del seminterrato (Fig. 9). Qui abbiamo un'altra ampia macchia di sangue (Fig. 10), quindi, lungo la scala, grosse pozze ancora umide al momento del rinvenimento, con evidenti segni di scolo del sangue lungo i gradini (Fig. 11). La testa del cadavere (unica fonte di sanguinamento) si trovava a valle dei primi gradini ampiamente imbrattati (si veda ancora la Fig. 11). L'interpretazione di questo dato porta a ritenere che il corpo abbia soggiornato per un certo tempo in una posizione diversa da quella terminale, con la testa situata a livello di uno dei gradini superiori. Quantificare questo tempo è sostanzialmente impossibile, perché non possiamo conoscere alcuni dati fondamentali. Sappiamo che la vittima ha perso sangue in discreta quantità al piano terreno, ma non vi sono nell'ambiente segni che indichino in quale punto si trovasse il corpo quando subì le più gravi lesioni, quelle

¹² È interessante a questo proposito notare una significativa discrepanza tra la notevole quantità di sangue raccolto nella pozza "iniziale" e la sua estrema scarsità lungo il tragitto di trascinamento. Ciò significa che le lesioni riportate nella fase iniziale erano scarsamente sanguinanti, oppure che l'emorragia si è temporaneamente arrestata. In entrambi i casi, si deve ritenere che la formazione di quella pozza abbia richiesto un tempo considerevole.

Un ulteriore elemento di incertezza è rappresentato dall'intervallo di tempo intercorso tra l'inizio dell'aggressione e la morte. Questo arco di tempo deriva dalla somma della durata dell'aggressione stessa e della successiva sopravvivenza della vittima. Per questa valutazione risultano solo parzialmente utili, ma meritevoli comunque di discussione, i dati di sopralluogo e necroscopici.

Sappiamo che il primo significativo spargimento di sangue è avvenuto al piano terreno, probabilmente in prossimità della larga macchia di sangue situata alla base della scala che conduce al primo piano (Figg. 5,6). Le pantofole rinvenute non lontano (Fig. 7) fanno supporre che la ragazza le abbia perdute proprio a causa dell'aggressione, probabilmente in una fase iniziale. Seguono, accanto a gocce sparse nel soggiorno non facili da interpretare (Fig. 8), le strisciate determinate dalle dita della vittima¹², che evidentemente fu trascinata, afferrata per gli arti inferiori, sino nei pressi della porta che conduce alla scala del seminterrato (Fig. 9). Qui abbiamo un'altra ampia macchia di sangue (Fig. 10), quindi, lungo la scala, grosse pozze ancora umide al momento del rinvenimento, con evidenti segni di scolo del sangue lungo i gradini (Fig. 11). La testa del cadavere (unica fonte di sanguinamento) si trovava a valle dei primi gradini ampiamente imbrattati (si veda ancora la Fig. 11). L'interpretazione di questo dato porta a ritenere che il corpo abbia soggiornato per un certo tempo in una posizione diversa da quella terminale, con la testa situata a livello di uno dei gradini superiori. Quantificare questo tempo è sostanzialmente impossibile, perché non possiamo conoscere alcuni dati fondamentali. Sappiamo che la vittima ha perso sangue in discreta quantità al piano terreno, ma non vi sono nell'ambiente segni che indichino in quale punto si trovasse il corpo quando subì le più gravi lesioni, quelle

¹² È interessante a questo proposito notare una significativa discrepanza tra la notevole quantità di sangue raccolto nella pozza "iniziale" e la sua estrema scarsità lungo il tragitto di trascinamento. Ciò significa che le lesioni riportate nella fase iniziale erano scarsamente sanguinanti, oppure che l'emorragia si è temporaneamente arrestata. In entrambi i casi, si deve ritenere che la formazione di quella pozza abbia richiesto un tempo considerevole.

I dati di sopralluogo e le caratteristiche macroscopiche delle lesioni non sono quindi di grande aiuto per accertare la durata dell'aggressione. Le caratteristiche istologiche, così come evidenziate dal dott. Ballardini e confermate dalla nostra revisione dei preparati (vetrini), sono indicative di una sopravvivenza non lunga; tuttavia, non stupirebbe se i fatti si fossero protratti anche per alcune decine di minuti.

È da notare che in quella che noi abbiamo reputato essere verosimilmente la prima fase dell'aggressione (formazione di un'ampia pozza di sangue alla base della scala che conduce al primo piano) la ragazza molto probabilmente ha perduto conoscenza ed altrettanto probabilmente non ha riportato grosse ferite. Infatti, se non vi fosse stata una perdita di conoscenza, probabilmente non si sarebbe formata una pozza di sangue concentrata e gli arti superiori non sarebbero stati trascinati in modo passivo, senza segni di reazioni volontarie. Inoltre, se vi fosse stata in fase iniziale una ferita, essa non avrebbe cessato di sanguinare durante il trascinamento; in modo particolare, se la ferita fosse stata al cuoio capelluto, vi sarebbero segni di strisciamento di capelli insanguinati. È quindi verosimile che in prossimità della porta di ingresso dell'abitazione la ragazza abbia subito solo traumatismi contusivi senza importanti ferite, verosimilmente al viso (ove in autopsia sono state evidenziate ecchimosi ed escoriazioni); la fuoriuscita di sangue potrebbe derivare da una epistassi o dalle piccole ferite delle palpebre.

Le sedi di prelievo dei campioni per esami istologici corrispondono alle più grosse ferite del cuoio capelluto e della regione mascellare destra, mentre non sono state prelevate le ecchimosi e le escoriazioni al volto, che potrebbero essere state prodotte in una fase anche sensibilmente anteriore¹³.

¹³ È poi da considerare l'eventualità che vi sia stata una parziale asfissia meccanica; detta ipotesi è suggerita dal rilievo istologico di un diffuso marcato enfisema polmonare acuto. Per la verità, non sono descritti segni generici di morte asfittica, né segni di traumatismo in corrispondenza del collo e degli orifizi respiratori, ma non si può escludere, per esempio, che vi sia stata una azione, interrottasi prima della morte, di soffocamento o di immobilizzazione del torace.

In conclusione, il riesame del caso ci porta a ritenere non valutabile con precisione l'epoca della morte, se non affermando che essa avvenne nel corso della mattinata del 13 agosto 2007.

Per quanto riguarda l'aggressione, essa non fu un atto fortemente concentrato nel tempo, essendo individuabili almeno due fasi cronologicamente ben distinte; non è possibile stabilire la durata dell'intero episodio, ma esso potrebbe essersi protratto nel suo insieme anche per alcune decine di minuti.

PARTE SECONDA

*QUESITO B2 – ESSICCAMENTO DELLE
MACCHIE DI SANGUE*

MATERIALI E METODI

Dati documentali

Risulta dagli atti che alle 13.50 del 13 agosto 2007 Alberto Stasi si presentò alla Stazione Carabinieri di Garlasco riferendo di avere rinvenuto poco prima il corpo di Chiara Poggi.

Il brigadiere Serra ha riferito che al suo arrivo nell'abitazione le macchie di sangue di maggiori dimensioni sul pavimento erano di colore rosso vivace e che questo colore si è modificato successivamente, divenendo più scuro. A proposito delle macchie più piccole ha affermato di non avere ricordi precisi. Il carabiniere Muscatelli ha dichiarato che le macchie erano tutte umide, ad eccezione di quelle più piccole.

La dott.ssa Rubbi del 118 ha riferito invece che al suo arrivo (ossia poco dopo le ore 14) le macchie di sangue al piano terreno erano tutte secche, mentre era ancora umido il sangue lungo le scale ove si trovava il cadavere.

Le fotografie dei primi sopralluoghi sono di qualche aiuto.

Su un'immagine scattata alle ore 14.18 (Fig. 12), che ritrae l'ampia macchia di sangue presente alla base della scala che conduce al primo piano, si apprezzano gocce di sangue con un aspetto caratteristico: la parte centrale risulta separata da quella periferica da una sottile crepa a forma di corona circolare irregolare.

Anche a proposito delle gocce vi sono alcune fotografie utili. Risulta infatti che alle ore 14.13 due macchioline di sangue presso il divano del soggiorno erano state parzialmente distaccate dal pavimento, lasciando adesa solo la parte periferica (Fig. 15).



Figura 15

Prove sperimentali

Durante le operazioni peritali abbiamo utilizzato alcune piastrelle consegnateci dai coniugi Poggi, sulle quali abbiamo lasciato colare sangue appena prelevato da donatore, formando gocce, ampie macchie spesse ed una macchia che abbiamo subito dopo strisciato con una spugna.

I tempi di essiccamento e, in generale, le modificazioni delle macchie con il trascorrere del tempo, non sono stati omogenei.

Riportiamo qui di seguito alcune immagini eloquenti.

DISCUSSIONE

Occorrerebbe definire in primo luogo il concetto di “macchia secca” e di “macchia umida”, cosa che è sostanzialmente impossibile. Si tratta di rilievo organolettico basato essenzialmente sulla lucentezza della superficie, apprezzabile in misura maggiore o minore – direttamente ed in fotografia – in relazione all’incidenza della luce.

In effetti, esaminando le fotografie di sopralluogo si può osservare che solo in alcuni casi si ha la possibilità di stabilire che le macchie sono secche, nel senso che hanno una superficie opaca, finemente grinzosa. Le stesse macchie, su altre immagini, appaiono invece in modo tale da non consentire alcun giudizio.

Un altro ostacolo è rappresentato dalla mancanza di utili parametri oggettivi per la valutazione del grado di essiccamento. L’unico dato utile sarebbe la percentuale di acqua, ma esso sarebbe troppo laborioso da rilevare e sostanzialmente inapplicabile al caso concreto, ove nessuna misurazione di questo genere è stata effettuata.

Grossolanamente, si può ritenere che il prosciugamento della macchia proceda in modo progressivo, determinando un essiccamento dapprima della periferia, ove essa è più sottile, quindi al centro, con la produzione – non costante – di un distacco tra queste due porzioni. Altro dato riguarda la maggiore o minore capacità di adesione della macchia al substrato sulla quale è applicata: la porzione periferica della goccia, una volta essiccata, risulta in genere più tenacemente adesa alla piastrella rispetto al centro. Questa caratteristica si apprezza particolarmente bene dopo la sollecitazione meccanica determinata dal calpestamento, che può lasciare sulla piastrella solo una corona circolare di sangue.

Il comportamento delle macchie di maggiori dimensioni non è sostanzialmente diverso rispetto a quello delle gocce: il maggiore spessore condiziona ovviamente un prolungamento dei

tempi di essiccamento. Nel caso invece di macchia “spugnata”¹⁴, determinandosi uno strato di sangue ampio ma sottile, si ha una adesione piuttosto omogenea al substrato, con tempi di essiccamento anche inferiori rispetto alle gocce singole.

Con queste premesse, nel corso delle nostre sperimentazioni abbiamo osservato tempi di essiccamento disomogenei (tra 1 ora e 20 minuti e più di 2 ore per le gocce) e ci è difficile correlarli con particolari situazioni ambientali.

Molto grossolanamente – ed anche molto soggettivamente – abbiamo notato che i tempi di prosciugamento più lunghi si sono verificati nella giornata del 10 ed in quella del 14 luglio, con clima caldo e umido, mentre le macchie si sono essiccate più rapidamente il 20 luglio, giornata relativamente secca e meno calda, nonché il 23 luglio – clima caldo e secco – a Pisa. Si tratta di rilievo come già detto molto grossolano, in accordo però con il buon senso e le nozioni della Fisica. In ogni caso, non è questo un dato di particolare utilità, poiché non conosciamo le caratteristiche micro-climatiche del piano terreno dell’abitazione della famiglia Poggi il 13 agosto 2007.

Alcuni dati ci possono invece aiutare, non tanto per fornire un giudizio di ordine generale sui tempi di essiccamento delle macchie di sangue, quanto piuttosto per sapere se nel momento in cui Alberto Stasi ha riferito di essere entrato nella casa della famiglia Poggi il sangue sul pavimento fosse secco oppure umido. Egli in proposito ha dichiarato di avere rinvenuto il cadavere e di essersi quindi subito recato dai Carabinieri, ove risulta essersi presentato alle 13.50. Secondo questa ricostruzione è logico ritenere che il suo ingresso in casa Poggi non sia avvenuto prima delle ore 13.30.

Dalle immagini di sopralluogo si deduce che:

- alle ore 14.18 alcune gocce di sangue presenti sul pavimento mostravano un distacco della parte centrale nei confronti della periferia;

¹⁴ Si vedano il paragrafo “materiali e metodi” e la Fig. 24.

- alle ore 14.16 l'ampia macchia di sangue presente presso la porta che conduce al seminterrato era completamente asciutta;
- alle ore 14.13 le porzioni centrali di alcune macchioline di sangue sul pavimento del piano terreno erano state distaccate, lasciando adesa la porzione periferica, probabilmente per calpestamento; non è dato di sapere se detto calpestamento sia avvenuto ad opera di Alberto Stasi oppure delle persone intervenute successivamente.

In sostanza, possiamo ritenere che meno di 40 minuti dopo il riferito passaggio di Alberto Stasi nell'abitazione almeno una buona parte del sangue presente sul pavimento del piano terreno – ed eventualmente anche la sua totalità – fosse secca.

Questa osservazione non è ovviamente sufficiente per affermare che nel momento in cui Alberto Stasi ha dichiarato di essere entrato nell'abitazione il sangue fosse già completamente essiccato, ma ci permette di ritenere che molto probabilmente esso fosse – se non completamente – almeno parzialmente secco; non ci consente in ogni caso di escludere che detto sangue fosse già secco¹⁵.

È invece pacifico che buona parte del sangue raccolto in pozze e colato lungo le scale che conducono al seminterrato fosse ancora francamente liquido: depongono in tal senso non solo le dichiarazioni della dottoressa Rubbi, ma anche le immagini di sopralluogo come quella della figura 41 (scattata alle ore 17.15).

¹⁵ Questi rilievi possono avere una qualche applicazione anche per quanto riguarda il problema del momento dell'aggressione. Qualora avessimo la dimostrazione che il sangue del piano terreno fosse completamente o parzialmente umido, potrebbe essere fatto un tentativo di datazione; trattandosi invece di sangue possibilmente del tutto essiccato, ogni tentativo in questa direzione risulta inutile.

PREMESSA ALLE PARTI

- *TERZA (B3 – TRACCE SUI PEDALI DELLA BICICLETTA “Umberto Dei Milano”)*
- *QUARTA (B4 – TRACCE SUL PORTASAPONE)*
- *QUINTA (B5 – TRACCE DI SANGUE SULLE SCARPE DI ALBERTO STASI)*

In queste indagini un problema di notevole importanza concerne la sensibilità e la specificità dei metodi utilizzati e la maggiore o minore soggettività dell'interpretazione dei risultati.

La ricerca di tracce di sangue prevede di norma l'utilizzo di test presuntivi (non specifici e soggetti a svariati tipi di falsi positivi), seguiti da indagini confermative (specifiche, con positività pressoché esclusiva in presenza di sangue umano). Una volta determinata la natura ematica di una macchia è possibile effettuare l'attribuzione individuale della stessa mediante isolamento, amplificazione e caratterizzazione del DNA.

Tra i test presuntivi vi è innanzitutto quello basato sull'utilizzo del **luminol** (5-ammino-2,3-diidro-1,4-ftalazindione). La reazione sfrutta l'abilità dell'emoglobina e dei suoi derivati presenti nel sangue di catalizzare l'ossidazione del luminol, in presenza di una soluzione alcalina (in genere perborato di sodio) e di un agente ossidante (perossido d'idrogeno), con conseguente emissione di luminescenza sotto forma di luce blu. Si tratta di un test estremamente sensibile, idoneo ad evidenziare anche tracce di sangue non più visibili ad occhio nudo (perché in parte cancellate o diluite mediante lavaggio), tant'è che in letteratura scientifica è riportata l'osservazione di chemiluminescenza anche in presenza di diluizioni di sangue sino a 1:100.000.000.¹⁶ All'opposto, una più recente pubblicazione indica una soglia di sensibilità assai più modesta (1:200).¹⁷ Queste discrepanze sono ragionevolmente da attribuirsi a difformità nei metodi e nel disegno delle condizioni sperimentali; la maggioranza dei lavori scientifici pubblicati in materia indicano una sensibilità intermedia a quelle citate, in corrispondenza di diluizioni di sangue comprese tra 1:100.000 e 1:5.000.000.^{18,19} Ciò su cui vi è totale accordo è il

¹⁶ Proescher F, Moody AM. *Detection of blood by means of chemiluminescence*. J Lab Clin Med 1939;24:1183-9.

¹⁷ Fregeau CJ, Germain O, Fourney RM. *Fingerprint enhancement revisited and the effects of blood enhancement chemicals on subsequent Profiler PlusTM fluorescent short tandem repeat DNA analysis of fresh and aged bloody fingerprints*. J Forensic Sci 2000;45:354-80.

¹⁸ Webb JL, Creamer JI, Quickenden TI. *A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques*. Luminescence 2006;21:214-20.

fatto che il test sia largamente aspecifico, reagendo positivamente con, tra gli altri: svariati composti metallici in grado di catalizzare la reazione in modo identico al ferro dell'emoglobina (sali di rame, ferro, nickel, vernici metalliche); detergenti a base di candeggina; sostanze vegetali ad elevato contenuto di perossidasi (ravanelli, rape, etc.)²⁰. Si tratta peraltro di un test di grande utilità, che consente di saggiare in breve tempo vaste superfici identificando e localizzando su di esse potenziali tracce d'interesse da sottoporre ad indagine confermativa.

Altri comuni test presuntivi sfruttano l'attività simil-perossidasi del gruppo eme dell'emoglobina. Tutti questi esami si basano sulla capacità dell'emoglobina di catalizzare reazioni di tipo ossidativo, evidenziate dal viraggio colorato di un particolare substrato reattivo (fenolftaleina, leucomalachite, benzidina). La **tetrametilbenzidina (TMB)** è un derivato di quest'ultimo composto, ad esso preferibile in quanto non cancerogeno, contenuta nelle comuni strisce reattive per esame delle urine, che in anni recenti hanno trovato comune applicazione anche in ambito forense in ragione della loro semplicità d'utilizzo e maneggevolezza (strisce reattive di tale tipo, "Combur test", commercializzato da Roche e "Hemastix/Multistix 10SG" commercializzato da Bayer-Siemens, sono state rispettivamente utilizzate nelle attività di consulenza tecnica espletate dal R.I.S. e in questa perizia). Si tratta di un test meramente qualitativo, basato sull'osservazione visiva del viraggio colorato dell'area reattiva di colore il giallo verso il blu-verde intenso ed il suo confronto con una scala colorimetrica fornita con la confezione dei test, dunque poco standardizzabile. Si consideri, tra l'altro, che la necessità di saggiare con la striscia reattiva superfici sporche o imbrattate, come accade sovente in ambito forense (e questo era naturalmente il nostro caso, dovendo testare pedali, suole di scarpe usate, ecc.), rende ulteriormente critica la possibilità di chiara lettura. Oltre alla qualità/intensità della

¹⁹ Tobe SS, Watson N, Daéid NN. *Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA.* J Forensic Sci 2007;52(1):102-109.

²⁰ Creamer JI, Quickenden TI, Apanah MV, Kerr KA, Robertson P. *A comprehensive experimental study of industrial, domestic and environmental interferences with the forensic luminol test for blood.* Luminescence 2003;18:193-198.

reazione colorata ha rilievo la sua velocità di comparsa: come riportato nello stesso manuale di istruzioni allegato a Multistix si precisa che “*variazioni di colore che si verificano dopo 2 minuti non hanno alcun valore diagnostico*”. Lo stesso manuale di istruzioni indica per il test una sensibilità pari a 0,015-0,062 milligrammi di emoglobina per decilitro di urina, pari a 5-20 eritrociti per microlitro d’urina. Uno studio sperimentale condotto in ambito forense⁴ riporta risultati positivi in presenza di diluizioni di sangue sino a 1:100.000 (per una quantità assoluta pari a 40-50 eritrociti). Anche nel caso della tetrametilbenzidina, tuttavia, la varietà di sostanze in grado di generare false reazioni positive è amplissima. Lo stesso manuale di istruzioni di Multistix mette in guardia, nell’uso clinico, nei confronti di false positività in presenza di contaminanti ossidanti, quali ipoclorito e perossidasi microbiche. È chiaro che, estendendo queste avvertenze all’ambito forense – dove i materiali in grado di dare cross-reazione (anche in tempi brevi, al di sotto dei 2 minuti suggeriti quale limite massimo per la lettura) non sono più solo quelli potenzialmente contenuti nelle urine – la lista si fa pressoché infinita. Facendo riferimento a una selezione di studi sperimentali particolarmente dettagliati^{21,22}, si ricordano: un’ampia varietà di vegetali (asparago, avocado, fagiolo, broccoli, cavolino di Bruxelles, cavolo, carota, cavolfiore, sedano, granoturco, cetriolo, melanzana, aglio, lattuga, cipolla, patata, rafano, spinaci, pomodoro, rapa, mela, albicocca, banana, melone, ciliegia, uva, mandarino, pesca, pera, ananas, prugna), funghi, agenti ossidanti quali la candeggina e il permanganato di potassio. A conferma di quanto detto giova anticipare alcuni dei risultati delle prove sperimentali effettuate, che dimostravano chiaramente che su suole di scarpe imbrattate di sangue e poi utilizzate per camminare erano poi evidenziabili reazioni positive in corrispondenza di piccole concentrazioni di materiale di varia natura acquisito dalle suole successivamente durante la marcia.

²¹ Cox M. *A study of the sensitivity and specificity of four presumptive tests for blood*. J Forensic Sci 1991;36:1503-1511.

²² Garner DD, Cano KM, Peimer RS, Yeshion TE. *An evaluation of tetramethylbenzidine as a presumptive test for blood*. J Forensic Sci 1976; 21:816-821.

Occorre tenere infine in considerazione che il test non è né specie-specifico (eguali reazioni positive si avranno tanto con sangue umano che di qualunque altro animale), né tessuto-specifico: minute quantità di sangue sono ovviamente presenti in numerosissimi tessuti biologici. Per tale ragione, un'eventuale positività al test accompagnata da successivo isolamento e caratterizzazione di DNA umano non permette di escludere che il materiale saggiato sia costituito da fluidi biologici umani diversi da sangue: il lavoro precedentemente citato di Tobe et al. riporta, ad esempio, positività al test Hemastix nel 12% dei campioni di saliva esaminati.

Il solo tipo di test confermativo per la presenza di sangue umano di attuale impiego in campo forense (fatte salve le analisi condotte su RNA messaggeri tessuto-specifici, che hanno avuto al momento esclusiva applicazione in ambito sperimentale) è basato su reazioni di tipo immunologico. Le metodiche più popolari, per semplicità e praticità d'utilizzo, sono state mutate nuovamente dall'ambito clinico; si tratta, in particolare, di **test immunocromatografici rapidi** per la ricerca di sangue occulto nelle feci. Sistemi analitici di questo tipo ("Hexagon OBTI", commercializzato da Human e "HemDirect", commercializzato da Seratec) sono stati utilizzati, rispettivamente, nelle attività di consulenza tecnica espletate dal R.I.S. e in questa perizia. Essi si basano non più su generiche proprietà chimico-enzimatiche dell'emoglobina, bensì sull'utilizzo di anticorpi monoclonali di topo, appositamente creati in laboratorio per riconoscere in maniera specifica la struttura tridimensionale di tratti della catena aminoacidica dell'emoglobina umana (antigene). Si tratta pertanto di un metodo assolutamente specifico (con la sola, irrilevante, possibilità di falsi positivi nei confronti di emoglobina di altri primati presente nel campione) e, benché pur sempre a carattere qualitativo, di più chiara lettura rispetto al test con tetrametilbenzidina: la presenza/assenza di emoglobina umana è infatti dimostrata dalla comparsa/non comparsa (entro 10 minuti dalla deposizione del campione sulla piastrina immunocromatografica) di una banda rossa nella regione test. La comparsa di una seconda banda in una adiacente regione di controllo fornisce inoltre una verifica interna della funzionalità del

sistema anticorpale. Per quanto riguarda la sensibilità della metodica, uno studio pubblicato nel 1999 e relativo a “Hexagon OBTI”²³ riportava risultati positivi in presenza di emoglobina diluita sino a 1:100.000 in acqua o 1:1.000.000 (pari a un totale di circa 500 eritrociti) utilizzando l’apposito buffer di risospensione del campione fornito con il kit. I campioni erano stati allestiti facendo seccare aliquote di 10 microlitri di varie diluizioni di sangue fresco, poi sottoposte al test nella loro interezza. Il lavoro segnalava inoltre la possibilità di falsi negativi in presenza di campioni caratterizzati da pH fortemente basico (ad es. trattati con soluzione di luminol): per tale ragione tutti i test effettuati nel corso della nostra attività sono stati preceduti dalla verifica del pH delle risospensioni di tracce da sottoporre a immunocromatografia, in maniera tale da verificarne preventivamente la neutralità. Un più recente studio condotto su “Hexagon OBTI” ed effettuato raschiando con l’applicatore macchie secche ottenute a partire da progressive diluizioni di un’aliquota di sangue di 50 microlitri ha mostrato risultati positivi sino a diluizioni 1:10.000, avendo cura però di ridurre il volume del buffer di estrazione dai 2 millilitri del protocollo originale a soli 200 microlitri, in modo da concentrare l’emoglobina²⁴. Per il sistema “HemDirect” da noi utilizzato, il manuale di istruzioni allegato indica una soglia minima di sensibilità in corrispondenza di concentrazioni di emoglobina pari a 40 nanogrammi per millilitro. Considerando che 10 microlitri di sangue intero contengono, in un adulto normale di sesso femminile, 120-160.000 nanogrammi di emoglobina, si attendono pertanto positività in presenza di diluizioni dell’ordine di 1:3.000-4.000. Un’idea più concreta della sensibilità della metodica è derivata da prove sperimentali condotte in laboratorio a fine di validazione, preliminari alla sua introduzione nei protocolli analitici di routine. Saggiando diluizioni seriali con acqua ottenute a partire da 3 microlitri di sangue intero (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, ecc.), si è osservata la comparsa di risultati positivi sino a diluizioni di 1:1000 (pari a un volume

²³ Hochmeister MN, Budowle B, Sparkes R, Rudin O, Gehrig C, Thali M et al. *Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood*. J Forensic Sci 1999; 44:597-602.

²⁴ Johnston E, Ames CE, Dagnall KE, Foster J, Daniel BE. *Comparison of presumptive blood test kits including hexagon OBTI*. J Forensic Sci 2008;53:687-689.

totale di sangue di 3 nanolitri), avendo cura di ridurre a un decimo il volume del buffer di risospensione, come indicato da Johnston et al.

Un non secondario vantaggio del test immunocromatografico è, infine, quello di non essere distruttivo. Come dimostrato dai due studi sopraccitati, l'aliquota di buffer nella quale è stata risospesa la traccia che non viene utilizzata per la reazione immunologica può essere impiegata per l'isolamento del DNA: Hochmeister et al. osservano che nel surnatante ottenuto mediante centrifugazione del liquido di risospensione (poi utilizzato per il test immunocromatografico) non è contenuto DNA, che si preserva nella sua interezza nel deposito cellulare al fondo della provetta e può pertanto essere avviato all'estrazione; in base a Johnston et al., profili genetici completi possono essere ottenuti da residui contenenti diluizioni di sangue sino a 1:10.000, profili parziali in diluizioni sino a 1:100.000-1:1.000.000 (quindi al di sotto della soglia di sensibilità del test immunocromatografico stesso).

In conclusione è evidente come il test immunocromatografico sia meno sensibile, perlomeno di uno se non di due ordini di grandezza, rispetto a quello con tetrametilbenzidina²⁵. Esso tuttavia fornisce il vantaggio di una lettura univoca, assai meno falsata da giudizi qualitativi personali non standardizzabili, e di assoluta specificità per l'identificazione di sangue umano, anche in presenza di quantità esigue (pochi nanolitri, vale a dire milionesimi di millilitro). Vale ovviamente per il test immunocromatografico quanto precisato in conclusione riguardo alla tetrametilbenzidina: il riscontro di una positività dimostra la presenza di sangue, non che la traccia saggiata sia per natura istologica costituita da solo sangue. Nello studio citato di Hochmeister et al. positività furono ottenute ad esempio nei confronti di una larga varietà di fluidi biologici umani (saliva, urina, feci, secrezioni vaginali, sperma) con la sola eccezione del sudore.

²⁵ Il paragone non è del tutto appropriato, perché si riferisce alla capacità di dare un risultato positivo testando soluzioni liquide contenenti sangue. L'applicazione pratica per la ricerca di tracce di sangue è invece differente: con il Combur test si saggia direttamente l'oggetto sul quale si ricerca il sangue, tamponandolo con la cartina, mentre per la ricerca dell'emoglobina umana occorre spazzolare con un tampone la sede ove si vuole effettuare il prelievo e quindi disciogliere il residuo catturato, preparando di fatto una soluzione.

Come detto in precedenza, una volta effettuata, ove possibile, la diagnosi di natura della traccia, l'attribuzione individuale è condotta mediante **test genetico**. L'analisi prevede l'"amplificazione" (creazione in laboratorio di milioni di copie del DNA originario, isolabile dalla traccia, mediante una reazione detta PCR) di regioni del genoma caratterizzate da variabilità inter-individuale ("polimorfismi"; le varianti polimorfiche presenti in ciascun soggetto sono dette invece "alleli"), le quali possono essere poi comparate nel campione e nel soggetto d'interesse. La reazione di PCR utilizza, per la copiatura, brevi inneschi di DNA artificiale ("*primer*") disegnati in maniera tale che la loro sequenza di nucleotidi sia precisamente complementare ai tratti di DNA che fiancheggiano le regioni polimorfiche del genoma umano che si desidera amplificare. Ciò fa sì che la reazione amplifichi esclusivamente e in modo specifico DNA umano (cross-reazioni possono verificarsi in presenza di materiale biologico di altri primati, eventualità peraltro del tutto trascurabile). Grazie alla PCR è possibile la chiara caratterizzazione di polimorfismi anche a partire da tracce estremamente esigue. I sistemi per l'amplificazione del DNA utilizzati, tanto nelle attività di indagine svolte dal R.I.S. che in questa perizia, sono costituiti da prodotti commerciali distribuiti dalla ditta Applied Biosystems. I kit "Identifiler" e "Minifiler", che consentono di effettuare in una singola reazione di PCR la simultanea amplificazione di più polimorfismi, hanno un *range* di applicazione ottimale – in base ai manuali di istruzioni allegati – in presenza di quantità di DNA di partenza pari a 1,25-0.5 nanogrammi e 0.75-0.5 nanogrammi, rispettivamente. Per chiarezza si precisa che il contenuto in DNA di una singola cellula è pari a circa 0.006 nanogrammi, il che significa che i sistemi hanno una soglia di sensibilità "garantita" sino a 80 cellule nucleate circa, presenti nella traccia di interesse. In realtà è noto dalla letteratura e dalla pratica peritale (fatto indicato anche negli stessi manuali d'istruzione citati) come sia possibile caratterizzare con successo i polimorfismi a partire da quantità assai più ridotte di DNA. Tuttavia, in presenza di *input* iniziali di DNA dell'ordine di 0,1 nanogrammi (16 cellule nucleate, all'incirca) è frequente osservare fenomeni artefattuali (comparsa di alleli spuri, perdita parziale o completa di alleli in realtà effettivamente

presenti nel genotipo) che complicano grandemente l'interpretazione del risultato.²⁶ Inoltre, stante la pressoché costante e ubiquitaria dispersione di DNA da parte degli esseri umani negli ambienti da essi frequentati (mediante manipolazione di oggetti, deposito di goccioline di saliva, sudorazione, ecc.), la lettura dei risultati in questi casi è ulteriormente ostacolata dalla possibile presenza di piccole quantità di DNA contaminanti accanto a quello d'interesse. Detto ciò è importante sottolineare che il corredo di polimorfismi individuale che caratterizza un soggetto è il medesimo in tutti i suoi tessuti, siano essi il sangue periferico, un'unghia del piede o il bulbo di un pelo del naso. Ciò significa che, a meno che si abbia a che fare con tracce immediatamente apprezzabili all'occhio, il sillogismo “sangue umano” → “DNA umano” → “DNA umano attribuito ad X” = “sangue di X” non è obbligatoriamente corretto.

²⁶ Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. *An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA*. Forensic Sci Int 2000;112:17-40.

PARTE TERZA

QUESITO B3 – TRACCE SUI PEDALI

DELLA BICICLETTA

“Umberto Dei Milano”

MATERIALI E METODI

Dati documentali

Si riportano in modo sintetico le attività di indagine effettuate sulla bicicletta di marca “Umberto Dei Milano”, e più specificatamente sui pedali, come da Relazione tecnica 3306IT2007 del R.I.S di Parma datata 15 novembre 2007 (accertamenti biologici).

La bicicletta è stata interamente nebulizzata con Luminol senza che emergesse alcuna “*luminescenza significativa*” (in realtà nella relazione preliminare datata 26.09.07 il c.t. Cap. Marino precisava che “*le parti metalliche hanno fornito una luminescenza diffusa mentre le parti in plastica, degli spot di luminescenza di dubbia natura*”). I pedali e le manopole sono stati quindi saggiati “*a campione*” con Combur test, che ha avuto esito negativo. Negativo il risultato del Combur test anche su tracce “*di dubbia natura visibili a occhio nudo*”. Dalle superfici dei pedali (in corrispondenza dei piani di potenziale contatto con i piedi) è stato effettuato un unico prelievo bilaterale (denominato “bu_p”) da sottoporre ad estrazione del DNA.

Il campione è risultato inibito alla quantificazione di DNA mediante metodica real time PCR. Dopo successiva purificazione dell’estratto, il campione – avente un volume finale pari a circa 40 µl (come precisato nella relazione preliminare datata 26.09.07) – ha generato un risultato positivo con una concentrazione di DNA pari a 2,8 ng/µl (valore riportato nelle relazioni preliminari datate 24.09.07 e 26.09.07 del C.T. del P.M. e desumibile anche dall’analisi della copia del file di quantificazione “Q17092007MAR_1_dopo_la_purificazione.sds” fornitoci dallo stesso C.T. del P.M.). La successiva amplificazione del DNA con il sistema Identifiler ha prodotto un profilo genetico identico a quello di Chiara Poggi (l’elettroferogramma è allegato alla relazione tecnica).

Successivamente al prelievo “bu_p”, i pedali sono stati esaminati mediante stereomicroscopio. Sono così state individuate: cinque tracce di potenziale interesse sul pedale

destro (denominate da “1” a “5”); tre tracce di potenziale interesse sul pedale sinistro, due “*lateralì*” (“a” e “c”) e una sul “*tacchetto del battente*” (“b”).²⁷

Delle tracce individuate sul pedale destro si dice che quattro (non si precisa quali) sono state sottoposte al Combur test, con esito positivo. Tutte positive al Combur test sono risultate le tre tracce rinvenute sul pedale sinistro.

La traccia “1” è stata eluita in un volume di soluzione fisiologica non precisato e due microlitri di tale soluzione sono stati sottoposti ad esame al microscopio ottico, utilizzando un vetrino precolorato “*Testsimplets*” (Waldeck). L’aliquota restante di eluito è stata direttamente impiegata per la quantificazione del DNA senza precedente estrazione (campione “bu_p1”), con esito negativo. Sul campione è stata egualmente effettuata amplificazione con Identifiler, senza ottenere profili genetici interpretabili.

Le tracce denominate “4” e “5” sono state sottoposte ad analisi dello spettro nell’infrarosso (IR), in condizioni analitiche non precisate. La traccia “4” è stata recuperata al termine dell’esame e avviata a estrazione del DNA (campione “bu_p4”); la successiva quantificazione è stata negativa; il campione è stato comunque amplificato con il sistema Minifiler senza generare profili genetici interpretabili.

L’insieme delle microtracce evidenziate su entrambi i pedali è stato infine prelevato in un unico campione (“bu_p_tot1”) per l’estrazione di DNA. La successiva quantificazione è risultata negativa, così come l’amplificazione con sistema Identifiler, che non ha prodotto profili genetici interpretabili.

Sulle superfici dei pedali è stato inoltre eseguito, con le medesime modalità del prelievo “bu_p”, un secondo prelievo (“bu_p_tot2”), che, sottoposto a test per la presenza di amilasi, ha dato esito negativo. Il prelievo è stato avviato a estrazione del DNA; la quantificazione è risultata

²⁷ Per la localizzazione di dette tracce si rimanda all’ampio corredo iconografico che accompagna la relazione del C.T. del P.M.

negativa; è stata fatta comunque amplificazione con Identifiler, senza ottenere profili genetici interpretabili.

L'esame con stereomicroscopio ha inoltre evidenziato una traccia sulla staffa del pedale sinistro positiva al Combur test; la traccia ("bu_ss1") è stata sottoposta a estrazione del DNA; la successiva quantificazione è risultata negativa; il campione è stato comunque amplificato con Minifiler, senza generare profili.

Da altre parti della bicicletta sono stati inoltre effettuati i seguenti prelievi (tutti risultati negativi o inibiti alla quantificazione del DNA e negativi per la presenza di profili genetici – anche dopo purificazione – alla successiva amplificazione con Minifiler):

- manopole, bilateralmente (campione ("bu_m"));
- canna ("bu_canna"), manubrio ("bu_manubrio") e sella ("bu_sella"). I tre campioni sono stati sottoposti a ricerca di amilasi, con esito negativo.

Ricerca di emoglobina e DNA umani sui pedali della bicicletta di marca "Umberto Dei Milano"

Il test con tetrametilbenzidina è stato da noi effettuato utilizzando strisce reattive Multistix 10SG (Bayer-Siemens).²⁸ L'area reattiva contenente tetrametilbenzidina è stata imbevuta con soluzione fisiologica sterile e quindi accostata alla traccia di interesse: è stata quindi valutata la comparsa, tanto sull'area reattiva che sul substrato sul quale era localizzata la traccia di interesse, di viraggio colorato blu/verde entro i due minuti. I risultati sono riportati in forma qualitativa secondo i gradi di giudizio: positivo (rapida e vivace comparsa di colorazione blu/verde); dubbio (comparsa di colorazione verdastra non immediata, ma pur sempre entro due minuti); negativa (assenza di viraggio colorato o colorazione bruno-nerastra dell'area reattiva palesemente attribuibile all'asportazione di sporcizia dalla superficie campionata).

²⁸ Le strisce Multistix 10SG risultano in tutto e per tutto analoghe a "Hemastix" se non per la presenza di aree reattive addizionali per altre sostanze: nitriti, glucosio, ecc.

Il test immunocromatografico per la ricerca di emoglobina umana è stato effettuato utilizzando il sistema HemDirect (Seratec). La superficie di interesse è stata spazzolata con un tampone imbevuto di soluzione fisiologica sterile, la cui estremità in cotone è stata quindi risospesa in 200 microlitri del buffer di estrazione fornito con il kit e posta su agitatore orizzontale per 2 ore a temperatura ambiente. Il materiale è stato quindi centrifugato. Uno-due microlitri di surnatante sono stati depositati su una cartina di tornasole al fine di verificare che il pH della soluzione fosse vicino alla neutralità. Cento microlitri di soluzione sono stati quindi caricati sulla piastra immunocromatografica. La lettura del risultato è stata effettuata a 10 minuti dalla deposizione del campione. I risultati sono stati riportati in forma qualitativa secondo il grado di giudizio: positivo (comparsa di una banda rossa nella regione test, in presenza di banda rossa nella regione controllo); negativo (assenza di banda rossa nella regione test, in presenza di banda rossa nella regione controllo).

L'estrazione del DNA è stata compiuta a partire dall'aliquota residua di liquido di risospensione per test immunocromatografico utilizzando il kit QIAamp DNA Micro (QIAGEN) secondo le indicazioni della ditta produttrice. L'eluizione finale del DNA è stata effettuata in un volume di 50 microlitri.

Due microlitri di ciascun estratto sono stati sottoposti a quantificazione di DNA genomico umano mediante real-time PCR utilizzando il sistema Quantifiler Human DNA Quantification kit (Applied Biosystems), come da manuale d'istruzioni, e lo strumento 7300 Real Time PCR (Applied Biosystems). La possibile presenza di inibitori della reazione di PCR negli estratti di DNA analizzati è stata verificata, come da manuale d'istruzioni, mediante esame di un controllo positivo interno (IPC) fornito con il kit: il raggiungimento del ciclo-soglia da parte dell'IPC entro i 30 cicli di amplificazione indica assenza di inibitori nell'estratto di DNA.

Dieci microlitri di ciascun estratto sono stati amplificati utilizzando il kit Minifiler (Applied Biosystems), secondo le indicazioni della ditta produttrice.

La genotipizzazione degli amplificati è stata effettuata mediante elettroforesi capillare utilizzando lo strumento ABI PRISM 310 Genetic Analyzer e i programmi GeneScan versione 3.7 e Genotyper versione 3.7 (Applied Biosystems), secondo le indicazioni riportate nel manuale di istruzioni di Minifiler, con lievi modifiche: al fine di consentire una migliore lettura degli elettroferogrammi, il tempo di iniezione elettrocinetica del campione all'interno del capillare è stato portato da 5 a 15 secondi; la soglia minima per l'inclusione di un picco elettroforetico nell'analisi è stata posta a 50 unità fluorescenti relative (rfu); lo standard di peso molecolare interno utilizzato è GeneScan LIZ600 (Applied Biosystems).

Sperimentazioni

Al fine di precisare la natura del materiale presente sul vetrino precolorato di marca "Testsimplets" (campione "bu_p1"), è stata verificata la possibilità di effettuare sullo stesso colorazioni specifiche evidenziabili mediante immunofluorescenza.²⁹ A tale scopo sono stati utilizzati comuni vetrini recanti strisci di sangue secco, quali campioni di controllo, e vetrini precolorati "Testsimplets" allestiti con tre microlitri di diluizioni seriali di sangue fresco (1:10, 1:100, 1:1000) e tre microlitri di sangue secco risospeso in soluzione fisiologica. In modo da operare in condizioni il più possibile sovrapponibili a quelle del vetrino "bu_p1" (soggetto a conservazione prolungata a -20°C), i vetrini precolorati sperimentali sono stati posti per una settimana a -20°C prima dell'immunofluorescenza.

I vetrini sono stati fissati con una miscela di metanolo/acetone (50:50) mediante una tecnica "spray" e quindi lasciati asciugare a temperatura ambiente fino alla completa evaporazione del fissativo. Sono stati quindi reidratati con tampone fosfato pH 7.4 (PBS) per immersione di 2-3 minuti. Tanto gli anticorpi monoclonali murini anti-mieloperossidasi (enzima contenuto nei granuli citoplasmatici dei granulociti del sangue), anti-glicoforina A (proteina del

²⁹ Thorogate R, Moreira JC, Jickells S, Miele MM, Daniel B. *A novel fluorescence-based method in forensic science for the detection of blood in situ*. Forensic Sci Int Genet 2008;2:363-71.

citoscheletro dei globuli rossi) e anti-CD45 (recettore di membrana dei leucociti) (DAKO Italia), che l'anticorpo secondario di capra anti-immunoglobuline di topo coniugato con fluoresceina isotiocianato (DAKO Italia) sono stati diluiti 1:10 in PBS contenente albumina bovina al 3%. Dai 100 ai 200 microlitri di anticorpo monoclonale diluito sono stati distribuiti sui vetrini e lasciati incubare per 30 minuti a temperatura ambiente in camera umida. I vetrini sono stati quindi lavati per due volte in PBS per due minuti, e poi incubati con 100-200 microlitri di anticorpo secondario. Gli anticorpi sono stati lasciati incubare per 30 minuti a temperatura ambiente in camera umida. I vetrini sono stati quindi lavati per 2 volte in PBS per due minuti, montati con un mezzo di montaggio acquoso specifico per immunofluorescenza ed analizzati con microscopio a fluorescenza (Eclipse E800 Nikon).

È stata inoltre verificata la sensibilità del test immunocromatografico per la ricerca di sangue mediante sistema HemDirect su vetrini precolorati "Testsimplerts". I vetrini sono stati preparati secondo le indicazioni della ditta produttrice, depositando sul coprioggetto tre microlitri di sangue intero e di sue diluizioni seriali (1:10, 1:100, 1:1000) e facendolo quindi aderire, capovolto, al portaoggetto. Nuovamente, al fine di operare in condizioni il più possibile sovrapponibili a quelle del vetrino "bu_p1", i vetrini precolorati sperimentali sono stati posti per una settimana a -20°C. Al termine del periodo di conservazione, il coprioggetto è stato allontanato e la sua superficie interna e quella superiore del portaoggetto sono state spazzolate con un tampone imbevuto di soluzione fisiologica sterile. Il tampone è stato quindi sottoposto a test immunocromatografico con le medesime modalità sopra riportate.

RISULTATI

Ricerca di sangue umano sui pedali della bicicletta “Umberto Dei Milano”

Il giorno 22 giugno 2009, i pedali della bicicletta (Fig. 42) sono stati sottoposti ad esame con stereomicroscopio.



Figura 42 – Pedali della bicicletta “Umberto Dei Milano”. La freccia evidenzia la posizione della traccia C17.7.09

Sono state evidenziate, in tal modo, le seguenti tracce d’interesse.

Pedale destro

- Frammento tondeggiante di diametro < 1 mm (campione “C17.7.09”), posto entro preesistente circoletto tracciato con pennarello blu dal C.T. del P.M., ma privo di numerazione progressiva, localizzato sullo spigolo della parte di plastica del pedale,

nella posizione indicata in Figura 42. Un particolare del materiale è mostrato in Figura 43a;

- imbrattamento rossastro, posto entro preesistente circoletto tracciato con pennarello blu dal C.T. del P.M., ma privo di numerazione progressiva, localizzato sull'asse metallico del pedale, sul lato precedentemente contrassegnato con numero "2" ("C17.8.09") (Fig. 43b);
- imbrattamento rossastro sull'asse metallico del pedale, sul lato precedentemente contrassegnato dal C.T. del P.M. con numero "1" ("C17.9.09") (Fig. 43c); la posizione della traccia è stata precisata mediante un cerchio tracciato con pennarello rosso.

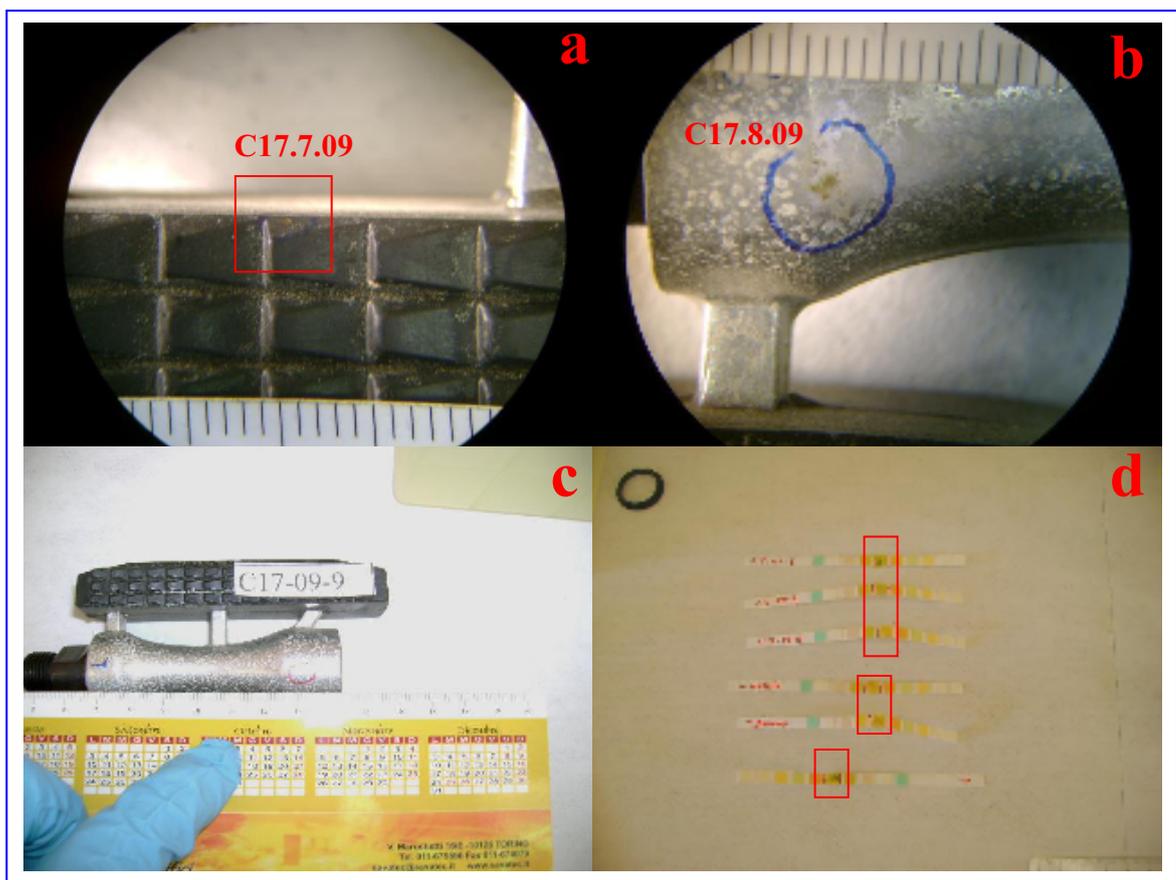


Figura 43 – a-c: posizione delle tracce evidenziate sul pedale destro; d: esito del test con tetrametilbenzidina; è ben evidente, in comparazione a un controllo costituito da sangue umano (striscia "controllo +"), il risultato positivo per il campione C17.7.09 e negativo per C17.8.09, C17.9.09 e spazzolature diffuse effettuate sulla superficie in plastica ("- gomma") e sull'intelaiatura metallica ("- metallo") del pedale (i quadrati di striscia reattiva contenenti tetrametilbenzidina sono contornati di rosso)

Pedale sinistro

- imbrattamento rossastro posto in corrispondenza di un triangolino di scotch recante la scritta a pennarello “c” (C17.10.09): trattasi evidentemente di materiale residuo relativo al campione “c” precedentemente individuato dal C.T. del P.M.;³⁰
- imbrattamento rossastro posto in corrispondenza di un triangolino di scotch recante la scritta a pennarello “b”: trattasi evidentemente di materiale residuo relativo al campione “b” precedentemente individuato dal C.T. del P.M. (C17.11.09);³⁰
- imbrattamento rossastro sull’asse metallico del pedale, sul lato precedentemente contrassegnato con numero “2” (C17.12.09) (Fig. 44a-b); la posizione della traccia è stata precisata mediante un cerchio tracciato con pennarello rosso.

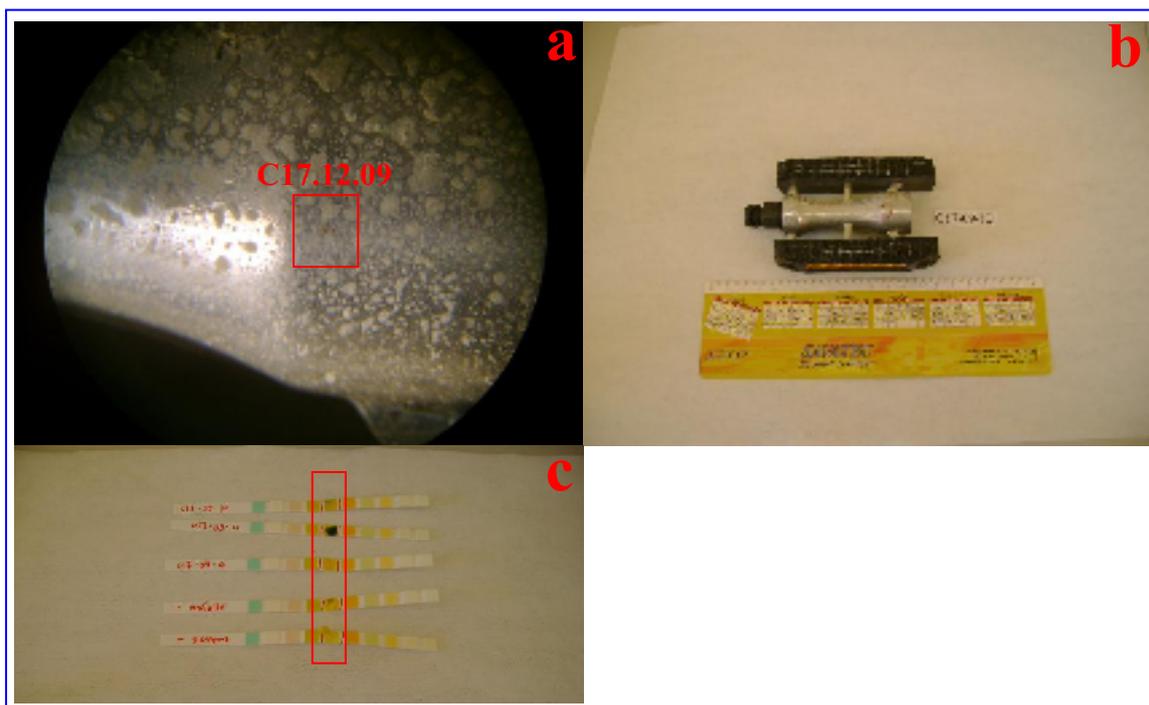


Figura 44 – a-b: posizione della traccia C17.12.09 evidenziata sul pedale destro; c: esito del test con tetrametilbenzidina; è ben evidente il risultato positivo per il campione C17.11.09 e negativo/dubbio per C17.10.09 e C17.12.09 e spazzolature diffuse effettuate sulla superficie in plastica (“- gomma”) e sull’intelaiatura metallica (“- metallo”) del pedale (i quadrati di striscia reattiva contenenti tetrametilbenzidina sono contornati di rosso)

³⁰ Si rimanda alle immagini presenti nella Relazione tecnica 3306IT2007 del R.I.S di Parma datata 15 novembre 2007.

Tutte le tracce summenzionate sono state saggiate con strisce reattive Multistix, allo scopo di effettuare test presuntivo con tetrametilbenzidina per la ricerca di sangue umano. Analogo test è stato effettuato, a mo' di controllo, picchiettando a campione con strisce reattive imbevute di soluzione fisiologica sterile:

- la superficie d'appoggio del piede della parte di plastica del pedale destro;
- la superficie dell'asse metallico del pedale destro;
- la superficie d'appoggio del piede della parte di plastica del pedale sinistro;
- la superficie dell'asse metallico del pedale sinistro.

Rapido ed evidente viraggio positivo della striscia reattiva è stato ottenuto esclusivamente per le tracce C17.7.09 e C17.11.09 (Figg. 43d e 44c).

In ragione di tale risultato, queste due tracce sono state prelevate utilizzando carta bibula imbevuta di soluzione fisiologica sterile per essere sottoposte a test immunocromatografico per la ricerca di emoglobina umana. Identico test è stato effettuato su spazzolature dell'intera superficie dei singoli pedali, ottenute mediante tamponi imbevuti di soluzione fisiologica sterile: campioni C17.13.09 (pedale destro) e C17.14.09 (pedale sinistro). Per tutti i campioni il test ha dato esito negativo.

I campioni C17.7.09, C17.11.09, C17.13.09 e C17.14.09 sono stati egualmente sottoposti ad estrazione del DNA. La successiva quantificazione di DNA genomico umano ha avuto esito negativo per C17.7.09 e C17.11.09, mentre per le tracce C17.13.09 e C17.14.09 sono state evidenziate quantità residuali, pari a una concentrazione di DNA di circa 10 picogrammi per microlitro.

La successiva amplificazione del DNA, utilizzando il sistema Minifiler, ha generato un profilo genetico esclusivamente per il campione C17.13.09 (spazzolatura superficiale del pedale destro), il cui elettroferogramma è allegato in appendice. Tale profilo presenta tutte le caratteristiche tipiche di quelli ottenuti da DNA esiguo e/o altamente degradato: mancata amplificazione dei loci con peso molecolare relativamente più elevato; potenziale *drop-out*

allelico. Si osserva inoltre presenza di alleli soprannumerari (ad es. al locus D18S51), che non consente di escludere la commistione di più DNA nel materiale prelevato. Simili caratteristiche rendono il profilo di fatto inadatto per una comparazione attendibile con quelli della vittima, dell'imputato o di altri soggetti d'interesse.

Ricerca di sangue umano sul vetrino “bu_p1”

Le prove sperimentali effettuate hanno dimostrato che una metodica altamente sensibile (sino alla singola cellula) e specifica quale la colorazione con anticorpi fluorescenti diretti contro strutture antigeniche tipiche degli eritrociti o dei leucociti non era applicabile al vetrino precolorato a disposizione. Il fatto che l'eluato della traccia, anziché strisciato su un comune vetrino e quindi seccato e poi colorato con metodi di routine, sia depositato a fresco per l'osservazione immediata (come da normale procedura con vetrini precolorati) ne impedisce la successiva fissazione sul portaoggetti. Nelle prove sperimentali eseguite, mentre da strisci di sangue d'archivio è stato infatti possibile ricavare fluorescenze di buona qualità (Fig. 45), nessun risultato è stato ottenuto a partire da vetrini precolorati di prova, anche da quelli allestiti con la massima quantità di materiale (tre microlitri di sangue intero).

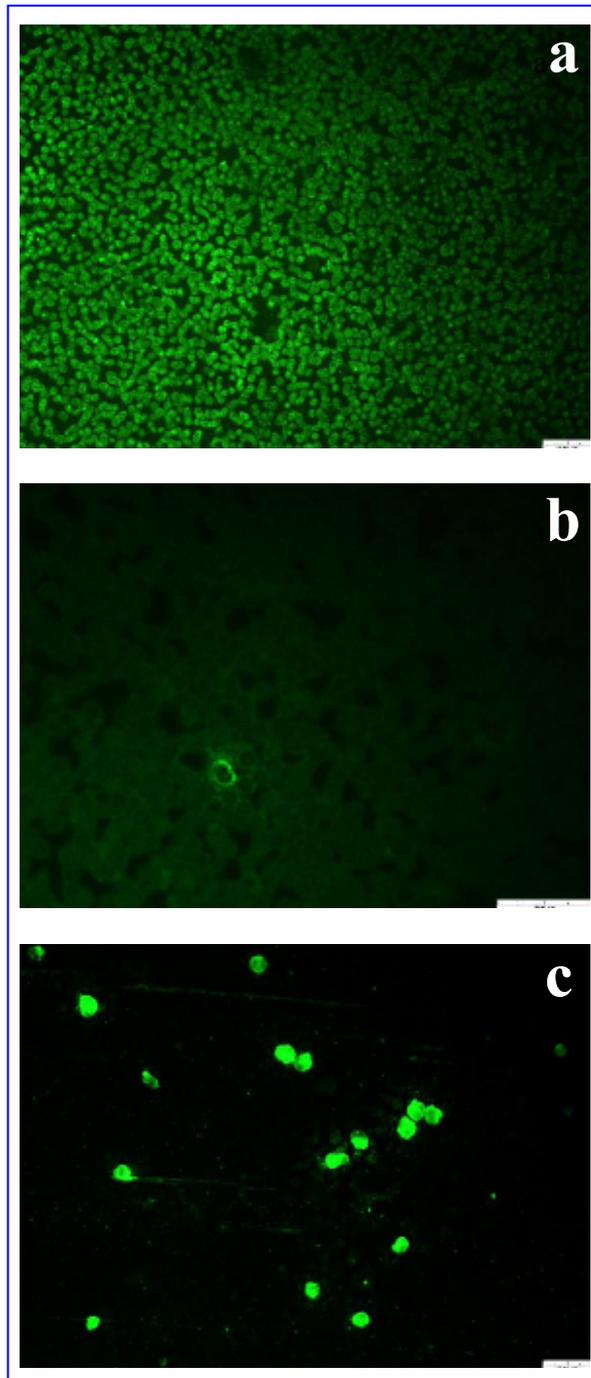


Figura 45 – a: immunofluorescenza su sangue secco con anticorpi anti-glicoforina A; b: anti-CD45; c: anti-mieloperossidasi. Il riferimento metrico in basso a destra corrisponde a 50 micron.

Per tale ragione si è deciso di sottoporre il vetrino a test immunocromatografico, il quale, pur certamente dotato di sensibilità inferiore rispetto all'immunofluorescenza, si è dimostrato in grado di evidenziare la presenza di sangue umano anche in piccole quantità (trenta nanolitri) nelle prove sperimentali condotte.

Prima di essere sottoposto al test, il vetrino “bu_p1” è stato osservato al microscopio e fotografato. Non è stato possibile rinvenire le strutture descritte dal C.T. del P.M. come un granulocita circondato da globuli rossi. Erano tuttavia ancora evidenziabili elementi morfologicamente analoghi ai suddetti (Fig. 46).

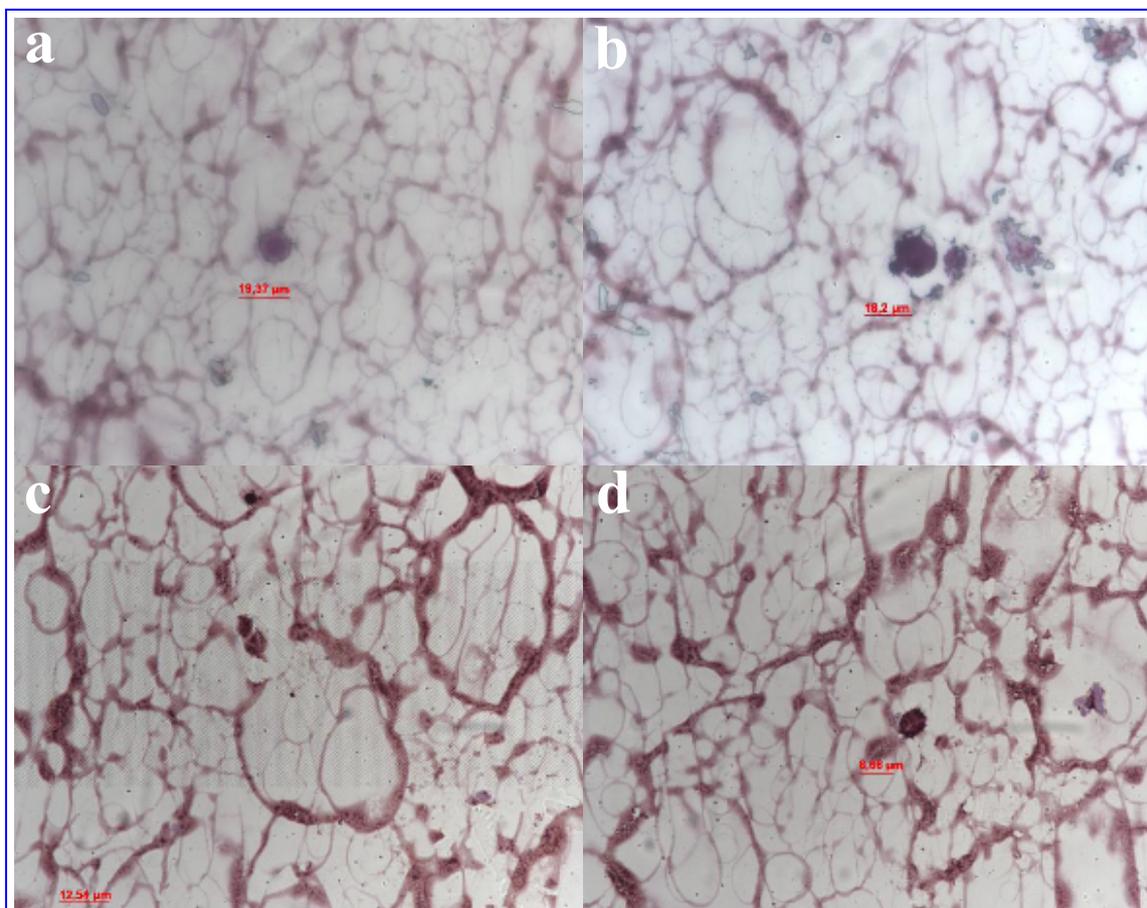


Figura 46 – Elementi con morfologia simile a quella descritta dal C.T. del P.M. individuati nel corso del riesame del vetrino “bu_p1” (a-b: ingrandimento 40X; c-d: ingrandimento 60X).

Il test immunocromatografico, condotto in conclusione sul vetrino precolorato “bu_p1”, ha dato esito negativo.

DISCUSSIONE

È evidente come i risultati ottenuti dalle nuove analisi effettuate sui reperti poco aggiungano a quanto emerso dalle indagini condotte in precedenza dal C.T. del P.M. L'esito era in parte atteso, stanti le multiple e approfondite attività svolte su detti reperti, che molto verosimilmente avevano già esaurito le minute tracce d'interesse, il notevole tempo trascorso dai fatti e la difficoltà tecnica di fare ulteriore uso del poco materiale originario individuato sui pedali e ancora disponibile (ci si riferisce in particolare al vetrino "bu_p1" recante possibili tracce di sangue).

Quanto da noi osservato può essere riassunto nel seguente modo:

- su entrambi i pedali della bicicletta era ancora presente materiale positivo a test presuntivo per sangue con tetrametilbenzidina;
- la natura ematica di tali tracce non è stata tuttavia accertata mediante test immunocromatografico specifico per emoglobina umana;
- dalle medesime tracce non è stato possibile isolare DNA genomico umano;
- quantità residuali di DNA umano, non suscettibile di attribuzione individuale e di origine imprecisata, erano presenti in un prelievo diffuso (non mirato su specifiche tracce) eseguito sul pedale destro;
- la natura ematica del materiale presente sul vetrino "bu_p1" non è stata confermata mediante test immunocromatografico specifico per emoglobina umana.

Ciò che sappiamo, sulla base delle indagini precedentemente svolte dal R.I.S., è che sui pedali della bicicletta era presente DNA di Chiara Poggi, proveniente da materiale di natura e localizzazione imprecisata. Il profilo genetico della vittima è stato infatti ottenuto a partire da una vasta campionatura effettuata contemporaneamente su entrambi i pedali, sui quali era stato precedentemente effettuato solo un test a campione con tetrametilbenzidina (con esito peraltro

negativo). Tutte le attività compiute successivamente hanno mirato a definire, *a posteriori*, la natura del materiale d'origine di detto DNA. Va subito chiarito che ciascuna di tali attività, per quanto approfondita, non è stata più suffragata dal riscontro dell'indagine genetica: né la seconda vasta campionatura dei pedali eseguita dal C.T. del P.M. (e tantomeno la terza effettuata nel corso di questa perizia), né i tentativi di isolamento di DNA mirati su tracce identificate allo stereomicroscopio dal C.T. del P.M. o successivamente hanno più generato profili genetici attribuibili alla vittima.

Apparirebbe pertanto perfino superfluo disquisire circa la specificità del Combur test (se ne riferisce già abbondantemente in premessa), o sul significato delle indagini mediante spettrometria IR o esame microscopico, condotte rispettivamente sulle microtracce “4” e “1” individuate sul pedale destro della bicicletta. Per quanto più o meno suggestivi, si tratta infatti di accertamenti condotti su materiale che non è risultato geneticamente attribuibile alla vittima e che dunque nulla ci dice, in sé, della natura dello sconosciuto materiale dal quale in precedenza era stato ottenuto il DNA di Chiara Poggi.

Si può dire, in breve, che né l'una né l'altra metodica, così come sono state utilizzate, rientrano tra quelle attualmente di più comune impiego in indagini forensi per l'identificazione della natura istologica di tracce.³¹ Tant'è che, per quanto riguarda la IR, si segnala una singola pubblicazione scientifica recente che vi faccia riferimento: De Wael et al. hanno valutato, accanto ad altre metodiche quali la miscrospettrofotometria (MSP) e la spettroscopia Raman, la spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FT-IR) mediante riflettanza totale attenuata (ATR) quale metodo per l'identificazione di microtracce di sangue.³² Gli autori riportano gli spettri ottenuti per sangue umano, canino e felino (Fig. 47), ne segnalano la pressoché assoluta sovrapponibilità, pongono in guardia in relazione alla totale assenza di specie-specificità della metodica e concludono affermando: “*No differentiation could be made between human, feline*

³¹ Virkler K, Lednev IK. *Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene*. Forensic Sci Int 2009; 188:1-17.

³² De Wael K, Lepot L, Gason F, Gilbert B. *In search of blood – Detection of minute particles using spectroscopic methods*. Forensic Sci Int 2008; 180:37-42.

and canine blood particles using MSP, Raman, or FT-IR spectroscopy. The biggest particles possibly contain enough cellular material to attempt DNA profiling which preferably should be performed after confirming the nature of the trace using a human specific blood test”.³³

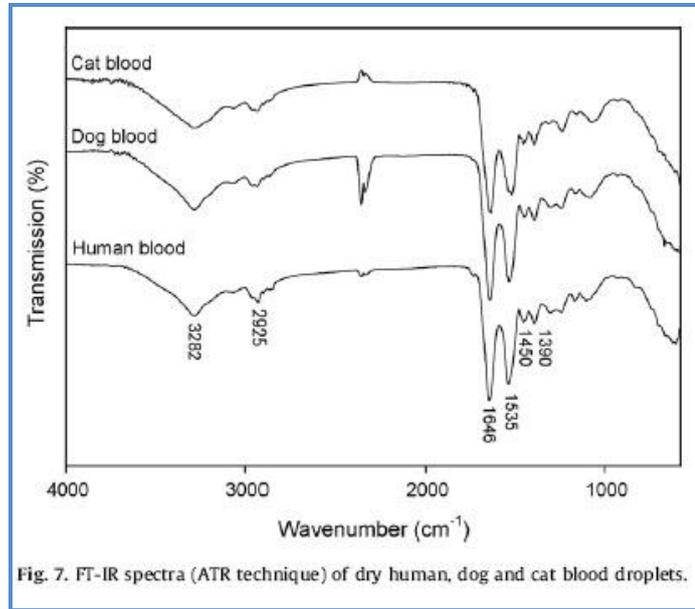


Figura 47 – Spettri FT-IR di sangue tratti da De Wael et al.

La ricerca di sangue mediante esame morfologico al microscopio è, per semplicità della strumentazione utilizzata, una tecnica di vecchia data.³⁴ Va detto, peraltro, che l’ampia disponibilità di test diagnostici chimico-enzimatici presuntivi e di test specie-specifici su base immunologica, ne faceva già negli anni ’70 una tecnica di seconda scelta; si legge nel testo citato (pag. 1011): *“La possibilità di impiegare utilmente i metodi morfologici è più teorica che pratica e nelle indagini correnti questi procedimenti hanno scarsa applicazione. ... È infatti possibile che i processi di essiccazione ed il successivo trattamento per l’allestimento dei preparati modifichino in modo apprezzabile la forma e le dimensioni degli eritrociti. D’altra parte la ricerca morfologica risulta oggi largamente superata dalle ricerche immunologiche, non solo per l’alta specificità di queste indagini, ma anche per il fatto che esse richiedono l’impiego di*

³³ Il testo riportato potrebbe essere tradotto in italiano nel seguente modo: “Nessuna distinzione era possibile tra particelle di sangue umano, felino o canino impiegando MSP, Raman o spettroscopia FT-IR. Le particelle più grandi potenzialmente contengono materiale cellulare sufficiente per tentare la tipizzazione del DNA, che dovrebbe essere svolta preferibilmente dopo aver confermato la natura della traccia con un test specifico per sangue umano”.

³⁴ Chiodi V, Gilli R, Puccini C, Portigliatti-Barbos M, Fallani M, De Bernardi A. *Manuale di Medicina Legale*. 1976 Casa Editrice Dr. Francesco Vallardi; vol. 2: 995-1020.

piccolissime quantità di materiale...”. Le microscopiche tracce di sangue secco appaiono al microscopio in genere come lamine, talora solcate da fessure, nelle quali – a più alto ingrandimento – è possibile evidenziare conglomerati di natura cellulare (Fig. 48). L’aspetto è ovviamente molto diverso da quello del sangue esaminato a fresco, nel quale, nell’ambito di un tappeto di globuli rossi, è possibile individuare singoli esemplari dei diversi tipi di leucociti presenti nel sangue (Fig. 49).

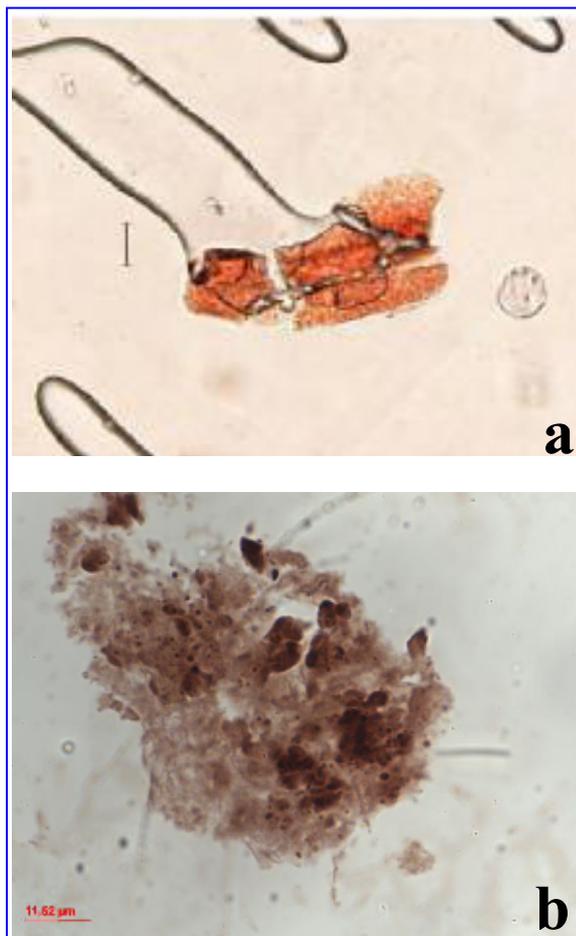


Figura 48 – a: immagine di microtracce di sangue osservata al microscopio ottico (400x, la barra verticale indica una lunghezza di 25 micron) tratta da De Wael et al.; b: particolare di traccia di sangue secco risospesa in 3 microlitri d’acqua e colorata con vetrino Testsimplets (100x).

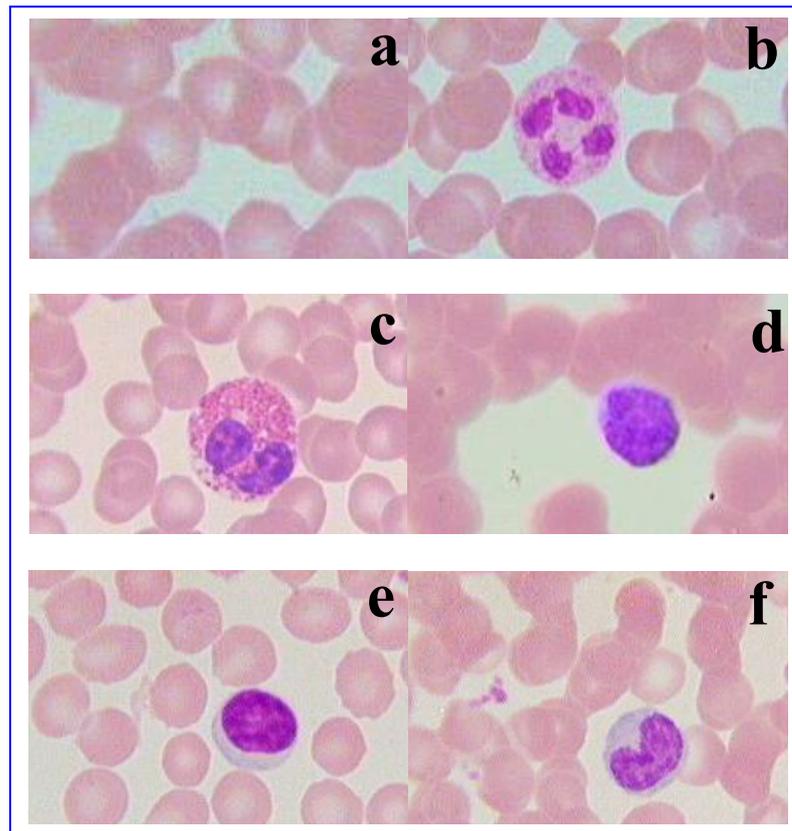


Figura 49 – Gli elementi figurati del sangue (colorazione Giemsa) – a: globuli rossi; b: granulocita neutrofilo; c: granulocita eosinofilo; d: granulocita basofilo; e: linfocita; f: monocita

L'insieme di elementi individuati dal C.T. del P.M. sul vetrino "bu_p1" appare dunque scarsamente compatibile con sangue essiccato: il riscontro di singoli granulociti con struttura ben conservata sarebbe infatti più tipico del sangue fresco. La morfologia del singolo presunto granulocita descritta dal C.T. del P.M. appare ben difficilmente valutabile, in confronto a quella di reali leucociti fotografati su vetrini "Testsimplets" preparati con sangue fresco (Fig. 50).

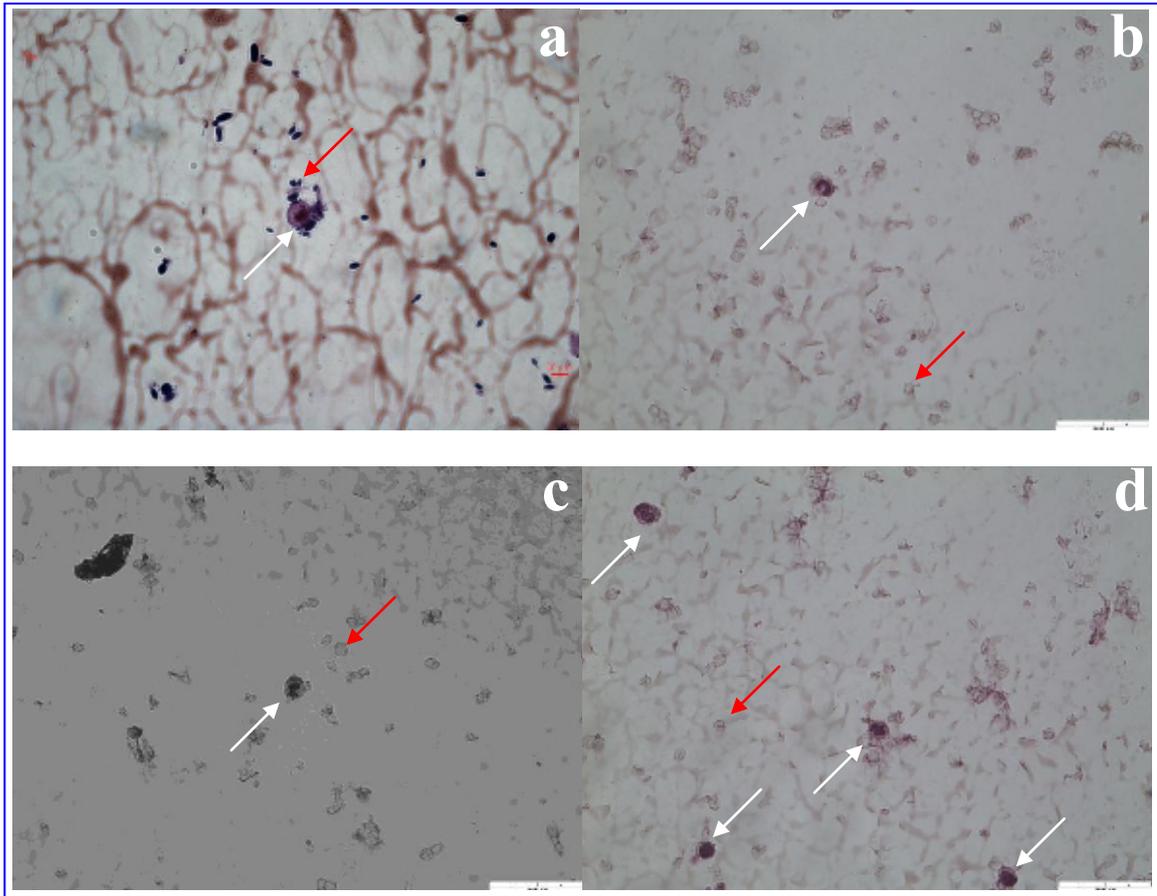


Figura 50 – a: immagine del presunto granulocita (freccia bianca) circondato da presunti globuli rossi (freccia rossa) evidenziati dal C.T. del P.M. sul vetrino precolorato “bu_p1”; b-d: varie tipologie di leucociti (indicati mediante frecce bianche) su un tappeto di globuli rossi (frece rosse), come appaiono deponendo sangue fresco su vetrino precolorato “Testsimplets”.

Ciò che invece salta immediatamente all’occhio è la scarsa somiglianza tra quelli che il C.T. del P.M. definisce globuli rossi e reali globuli rossi. Nei vetrini precolorati Testsimplets, i globuli rossi appaiono infatti rigonfi, con diametro di circa 6-8 micron, tenuemente colorati di rosa-giallastro. Gli elementi indicati dal C.T. del P.M. sono invece di dimensioni variabili, in alcuni casi superiori ai 10 micron, di colore scuro, e presentano talora tipiche gemmazioni che al naturalista appassionato (o anche all’anatomopatologo esperto) suggeriscono immediatamente la possibile natura di lieviti (funghi diffusissimi nell’ambiente). A titolo di esempio, si riporta un’immagine microscopica di *Saccharomyces cerevisiae*, il comune lievito di birra (Fig. 51).

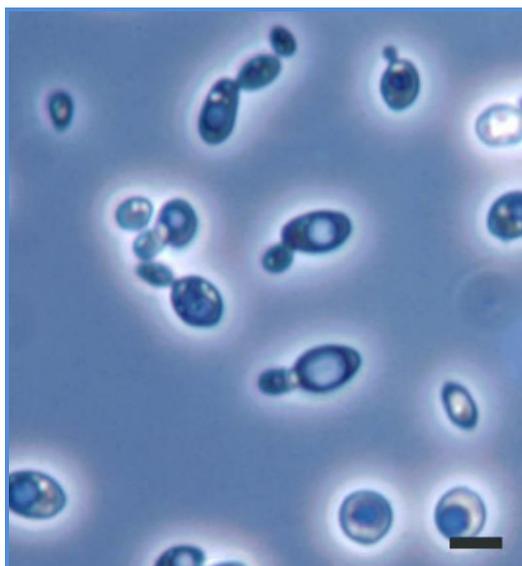


Figura 51 – Immagine microscopica di *Saccharomyces cerevisiae* (la barra di riferimento in basso a destra corrisponde a 5 micron); si notino le tipiche gemmazioni.

A conclusione della discussione riguardo alle microtracce “1” e “4”, preme sottolineare che la loro posizione (superficie laterale esterna dell’asse metallico del pedale per la “1”; superficie della parte di plastica del pedale rivolta verso l’asse metallico, anziché verso l’esterno, per la “4”) mal si sposano con l’ipotesi di una deposizione per contatto con suole imbrattate di sangue. In questo caso, infatti, si sarebbe atteso piuttosto di osservare il sangue sulla superficie d’appoggio dei pedali.

In definitiva, quindi, della traccia sui pedali che ha generato il profilo genetico della vittima non è stato possibile determinare la natura. Sappiamo tuttavia quanto DNA è stato isolato da tale traccia, circa 2,8 nanogrammi per microlitro d’estratto. Poiché il C.T. del P.M. ci dice che il volume di eluizione finale dell’estratto era di circa 40 microlitri, abbiamo in totale $2,8 \times 40 = 112$ nanogrammi di DNA. Poiché il contenuto in DNA del nucleo di una singola cellula è circa 0,006 nanogrammi, la traccia prelevata avrebbe dovuto contenere circa 18.000-19.000 cellule. Si tenga conto che, nel sangue, le sole cellule contenenti DNA genomico sono i leucociti (i globuli rossi sono infatti privi di nucleo) e che essi sono presenti – in un adulto di sesso femminile sano – con una concentrazione oscillante tra i 4500 e gli 11000 elementi cellulari per microlitro. Ne

deriva che sui pedali, se la traccia-fonte del DNA della vittima fosse stata costituita esclusivamente da sangue, si sarebbero dovuti avere dagli 1,5 ai 4 microlitri circa di sangue. È ragionevole pensare che il materiale biologico fosse costituito da una o poche tracce isolate e concentrate; se si fosse trattato di traccia più diffusa, infatti, sarebbe stato lecito attendersi un successo – almeno parziale – dell'estrazione di DNA effettuata sulla seconda campionatura a tutta superficie compiuta sui pedali. Gli aspetti assunti da una traccia di sangue del volume di 1,5 in diverse condizioni (fresca/secca, goccia/striscio) sono mostrati in Figura 52.



Figura 52 – a: goccia ottenuta depositando 1,5 microlitri di sangue fresco; b: imbrattamento ottenuto strisciando 1,5 microlitri di sangue fresco; c: goccia ottenuta depositando 1,5 microlitri di sangue fresco, dopo essiccamento; d: imbrattamento ottenuto strisciando 1,5 microlitri di sangue fresco, dopo essiccamento.

Si tratta, come è evidente, di depositi apprezzabili anche ad occhio nudo (compatibilmente con la natura del substrato su cui la traccia è posizionata: nelle immagini mostrate si è voluto far uso a scopo esemplificativo di pedali di bicicletta, senza alcuna intenzione di riprodurre quanto potenzialmente verificatosi sui pedali oggetto di perizia). Si

segnala a questo proposito che la quantità potenziale di sangue calcolata rientra abbondantemente entro la soglia di sensibilità del test immunocromatografico, che avrebbe dunque permesso – almeno in teoria – di dimostrare la natura ematica umana della traccia.

Tutto ciò lascia pensare – almeno in linea ipotetica – che la fonte del DNA di Chiara Poggi potesse essere più verosimilmente costituita da tessuto diverso dal sangue³⁵ con concentrazione di cellule nucleate pari a quella del sangue stesso (ma per sua natura non ben visibile a occhio nudo) o superiore (e in questo caso invisibile a causa delle sue dimensioni microscopiche). Dunque, non certamente sparse cellule epiteliali distaccatesi dall'epidermide e depositatesi per traspirazione o manipolazione. Piuttosto, tessuti molli (di qualunque possibile natura: da un frammento d'encefalo, sino al più banale e innocente muco nasale) così fittamente stipati di elementi nucleati da poter fornire la quantità di DNA isolato dal campione “bu_p1_tot”, anche partendo da minuscole quantità di materiale (un milligrammo o meno, a seconda del tipo istologico), pressoché invisibili ad occhio nudo.

Né si può escludere la presenza sui pedali di saliva della vittima (la saliva possiede una concentrazione di cellule nucleate quasi sovrapponibile a quella del sangue, ma a differenza di esso è priva di colore, che è conferito al sangue dall'altissimo contenuto d'emoglobina). Non rileva, a questo proposito, che la presenza di saliva sui pedali sia stata esclusa dal C.T. del P.M. sulla base di un test colorimetrico per la ricerca di amilasi, un enzima presente in concentrazione particolarmente elevata nella saliva. Fatti salvi tutti i ragionamenti riguardanti la sensibilità di questa metodica – in particolare quando la si voglia trasferire da un contesto clinico controllato alle condizioni, per definizione sconosciute, di un'indagine forense – si può notare infatti che detto test fu effettuato successivamente al primo prelievo diffuso sui pedali, l'unico dal quale è stato ottenuto DNA di Chiara Poggi e che ha con ogni probabilità asportato in maniera completa il materiale biologico appartenente alla vittima.

³⁵ Piccole quantità di sangue sono poi ovviamente presenti in pressoché tutti i tessuti biologici.

Occorre infine ribadire come le indagini forensi, in special modo quando si addentrano nella ricerca di microtracce biologiche, debbano fare i conti con quella che è – allo stato attuale – la nostra ignoranza riguardo al grado di dispersione di DNA umano in ambienti e su oggetti esposti alle attività umane. A fronte di metodiche che consentono la precisa identificazione di depositi costituiti anche da pochissime cellule, ci si scontra spesso, infatti, con esiti inaspettati o difficilmente comprensibili. Si citano in proposito due risultati emersi proprio in questa indagine: il riscontro di DNA di Alberto Stasi in quantità non trascurabile sulla superficie delle soles delle sue stesse scarpe; la persistenza del DNA del padre di Chiara Poggi sulla maniglia del bagno di casa, maniglia che – come appare ragionevole pensare – nel periodo d’assenza dell’uomo deve essere stata toccata da altri frequentatori dell’abitazione, i quali non hanno tuttavia depositato il proprio profilo genetico.

In conclusione, non è possibile precisare la natura del materiale biologico di Chiara Poggi presente sui pedali della bicicletta di marca “Umberto Dei Milano”. Esso potrebbe essere costituito da qualunque tipo di tessuto riccamente cellulato. Stante la capacità di persistenza del DNA in tracce secche disperse nell’ambiente, non è possibile stabilire in alcun modo – che sia scientificamente fondato e non meramente congetturale – i tempi e le modalità di deposizione di detto materiale biologico sconosciuto sui pedali.

Si riportano di seguito alcune considerazioni in merito alle valutazioni esposte nella breve relazione inviata dal c.t. Cap. Marino il giorno 19 agosto 2009 (allegata alla presente perizia).

Non siamo d'accordo sul fatto che sarebbe stato inutile, dispersivo e fuorviante eseguire il test immunocromatografico specifico per l'emoglobina umana sui pedali della bicicletta.

La quantità di DNA isolato dai pedali corrisponde a quella contenuta in un volume di sangue di almeno 1,5 microlitri, dunque circa mille volte superiore alla soglia di sensibilità della metodica (in grado di individuare sangue umano a partire da quantità dell'ordine del nanolitro, vale a dire un millesimo di microlitro). È evidente come il C.T. del P.M. non potesse conoscere *a priori* la quantità di eventuale sangue presente sui pedali, ma sta di fatto che se il test fosse stato effettuato e avesse dato esito positivo (come si sarebbe atteso in presenza di detta quantità di sangue), avrebbe confermato senza ombra di dubbio la natura ematica umana del materiale, che, viceversa, in base alle attività esperite non è affatto dimostrabile. Tanto più che la traccia "1" e la traccia "4", quelle sulle quali sono state compiute altre attività (allestimento di vetrino precolorato, spettrometria IR), apparivano di dimensioni tali (circa 1 millimetro di diametro) da consentire una sicura identificazione mediante test immunocromatografico, in caso di reale natura ematica. E ciò senza distruzione della traccia, in quanto l'aliquota residua di risospensione della macchia, non utilizzata per l'immunocromatografia, può essere tranquillamente avviata all'estrazione di DNA.

L'osservazione avanzata dal C.T. del P.M. riguardo al fatto che il test immunologico non sarebbe efficace in tracce forensi, a causa dell'alterazione della struttura tridimensionale dell'emoglobina, è smentita dalla letteratura scientifica e dall'esperienza. Nello studio di Hochmeister et al. citato è illustrato come la reazione antigene-anticorpo alla base del test immunologico per la ricerca di emoglobina risulti efficace anche in presenza di materiale

degradato (“...*hemoglobin appears to persist in samples exposed to extreme conditions...*”): macchie di sangue, sia esposte all’aria che avvolte in plastica, conservate all’aperto nel periodo estivo ed esposte all’azione di sole e pioggia; macchie di sangue immerse nell’acqua o sotterrate; muscolo putrefatto. Per quanto ciò possa avere valore, si segnala inoltre, a seguito del pluriennale utilizzo di tale test in indagini forensi, più di un caso in cui tracce positive all’esame immunocromatografico (e dunque contenenti emoglobina ben conservata) non hanno paradossalmente poi generato profili genetici, a causa di estrema degradazione del DNA in esse contenute.

Va infine ribadito che è assolutamente indispensabile precisare, accanto ai risultati ottenuti con qualsivoglia metodica analitica, il margine di incertezza (sensibilità, specificità, discrezionalità interpretativa dell’operatore) che li caratterizza. Nel caso del test alla tetrametilbenzidina sui pedali della bicicletta, detto margine è assai ampio, sicché non condividiamo l’opinione secondo la quale il materiale presente su quei pedali debba essere ricondotto con alta probabilità a sangue di Chiara Poggi.

PARTE QUARTA

QUESITO B4 – TRACCE SUL

PORTASAPONE

MATERIALI E METODI

Dati documentali

Si riportano in modo sintetico le attività di indagine effettuate sul portasapone liquido rinvenuto nel bagno dell'abitazione di Chiara Poggi, come da Relazione tecnica 3306IT2007 del R.I.S di Parma datata 15 novembre 2007 (accertamenti biologici) e 16 novembre 2007 (accertamenti dattiloscopici).

Sull'oggetto si è evidenziata, dopo esaltazione con cianoacrilato, una impronta digitale attribuibile ad Alberto Stasi. Successivamente all'esame dattiloscopico, il reperto è stato ispezionato allo stereomicroscopio. Microtracce di dubbia natura così evidenziate (e non meglio descritte) sono state sottoposte a Combur test con esito negativo. Sono stati fatti due prelievi per l'estrazione di DNA: uno in corrispondenza dell'area dove era stata evidenziata l'impronta di Stasi (campione "ds_i") e una sulla restante superficie del portasapone ("ds_tot"). Il campione "ds_i" ha dato alla quantificazione una concentrazione "limite" di DNA totale. La successiva amplificazione con Minifiler non ha generato profili genetici interpretabili. Anche il campione "ds_tot" ha dato alla quantificazione una concentrazione "limite" di DNA totale (nella integrazione alla Relazione Tecnica a firma del c.t. del P.M. Cap. Marino datata 5 marzo 2009 è precisato che la concentrazione di DNA umano totale estratto da questo campione è pari a 27 picogrammi per microlitro); non è stata viceversa riscontrata nell'estratto la presenza di DNA genomico maschile. L'amplificazione con Minifiler ha generato un profilo "complesso", compatibile con la vittima. Gli elettroferogrammi e le aree dei picchi allelici relativi a detto profilo sono riportati nella integrazione alla Relazione tecnica a firma del c.t. del P.M. Cap. Marino datata 5 marzo 2009.

Il giorno 2 luglio 2009, il Mar. Sergio Festa, in servizio presso "RONINV" Carabinieri di Torino ci ha recapitato la provetta contenente il residuo dell'estratto di DNA del campione

“ds_tot”, a sua volta consegnatagli – il giorno precedente – dal Cap. Marino presso il R.I.S. di Parma.

Ricerca di emoglobina e DNA umani sul portasapone

Il test con tetrametilbenzidina è stato effettuato utilizzando strisce reattive Multistix 10SG (Bayer-Siemens).³⁶ L'area reattiva contenente tetrametilbenzidina è stata imbevuta con soluzione fisiologica sterile e quindi accostata alla traccia di interesse: è stata quindi valutata la comparsa, tanto sull'area reattiva che sul substrato sul quale era localizzata la traccia, di viraggio colorato blu/verde entro i due minuti. I risultati sono riportati in forma qualitativa secondo i gradi di giudizio: positivo (rapida e vivace comparsa di colorazione blu/verde); dubbio (comparsa di colorazione verdastra non immediata ma pur sempre entro due minuti); negativa (assenza di viraggio colorato o colorazione bruno-nerastra dell'area reattiva palesemente attribuibile all'asportazione di sporcizia dalla superficie campionata).

Il test immunocromatografico per la ricerca di emoglobina umana è stato effettuato utilizzando il sistema HemDirect (Seratec). La superficie di interesse è stata spazzolata con un tampone imbevuto di soluzione fisiologica sterile, la cui estremità in cotone è stata quindi risospesa in 200 microlitri del buffer di estrazione fornito con il kit e posta su agitatore orizzontale per 2 ore a temperatura ambiente. Il materiale è stato quindi centrifugato. Uno-due microlitri di surnatante sono stati depositati su una cartina di tornasole al fine di verificare che il pH della soluzione fosse vicino alla neutralità. Cento microlitri di soluzione sono stati quindi caricati sulla piastra immunocromatografica. La lettura del risultato è stata effettuata a 10 minuti dalla deposizione del campione. I risultati sono stati riportati in forma qualitativa secondo il grado di giudizio: positivo (comparsa di una banda rossa nella regione test, in presenza di banda

³⁶ Le strisce Multistix 10SG risultano in tutto e per tutto analoghe a “Hemastix” se non per la presenza di aree reattive addizionali per altre sostanze: nitriti, glucosio, etc

rossa nella regione controllo); negativo (assenza di banda rossa nella regione test, in presenza di banda rossa nella regione controllo).

L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire dall'aliquota residua di liquido di risospensione per test immunocromatografico utilizzando il kit QIAamp DNA Micro (QIAGEN), secondo le indicazioni della ditta produttrice. L'eluizione finale del DNA è stata effettuata in un volume di 50 microlitri.

Due microlitri di ciascun estratto sono stati sottoposti a quantificazione di DNA genomico umano mediante real-time PCR utilizzando il sistema Quantifiler Human DNA Quantification kit (Applied Biosystems), come da manuale d'istruzioni, e lo strumento 7300 Real Time PCR (Applied Biosystems). La possibile presenza di inibitori della reazione di PCR negli estratti di DNA analizzati è stata verificata, come da manuale d'istruzioni, mediante esame di un controllo positivo interno (IPC) fornito con il kit: il raggiungimento del ciclo-soglia da parte dell'IPC entro i 30 cicli di amplificazione indica assenza di inibitori nell'estratto di DNA.

Dieci microlitri di ciascun estratto sono stati amplificati utilizzando il kit Minifiler (Applied Biosystems), secondo le indicazioni della ditta produttrice.

La genotipizzazione degli amplificati è stata effettuata mediante elettroforesi capillare utilizzando lo strumento ABI PRISM 310 Genetic Analyzer e i programmi GeneScan versione 3.7 e Genotyper versione 3.7 (Applied Biosystems), secondo le indicazioni riportate nel manuale di istruzioni di Minifiler, con lievi modifiche: al fine di consentire una migliore lettura degli elettroferogrammi, il tempo di iniezione elettrocinetica del campione all'interno del capillare è stato portato da 5 a 15 secondi; la soglia minima per l'inclusione di un picco elettroforetico nell'analisi è stata posta a 50 unità fluorescenti relative (rfu); lo standard di peso molecolare interno utilizzato è GeneScan LIZ600 (Applied Biosystems).

Studio di riproducibilità dei risultati delle indagini biomolecolari sull'estratto di DNA "ds_tot"

Quanto residuava dell'estratto "ds_tot"(circa 50 microlitri) è stato impiegato nella seguente maniera:

- due aliquote di due microlitri ciascuna sono state utilizzate per la quantificazione in doppio di DNA genomico umano maschile mediante real-time PCR, impiegando il sistema Quantifiler Y Human Male DNA Quantification kit (Applied Biosystems), come da manuale d'istruzioni, e lo strumento 7300 Real Time PCR (Applied Biosystems);
- due aliquote di 10 microlitri ciascuna sono state utilizzate per amplificazione in doppio con il kit Minifiler (Applied Biosystems), secondo le indicazioni della ditta produttrice;
- due aliquote di 10 microlitri ciascuna sono state utilizzate per amplificazione in doppio di polimorfismi siti sul cromosoma Y (e dunque specifici del sesso maschile), impiegando il kit Yfiler (Applied Biosystems), secondo le indicazioni della ditta produttrice;
- gli amplificati ottenuti con Minifiler e Yfiler sono stati sottoposti a genotipizzazione mediante elettroforesi capillare, utilizzando lo strumento ABI PRISM 310 Genetic Analyzer e i programmi GeneScan versione 3.7 e Genotyper versione 3.7 (Applied Biosystems), secondo le indicazioni della ditta produttrice, con lievi modificazioni: la soglia minima per l'inclusione di un picco elettroforetico nell'analisi è stata posta a 100 unità fluorescenti relative (rfu); lo standard di peso molecolare interno utilizzato è GeneScan LIZ600 (Applied Biosystems).

RISULTATI

Ricerca di sangue umano sul portasapone

Il giorno 22 giugno 2009, il portasapone e il relativo tappo erogatore (che risultava repertato in busta a parte), ritratti in Figura 53, sono stati sottoposti ad esame con stereomicroscopio, senza che fosse possibile evidenziare residuali tracce di potenziale interesse.



Figura 53 – Il portasapone e il tappo dell’erogatore; sono indicate le aree dei prelievi: in particolare, la zona nella quale era stata evidenziata l’impronta digitale di Alberto Stasi (prelievo C17.15.09) è stata contornata con pennarello rosso

Dagli oggetti sono stati pertanto effettuati tre prelievi, mediante tampone imbevuto di soluzione fisiologica sterile:

- superficie del portasapone in corrispondenza dell’area sulla quale era stata evidenziata impronta digitale attribuibile allo Stasi, come identificata da allegato fotografico alla Relazione tecnica finale biologica-dattiloscopica del RIS (campione C17.15.09);

- restante superficie del portasapone (campione C17.16.09);
- superficie convessa del tappo dell'erogatore (campione C17.17.09).

Il test immunocromatografico per la ricerca di emoglobina umana ha dato esito negativo per tutti e tre i campioni.

Negativa è risultata anche la quantificazione di DNA genomico umano nei tre estratti ottenuti dai prelievi. Tali estratti, egualmente amplificati, non hanno prodotto profili genetici interpretabili.

Studio di riproducibilità dei risultati delle indagini biomolecolari sull'estratto di DNA "ds_tot"

La quantificazione di DNA genomico maschile ha avuto esito negativo per entrambe le aliquote di estratto residuo "ds_tot" saggiate. Il campione è stato egualmente amplificato in doppio per polimorfismi del cromosoma Y, senza ottenere profili interpretabili.

L'amplificazione in doppio di aliquote residue di estratto "ds_tot" per il pannello di polimorfismi incluso nel sistema "Minifiler", precedentemente utilizzato dal C.T. del P.M., ha prodotto profili genetici i cui elettroferogrammi si allegano in appendice (indicati come: C17.ds_tot-bis.09 e C17.ds_tot-tris.09, rispettivamente). Il genotipo-consenso³⁷ ottenuto per il campione "ds_tot" è riportato nella seguente tabella.

³⁷ Per la determinazione del genotipo sono stati considerati esclusivamente i picchi allelici presenti in entrambi i replicati di PCR con altezza ≥ 100 rfu; sono stati inoltre esclusi dal genotipo i picchi verosimilmente riferibili ad artefatti ("stutter") la cui altezza era inferiore alla percentuale massima di *stutter* registrata per ciascun locus in base al manuale di istruzioni allegato al sistema di amplificazione Minifiler.

Locus	“ds_tot”
D13S317	8-11-12
D7S820	9-10-11
Amelogenina	X-Y
D2S1338	20-23
D21S11	27-28-29-30-31.2
D16S539	10-11-12
D18S51	12-13
CSF1PO	10-11
FGA	21-22-24

DISCUSSIONE

Per ciò che riguarda l'attribuzione alla vittima del DNA (campione "ds_tot") isolato dalla superficie del portasapone (nella parte non interessata dall'impronta di Alberto Stasi), in assenza (come prevedibile) di ulteriori risultati dai nuovi prelievi effettuati dal reparto, si è provveduto essenzialmente a verificare la riproducibilità del profilo genetico ottenuto dal C.T. del P.M. utilizzando condizioni analitiche in tutto sovrapponibili a quelle precedentemente impiegate. Ciò si è reso necessario in quanto è noto come, in presenza di quantità esigue di DNA di partenza – quale era il caso del campione "ds_tot", contenente poche decine di picogrammi di DNA per microlitro – la reazione di PCR possa generare alcuni artefatti.³⁸ Parte di essi sono dovuti ad amplificazione preferenziale casuale di uno dei due alleli in un genotipo nei primi cicli della reazione; il risultato finale è che corredi allelici di tipo eterozigote possono apparire fortemente sbilanciati, sino alla totale perdita di uno dei due alleli. Altri artefatti sono attribuibili ad amplificazione episodica di minime quantità di DNA esogeno (già presente all'origine sul reparto, oppure introdotto per successiva manipolazione o trattamento in laboratorio), normalmente trascurabili quando il DNA-bersaglio è disponibile in concentrazione tale da poter mascherare il "rumore di fondo" prodotto da contaminanti. La riproduzione dei risultati di PCR garantisce, da un lato, di identificare gli sbilanciamenti genotipici e le perdite alleliche: infatti, trattandosi di fenomeni a carattere casuale, è relativamente poco probabile che essi interessino sempre il medesimo allele in repliche successive dell'esperimento. Allo stesso modo, picchi allelici spuri, frutto di contaminazioni episodiche, possono essere riconosciuti ed esclusi dall'analisi, proprio in ragione della loro non riproducibilità.

Un sommario esame degli elettroferogrammi allegati consente di osservare come i risultati precedentemente ottenuti dal C.T. del P.M. siano stati sostanzialmente riprodotti. È

³⁸ Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. *An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA*. Forensic Sci Int 2000;112:17-40.

innanzitutto possibile notare che il profilo genetico del campione “ds_tot” è indubbiamente misto, ossia frutto della copresenza di DNA di più individui: in numerosi loci esaminati, infatti, gli alleli presenti sono più di due, e due è il numero massimo consentito per il corredo genotipico di un normale soggetto diploide (dotato nel proprio nucleo cellulare di due copie dell’informazione genetica).³⁹ È evidente inoltre come il locus dell’amelogenina⁴⁰ presenti, tanto nel profilo originale che nelle repliche, un picco Y-specifico. All’apparenza, quindi, uno dei contributori alla traccia potrebbe essere un soggetto di sesso maschile. Con questa osservazione contrastava, invero, il risultato negativo della quantificazione di DNA maschile nel campione “ds_tot”. Tale negatività è stata riprodotta nei nostri esperimenti e confermata dall’assenza di prodotti di PCR specifici dopo amplificazione del residuo di estratto “ds_tot” per marcatori del cromosoma Y, in grado di evidenziare in maniera chiara un profilo genetico maschile anche in presenza di DNA femminile sovrabbondante.

Poiché il riscontro del picco Y-specifico dell’amelogenina è costante e riprodotto negli esperimenti svolti in due laboratori distinti, la spiegazione più ragionevole del fenomeno è che il materiale biologico presente sul portasapone comprendesse una componente maschile il cui DNA, tuttavia, si trovava in una condizione di degradazione tale da non poter generare prodotti d’amplificazione, se non per il marcatore a più ridotto peso molecolare. La degradazione ambientale del DNA, ad opera di nucleasi endogene o di origine microbica, si verifica infatti mediante progressiva frammentazione degli acidi nucleici. Marcatori che si estendono complessivamente per un numero minore di basi (le unità costitutive del DNA) hanno dunque maggiore probabilità di preservare, almeno in alcune copie, la propria integrità, rispetto ad altri più lunghi. Nel sistema Minifiler l’amelogenina è appunto il marcatore le cui varianti alleliche

³⁹ Clayton TM, Whitaker JP, Sparkes R, Gill P. *Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling*. Forensic Sci Int 1998;91:55-70.

⁴⁰ L’amelogenina è un marcatore presente su entrambi i cromosomi sessuali X e Y, ma in forme di lunghezza lievemente differente, e che dunque consente di distinguere tra DNA femminile, caratterizzato da due cromosomi X e dunque un solo prodotto di amplificazione, e DNA maschile con assetto cromosomico XY e perciò capace di generare due prodotti di amplificazione ben distinguibili.

hanno dimensioni in assoluto inferiori, e la cui amplificazione e genotipizzazione è dunque possibile anche in condizioni di abbondante degradazione. A chi appartenga questo DNA maschile non è dato sapere, stante l'impossibilità di ottenere da esso profili genetici più articolati. Qualunque soggetto di sesso maschile è un potenziale contributore: dall'imputato, che certamente aveva manipolato il portasapone, a un membro della famiglia Poggi o frequentatore della casa, che ragionevolmente hanno fatto uso dell'oggetto, a un oscuro contaminatore intervenuto successivamente in corso di sopralluogo, indagini di laboratorio, ecc.

Sono evidenziabili marginali differenze tra i profili genetici estrapolati dall'elettroferogramma ottenuto dal C.T. del P.M. e da quelli ottenuti in questa perizia. Tali discrepanze possono spiegarsi con i diversi criteri analitici impiegati: scelta della soglia minima di intensità di un picco per la sua inclusione nelle analisi; trattamento dei potenziali picchi *stutter*; indisponibilità da parte del C.T. del P.M. di almeno una replica del risultato, così da poter prendere in considerazione eventuali fenomeni artefattuali. Ciò che è evidente è che i picchi allelici principali evidenziati coincidono costantemente con quelli di Chiara Poggi. Non si può pertanto escludere che la vittima abbia contribuito con il proprio DNA alla traccia e anzi, l'abbia fatto in maniera preponderante. Qualora si voglia associare a questa ipotesi un grado di probabilità, è possibile ricorrere – così come già fatto dal C.T. del P.M. – a indici statistici *ad hoc*.⁴¹ Al calcolo del rapporto di verosimiglianza (*likelihood ratio*, LR), che costituisce di norma il metodo d'elezione per l'interpretazione di tracce miste semplici, è tuttavia forse preferibile in questo caso la più conservativa probabilità d'esclusione. Quest'ultimo indice, infatti, non richiede la formulazione *a priori* di ipotesi riguardo al numero di contributori alla traccia, valutazione che nel caso in specie potrebbe risultare complessa, in ragione di genotipi con anche cinque alleli (D21S11) indicativi della presenza di un numero di DNA commisti superiore a due.

⁴¹ Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Schneider PM, Weir BS. *DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures*. Forensic Sci Int 2006;160:90-101.

La probabilità d'esclusione⁴², calcolata sulla base del profilo genetico-consenso da noi estrapolato e delle frequenze alleliche dei marcatori esaminati nella popolazione italiana⁴³, è pari a 0.999979 (il 99,9979% dei soggetti assunti a caso dalla popolazione possono essere esclusi come contributori alla traccia), sostanzialmente sovrapponibile a quella ottenuta dal C.T. del P.M. (99,99985%). Vi sono dunque scarsi dubbi riguardo al fatto che il DNA prevalente nel campione "ds_tot" appartenga a Chiara Poggi.

Quanto al contributore / ai contributori minoritario/i, è interessante notare come, includendo nel profilo genetico estrapolato i picchi allelici che compaiono perlomeno in duplicato nei tre diversi elettroferogrammi ottenuti (quello del C.T. del P.M. e i due replicati prodotti in questa perizia) e riducendo lievemente la soglia minima in rfu (> 50) per l'inclusione dei picchi nell'analisi, la madre della vittima, Rita Preda, risulterebbe non esclusa.

In merito alla natura del materiale biologico rinvenuto sul portasapone, ciò di cui disponiamo è l'esito di un test Combur a campione (dunque non sull'intera superficie dell'oggetto), risultato negativo. Ciò non consente di escludere, almeno in linea teorica, che il DNA isolato sia effettivamente derivato da sangue sfuggito al test a campione. Le caratteristiche del reperto (superficie liscia e non assorbente, di colore chiaro) fanno tuttavia pensare che difficilmente una traccia di sangue, anche minuta, sarebbe sfuggita all'osservazione con stereomicroscopio. Il test immunocromatografico da noi effettuato poco aggiunge: la negatività riscontrata potrebbe essere infatti semplicemente dovuta al fatto che eventuale materiale biologico (di qualunque natura) presente sul portasapone era stato interamente asportato nel prelievo effettuato dal C.T. del P.M. (cosa tutt'altro che inverosimile, tanto che il secondo prelievo da noi eseguito non ha consentito di isolare la benché minima quantità di DNA).

⁴² Devlin B. *Forensic inference from genetic markers*. Stat Methods Med Res 1993;2:241-62.

⁴³ Presciuttini S, Cerri N, Turrina S, Pennato B, Alù M, Asmundo A, Barbaro A, Boschi I, Buscemi L, Caenazzo L, Carnevali E, De Leo D, Di Nunno C, Domenici R, Maniscalco M, Peloso G, Pelotti S, Piccinini A, Podini D, Ricci U, Robino C, Saravo L, Verzeletti A, Venturi M, Tagliabracci A. *Validation of a large Italian database of 15 STR loci*. Forensic Sci Int 2006; 156:266-68.

In pratica, non è possibile dire alcunché riguardo alla provenienza del DNA compatibile con quello di Chiara Poggi rinvenuto sul portasapone. Certo, potrebbe trattarsi di sangue, così come di qualunque altro materiale biologico. È però doveroso, in questo caso, non lasciarsi tentare da giudizi *ex post* (la conoscenza del fatto che in quella casa è avvenuto un omicidio che ha avuto Chiara Poggi quale vittima). Tutti noi, nelle attività della vita quotidiana, depositiamo sugli oggetti che manipoliamo quantità ridotte ma identificabili di DNA. Il fenomeno è ben descritto nella letteratura scientifica⁴⁴ e confermato anche dai risultati osservati in questo specifico caso: la presenza del DNA del padre di Chiara sulla maniglia del bagno; la verosimile presenza sullo stesso portasapone di minime quantità di DNA compatibile con la madre di lei.

Concludendo, il contemporaneo riscontro sul portasapone di un'impronta digitale di Alberto Stasi e di DNA di Chiara Poggi ha quale più ragionevole e semplice spiegazione il fatto che i due abbiano entrambi toccato l'oggetto, in tempi e per un numero di volte a noi del tutto sconosciuti e non determinabili. Il dato appare quindi del tutto irrilevante al fine della costituzione di una prova scientifica.

⁴⁴ Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G, Gill P. *The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces*. Forensic Sci Int 2002;129:25-34.

Si riportano di seguito alcune considerazioni in merito alle valutazioni esposte nella breve relazione del c.t. dott. Capra datata 31 agosto 2009 (allegata alla presente perizia).

Pur consci della rilevanza assolutamente marginale della questione (tant'è che in perizia vi si dedicano non più di cinque righe), cogliamo l'occasione per sviluppare il ragionamento che ci ha indotto a considerare Rita Preda quale possibile contributrice non esclusa al profilo genetico ottenuto dal portasapone liquido, possibilità rigettata dal c.t. dott. Capra.

Come detto, si tratta di profilo complesso, a cui partecipano verosimilmente i DNA di più di due individui: nulla di strano per un oggetto situato nel bagno di civile abitazione e dunque sottoposto al costante uso e alla manipolazione da parte di chi vi dimora. Vi sono pochi dubbi riguardo al fatto che la quantità principale di DNA isolato appartenga a Chiara Poggi. È inoltre evidente che nella traccia è presente DNA anche di altri individui, sotto forma di picchi allelici che appare poco ragionevole considerare *in toto* artefattuali, stante la loro riproducibilità in almeno due se non in tutte e tre le repliche di PCR disponibili (una effettuata dal c.t. Cap. Marino e due da noi).

Non vediamo come l'interpretazione dei dati possa essere ostacolata dal fatto che il reperto fosse stato precedentemente trattato con cianoacrilato per l'esaltazione di impronte digitali. Tale attività fu infatti espletata precedentemente al prelievo, all'estrazione e alla tipizzazione del DNA effettuati dal R.I.S., senza peraltro inficiare la possibilità di caratterizzare dallo stesso il DNA di Chiara Poggi (si ricordi tra l'altro che, dopo purificazione, il campione non manifestava segni di possibile inibizione della reazione di PCR, come dimostrato dai risultati dell'analisi real-time). In base alla letteratura scientifica a disposizione, uno studio del 2001 suggerisce la possibilità che il trattamento con cianoacrilato sia in grado di ridurre l'efficienza delle procedure d'estrazione del DNA (ma apparentemente solo per alcune

metodiche, come l'uso della resina Chelex, non adottata dal R.I.S.) e di conseguenza l'intensità dei picchi elettroforetici dei profili genetici in comparazione con controlli non trattati.⁴⁵ Non sono descritti altri tipi d'artefatto. Effetti artefattuali di qualsiasi genere sulla tipizzazione del DNA, dovuti a pretrattamento con cianoacrilato, sono esclusi in due studi più recenti.^{46,47}

Come già sottolineato, l'individuazione del profilo genetico di una traccia contenente poche decine o centinaia di picogrammi di DNA (quello che gli anglosassoni definiscono *low copy number DNA*) passa attraverso la replicazione dei dati.

Nella seguente tabella sono riportati, uno di fianco all'altro, i genotipi ottenuti nelle tre distinte reazioni di PCR effettuate a partire dall'estratto di DNA "ds_tot": "ds_tot" (R.I.S.); C17.ds_tot-bis.09 e C17.ds_tot-tris.09 (questa perizia). Per l'attività svolta dal R.I.S., in assenza di espliciti criteri di inclusione/esclusione di picchi dal profilo, si fa riferimento alla tabella dei genotipi inclusa nella integrazione alla Relazione Tecnica a firma del c.t. del P.M. Cap. Marino datata 5 marzo 2009. Per quanto riguarda le due repliche da noi effettuate, sono stati considerati tutti i picchi con altezza superiore a 75 rfu (la soglia, come anticipato, è stata lievemente ridotta rispetto a quella di 100 rfu precedentemente utilizzata, dovendosi in questo caso identificare contribuzioni minoritarie; il trattamento degli *stutter* è avvenuto in modo analogo a quanto prima indicato; si allegano in appendice i rispettivi elettroferogrammi: C17.ds_tot-bis.09 75 rfu e C17.ds_tot-tris.09 75 rfu). Nella colonna a destra sono riportati:

- il profilo genetico-consenso per la traccia "ds_tot", ottenuto considerando tutti i picchi allelici che comparivano almeno in due delle tre repliche di PCR;
- i profili genetici di soggetti che frequentavano l'abitazione, forniti dal c.t. Cap. Marino.

⁴⁵ von Wurmb N, Meissner D, Wegener R. *Influence of cyanoacrylate on the efficiency of forensic PCRs*. Forensic Sci Int 2001;124:11-6.

⁴⁶ Grubwieser P, Thaler A, Köchl S, Teissl R, Rabl W, Parson W. *Systematic study on STR profiling on blood and saliva traces after visualization of fingerprint marks*. J Forensic Sci 2003;48:733-41.

⁴⁷ Shalhoub R, Quinones I, Ames C, Multaney B, Curtis S, Seeboruth H, Moore S, Daniel B. *The recovery of latent fingerprints and DNA using a silicone-based casting material*. Forensic Sci Int 2008;178:199-203

Locus	ds_tot	C17 .ds_tot- bis.09	C17 .ds_tot- tris.09	Profilo genetico consenso	Stasi Alberto	Poggi Giuseppe	Preda Rita	Poggi Marco	Poggi R. M. Assunta	Cappa Stefania
D13S317	8-11-12	8-10-11 -12-13	8-10-11 -12-13	8-10-11 -12-13	12- <u>14</u>	8-11	11-12	11-12	8-11	11-12
D7S820	10-11	9-10-11	6-8-9 -10-11	9-10-11	9- <u>12</u>	11-11	10-10	10-11	9- <u>13</u>	9- <u>12</u>
Amel.	X-Y	X-Y	X-Y	X-Y	X-Y	X-Y	X-X	X-Y	X-X	X-X
D2S1338	19-20- 23	17-20-23	17-19 -20-23	17-19 -20-23	<u>18</u> -20	20-23	19-23	19-23	17-23	17- <u>26</u>
D21S11	29-31.2	27-28-28.2 -29-30- 30.2-31.2	27-28-29 -30-31.2 -32.2	27-28 -29-30 -31.2	30- <u>31</u>	31.2- <u>32.2</u>	27-29	27 -31.2	30-31.2	29-31.2
D16S539	10-11	10-11-12	10-11-12	10-11-12	11- <u>13</u>	11-11	10-12	10-11	<u>8</u> -11	11-11
D18S51	12-13 -17-18	12-13-17	12-13	12-13-17	12-17	12-13	13-17	13-17	12-13	13- <u>14</u>
CSF1PO	11-11	10-11-12	8-10 -11-12	10-11-12	10-11	11-11	10-11	11-11	11-12	10-11
FGA	21-22 -24	20-21 -22-24	21-22 -23-24	21-22-24	<u>20</u> -21	21- <u>22.2</u>	22-24	<u>22.2</u> -24	<u>20-22.2</u>	<u>20</u> -24

È possibile osservare come tutti i soggetti riportati, con l'eccezione di Rita Preda, possano essere esclusi – per lo meno in un locus (l'allele mancante nel profilo-consenso è evidenziato mediante sottolineatura) – quali contributori alla traccia. Ivi compresi gli altri consanguinei di Chiara Poggi, sebbene proprio costoro avessero una maggiore probabilità teorica di “sfuggire” all'esclusione, dovendo/potendo (a seconda del rapporto di parentela) condividere con lei per discendenza uno o due alleli. Rita Preda, viceversa, non è esclusa, come lo sarebbe invece il 99,91% della popolazione, ricalcolando la probabilità d'esclusione alla luce del nuovo profilo-consenso ottenuto.

Il non potersi escludere che il DNA di Rita Preda sia presente sul portasapone del suo stesso bagno è d'altronde un fatto del tutto plausibile, che peraltro non modifica il nostro giudizio riguardo alla scarsa rilevanza del reperto al fine della ricostruzione della dinamica del fatto.

PARTE QUINTA

QUESITO B5 – TRACCE DI SANGUE

SULLE SCARPE DI ALBERTO STASI

PREMESSA

È utile, al fine di consentire una più chiara comprensione dei risultati ottenuti nelle prove sperimentali svolte, ribadire e precisare alcuni concetti già illustrati nella più ampia premessa metodologica che precede la discussione degli ultimi quesiti.

Il contemporaneo riscontro in un reperto della presenza di sangue (identificato mediante test più o meno specifico) e di DNA di un certo individuo X, come detto, non consente automaticamente di concludere che il sangue appartenga ad X, e allo stesso modo che il DNA di X derivi da sangue. Ad esempio, se si indaga su una spessa crosta di materiale e da questa si preleva un campione, la positività della ricerca dell'emoglobina umana ed il confronto del DNA potranno dirci che effettivamente quella crosta è fatta del sangue di quella persona. Quando invece la ricerca venga effettuata alla cieca, tamponando a caso una superficie con cartine reattive a base di tetrametilbenzidina, la eventuale positività ci dice che potrebbe esserci una traccia microscopica di sangue; la ricerca dell'emoglobina umana, effettuata spazzolando un'ampia area, ci dirà – se positiva – che da qualche parte su quell'area c'è una quantità microscopica di sangue umano. Se poi si trova, sempre su un campione prelevato da un'area ampia, il DNA umano compatibile con un determinato soggetto, possiamo solo dire che quella superficie è caratterizzata dalla presenza di DNA di quella persona. Mettere insieme i tre risultati e dire che su quella superficie c'è sangue di quella persona sarebbe frutto di un salto logico, perché il DNA non è presente solo nel sangue e sappiamo che una trasposizione “innocente” di DNA è possibile⁴⁸. Mancando la prova macroscopica (o anche microscopica) del fatto che quel DNA è stato estratto da una macchia di sangue umano, il risultato deve essere valutato in termini fortemente congetturali.

⁴⁸ Per una fortunata coincidenza ne abbiamo dimostrazione proprio nel caso di cui si discute: sulla suola delle scarpe di Alberto Stasi è presente DNA dello stesso. Come ci sia giunto non è dato di sapere, ma certamente è stata una migrazione “innocente”.

Nelle prove sperimentali effettuate, il problema legato a tale salto logico poteva essere aggirato con facilità. Il fatto che la donatrice del sangue utilizzato per le prove non fosse mai in alcun modo venuta precedentemente a contatto, né con le scarpe acquistate appositamente, né con quelle appartenute ad Alberto Stasi, garantiva che l'eventuale riscontro di DNA compatibile al di sotto delle suole dopo le prove di calpestamento fosse dovuto alla permanenza del suo sangue (anche in presenza di test con luminol, tetrametilbenzidina e immunocromatografico negativi). È chiaro che un simile salto non è possibile per l'indagine effettuata su reali reperti: il riscontro di test con luminol, tetrametilbenzidina e/o immunocromatografico positivo in un campionamento effettuato alla cieca e la successiva identificazione del DNA isolato altrettanto alla cieca dalla medesima area non assicurano, di per sé, che i due risultati indipendenti si riferiscano alla medesima microtraccia, piuttosto che a due o più tracce distinte, depositatesi per ragioni e in tempi tra loro del tutto indipendenti e non conoscibili.

Per converso, se su una determinata superficie non rinvengo sangue umano e DNA di una determinata persona, non sono autorizzato a concludere che quella superficie non è entrata in contatto con sangue di quella persona. Innumerevoli variabili – ignote perché mai ricercate in studi scientifici su grandi numeri – possono intervenire facilitando od ostacolando la “cattura” e la dispersione del sangue.

Inoltre, se è vero che la positività di un'indagine ci autorizza a trarre conclusioni (con i limiti prima ricordati), la negatività non ci autorizza mai a giungere alle conclusioni opposte. Ci spieghiamo con un esempio: la presenza di DNA di uno di noi su un determinato oggetto rinvenuto negli Stati Uniti induce a chiederci in che modo questo DNA sia giunto fin laggiù. Non è detto che questo risultato sia dovuto a un contatto diretto della persona con quell'oggetto, perché potrebbe essersi trattato di un trasferimento mediato da un altro oggetto o da un'altra persona, ma il dato è comunque significativo. Se sullo stesso oggetto non rinvengo DNA di una persona, non posso invece affermare che quella persona non ha mai avuto contatti con quell'oggetto, perché non so se e in che modo DNA eventualmente presente abbia potuto

dispersersi prima del prelievo, e d'altra parte non so neppure se il contatto dovesse necessariamente comportare la contaminazione dell'oggetto da parte di DNA.

Con queste premesse, non è scientificamente corretto affermare che sulla suola delle scarpe di Alberto Stasi sia assente sangue umano di Chiara Poggi solo perché le indagini effettuate⁴⁹ hanno dato risultato negativo. Il giudizio che si può dare è che non è stata rilevata la presenza di sangue umano in quantità tale da superare i limiti di sensibilità dei metodi utilizzati. Vero è che la riportata negatività del test del luminol effettuato sull'intera superficie della suola delle scarpe di Alberto Stasi dal C.T. del PM è assai suggestiva, in considerazione della grande sensibilità del metodo.

Tutti questi problemi devono essere ben chiari per comprendere il significato delle indagini effettuate dal consulente del P.M. e da noi sulle suole delle scarpe di Alberto Stasi e delle sperimentazioni che abbiamo eseguito nel corso delle attività della perizia.

⁴⁹ Risultano, in base agli atti: test con luminol sull'intera superficie delle suole, Combur test a campione, presenza di DNA attribuibile ad Alberto Stasi.

MATERIALI E METODI

Dati documentali

Risulta dagli atti che alle 13.50 del 13 agosto 2007 Alberto Stasi, giunto in auto, si presentò alla Stazione Carabinieri di Garlasco riferendo di avere rinvenuto poco prima il corpo di Chiara Poggi.

Dagli atti risulta inoltre che Alberto Stasi, alla guida della propria auto, accompagnò i militari operanti sino fuori dal cancello di casa Poggi e che poi rimase in strada per un tempo indeterminato, svolgendo attività note solo a grandi linee (i testimoni affermano che in alcuni momenti camminava nervosamente, altre volte era fermo). In quella fase un sommario esame delle suole (effettuato con scarpe indossate) non evidenziò la presenza di materiale riferibile a sangue. È noto che alle ore 16, sempre indossando le stesse scarpe, Alberto Stasi si trovava presso la caserma dei Carabinieri di Garlasco, che le scarpe furono poi acquisite la mattina successiva, dopo la chiusura del verbale di sommarie informazioni (ore 7 del 14 agosto). Ci è stato anche riferito che egli avesse camminato su erba recentemente irrigata da un impianto automatico.

Si riportano in modo sintetico le attività di indagine effettuate sulle scarpe, come da Relazione tecnica 3306IT2007 del R.I.S di Parma datata 15 novembre 2007 (accertamenti biologici). Sulle suole sono stati eseguiti, entrambi con esito negativo, test con luminol sull'intera superficie e Combur test "a campione". L'estrazione del DNA è stata effettuata mediante un unico prelievi su entrambe le suole ("scarpe_lacoste"). La quantificazione del DNA mostrava inibizione. Dopo purificazione dell'estratto, è risultata una concentrazione di DNA pari a 260 pg/μl (come da relazione preliminare a firma del C.T. del P.M. datata 26 settembre 2007). La successiva amplificazione con Identifiler ha generato un profilo genetico compatibile con quello di Alberto Stasi.

Ricerca di emoglobina e DNA umani sulle suole delle scarpe sequestrate ad Alberto

Stasi

Il test con luminol è stato effettuato miscelando all'uso due soluzioni contenenti rispettivamente $C_8H_7N_3O_2$ (luminol) + $Na_2CO_3 \cdot 4H_2O$ e $NaBO_3$. La miscela è stata nebulizzata sui campioni d'interesse e la comparsa di chemiluminescenza osservata in camera oscura.

Il test con tetrametilbenzidina è stato effettuato utilizzando strisce reattive Multistix 10SG (Bayer-Siemens).⁵⁰ L'area reattiva contenente tetrametilbenzidina è stata imbevuta con soluzione fisiologica sterile e quindi accostata alla traccia di interesse: è stata quindi valutata la comparsa, tanto sull'area reattiva che sul substrato sul quale era localizzata la traccia di interesse, di viraggio colorato blu/verde entro i due minuti. I risultati sono riportati in forma qualitativa secondo i gradi di giudizio: positivo (rapida e vivace comparsa di colorazione blu/verde); dubbio (comparsa di colorazione verdastra non immediata ma pur sempre entro due minuti); negativa (assenza di viraggio colorato o colorazione bruno-nerastra dell'area reattiva palesemente attribuibile all'asportazione di sporcizia dalla superficie campionata).

Il test immunocromatografico per la ricerca di emoglobina umana è stato effettuato utilizzando il sistema HemDirect (Seratec). La superficie di interesse è stata spazzolata con un tampone imbevuto di soluzione fisiologica sterile, la cui estremità in cotone è stata quindi risospesa in 200 microlitri del buffer di estrazione fornito con il kit e posta su agitatore orizzontale per 2 ore a temperatura ambiente. Il materiale è stato quindi centrifugato. Uno-due microlitri di surnatante sono stati depositati su una cartina di tornasole al fine di verificare che il pH della soluzione fosse vicino alla neutralità. Cento microlitri di soluzione sono stati quindi caricati sulla piastra immunocromatografica. La lettura del risultato è stata effettuata a 10 minuti dalla deposizione del campione. I risultati sono stati riportati in forma qualitativa secondo il grado di giudizio: positivo (comparsa di una banda rossa nella regione test, in presenza di banda

⁵⁰ Le strisce Multistix 10SG risultano in tutto e per tutto analoghe a "Hemastix" se non per la presenza di aree reattive addizionali per altre sostanze: nitriti, glucosio, ecc.

rossa nella regione controllo); negativo (assenza di banda rossa nella regione test, in presenza di banda rossa nella regione controllo).

L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire dall'aliquota residua di liquido di risospensione per test immunocromatografico utilizzando il kit QIAamp DNA Micro (QIAGEN) secondo le indicazioni della ditta produttrice. L'eluizione finale del DNA è stata effettuata in un volume di 50 microlitri.

Due microlitri di ciascun estratto (il test è stato effettuato in doppio per ciascun campione saggiato) sono stati sottoposti a quantificazione di DNA genomico umano mediante real-time PCR utilizzando il sistema Quantifiler Human DNA Quantification kit (Applied Biosystems), come da manuale d'istruzioni, e lo strumento 7300 Real Time PCR (Applied Biosystems). La possibile presenza di inibitori della reazione di PCR negli estratti di DNA analizzati è stata verificata, come da manuale d'istruzioni, mediante esame di un controllo positivo interno (IPC) fornito con il kit: il raggiungimento del ciclo-soglia da parte dell'IPC entro i 30 cicli di amplificazione indica assenza di inibitori nell'estratto di DNA.

Dieci microlitri di ciascun estratto sono stati amplificati utilizzando il kit Minifiler (Applied Biosystems), secondo le indicazioni della ditta produttrice.

La genotipizzazione degli amplificati è stata effettuata mediante elettroforesi capillare utilizzando lo strumento ABI PRISM 310 Genetic Analyzer e i programmi GeneScan versione 3.7 e Genotyper versione 3.7 (Applied Biosystems), secondo le indicazioni riportate nel manuale di istruzioni di Minifiler, con lievi modifiche: al fine di consentire una migliore lettura degli elettroferogrammi, il tempo di iniezione elettrocinetica del campione all'interno del capillare è stato portato da 5 a 15 secondi; la soglia minima per l'inclusione di un picco elettroforetico nell'analisi è stata posta a 50 unità fluorescenti relative (rfu); lo standard di peso molecolare interno utilizzato è GeneScan LIZ600 (Applied Biosystems).

Sperimentazioni

Abbiamo acquistato due paia di scarpe Lacoste modello Swerve Strap 33S di taglia 43 (non ci è stato possibile reperire la taglia 41).

Nelle operazioni peritali del 23 luglio abbiamo utilizzato le scarpe originali sequestrate ad Alberto Stasi, sulle quali erano stati precedentemente effettuati dal perito prof. Ciardelli alcuni prelievi circoscritti della suola.

I coniugi Poggi ci hanno fornito 5 piastrelle che riferiscono essere identiche a quelle del piano terreno della loro abitazione.

Il sangue è stato prelevato da volontarie donatrici con aghi tipo Butterfly connessi a breve cannula di plastica, lasciandolo gocciolare direttamente sulle piastrelle.

Il calpestamento delle piastrelle imbrattate è avvenuto secondo gli schemi sotto riportati. La caratterizzazione di “secco” o “fresco” del sangue, in mancanza di riferimenti utili, è stata effettuata visivamente, basandoci sull’aspetto esteriore delle macchie, delle quali sono state verificate le modificazioni nel tempo.

Nella prima sperimentazione (10 luglio) il calpestamento è avvenuto con una sola pedata verticale. In tutte le altre⁵¹ il calpestamento è avvenuto con 10 pedate verticali. Solo in un’occasione (14 luglio, su macchia “spugnata” secca) vi è stato uno sfregamento orizzontale per dieci volte.

La marcia effettuata dopo il calpestamento del sangue è avvenuta nelle seguenti circostanze:

- 10 luglio: cinquanta passi nel cortile dell’Istituto di Medicina Legale di Torino, seguiti da tre ore di attività varie con deambulazione all’interno dell’Istituto stesso, su pavimenti lisci;

⁵¹ Quando è stato necessario riutilizzare scarpe che già avevano calpestato sangue, le suole sono state lavate con acqua corrente prima del nuovo impiego e l’assenza di sangue è stata verificata con la negatività del test TMB. Anche le piastrelle sono state lavate con acqua corrente.

- 14 luglio: all'aperto in Torino, su asfalto, marciapiedi vari, su un breve tratto di tavole di legno e su tratto di strada inghiaata;
- 14 luglio: all'aperto in Torino, un'ora circa su asfalto, marciapiedi vari, breve tratto di tavole di legno e tratto di strada inghiaata;
- 20 luglio: analogamente alla prova precedente;
- 23 luglio: all'aperto, in Pisa, un'ora circa su asfalto e marciapiedi in parte di lastre di pietra.

Qui di seguito vengono riportate alcune immagini (Figg. 54-58) che documentano i piani sui quali si è marciato (oltre al consueto asfalto ed ai marciapiedi).



Figura 54 – 20 luglio 2009: tavole di legno



Figura 55 – 20 luglio 2009: pavimentazione in pietra.



Figura 56 – 20 luglio 2009: ghiaia

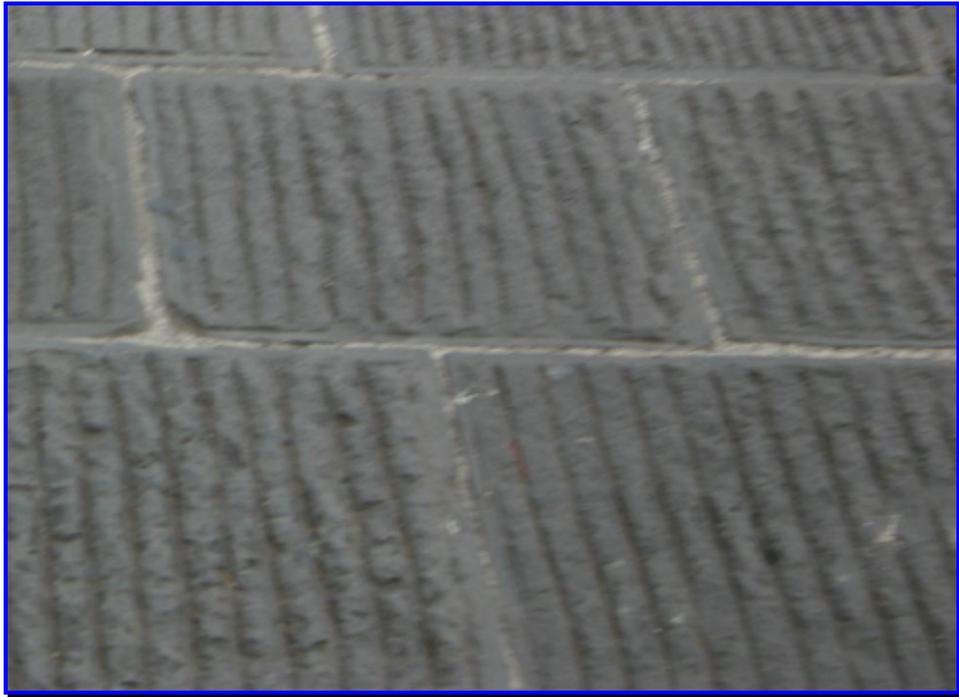


Figura 57 – 23 luglio 2009: marciapiedi in pietra



Figura 58 – 23 luglio 2009: feci di uccelli su marciapiedi

Durante la sperimentazione del 23 luglio è stata inoltre verificata, mediante guida di autovettura per 5 minuti con multiple accelerazioni, frenate e cambi di marcia, la capacità di scarpe che avevano calpestato sangue in diverse condizioni d'essiccamento di trasferirne parte sui pedali e sul tappetino posto al di sotto dei piedi del guidatore.

RISULTATI

Ricerca di sangue umano sulle scarpe sequestrate ad Alberto Stasi (23 maggio 2009)

Il giorno 23 maggio 2009, le suole delle scarpe Lacoste di Alberto Stasi sono state sottoposte ad esame visivo e successiva osservazione con stereomicroscopio. L'esame con stereomicroscopio ha consentito di evidenziare, sulla suola della scarpa destra, due minute tracce brunastre, campioni "C17.1.09" e "C17.2.09" (Figura 59a e 59b), che sono state sottoposte a test con tetrametilbenzidina.

Il test ha mostrato rapido (< 2 minuti) viraggio della cartina reattiva verso il blu/verde (Fig. 59d), con colorazione peraltro del tutto analoga a quella ottenuta per test di controllo effettuati su un residuo vegetale ancora presente sulla suola (ben apprezzabile allo stereomicroscopio e visibile anche a occhio nudo, come si può osservare in Figura 59c) e su campionature casuali di aree del tallone e dell'avampiede. Il dato non fa che confermare l'aspecificità della metodica e il margine di arbitrarietà nella lettura del risultato. Con tale arbitrarietà si può spiegare, riteniamo, l'apparente contraddittorietà del risultato ottenuto (test tetrametilbenzidina a campione positivo) con quello precedente riportato dal C.T. del PM (test con tetrametilbenzidina a campione sulle suole negativo).

Nulla di rilevante è stato viceversa evidenziato, all'esame con stereomicroscopio, in corrispondenza della suola sinistra.

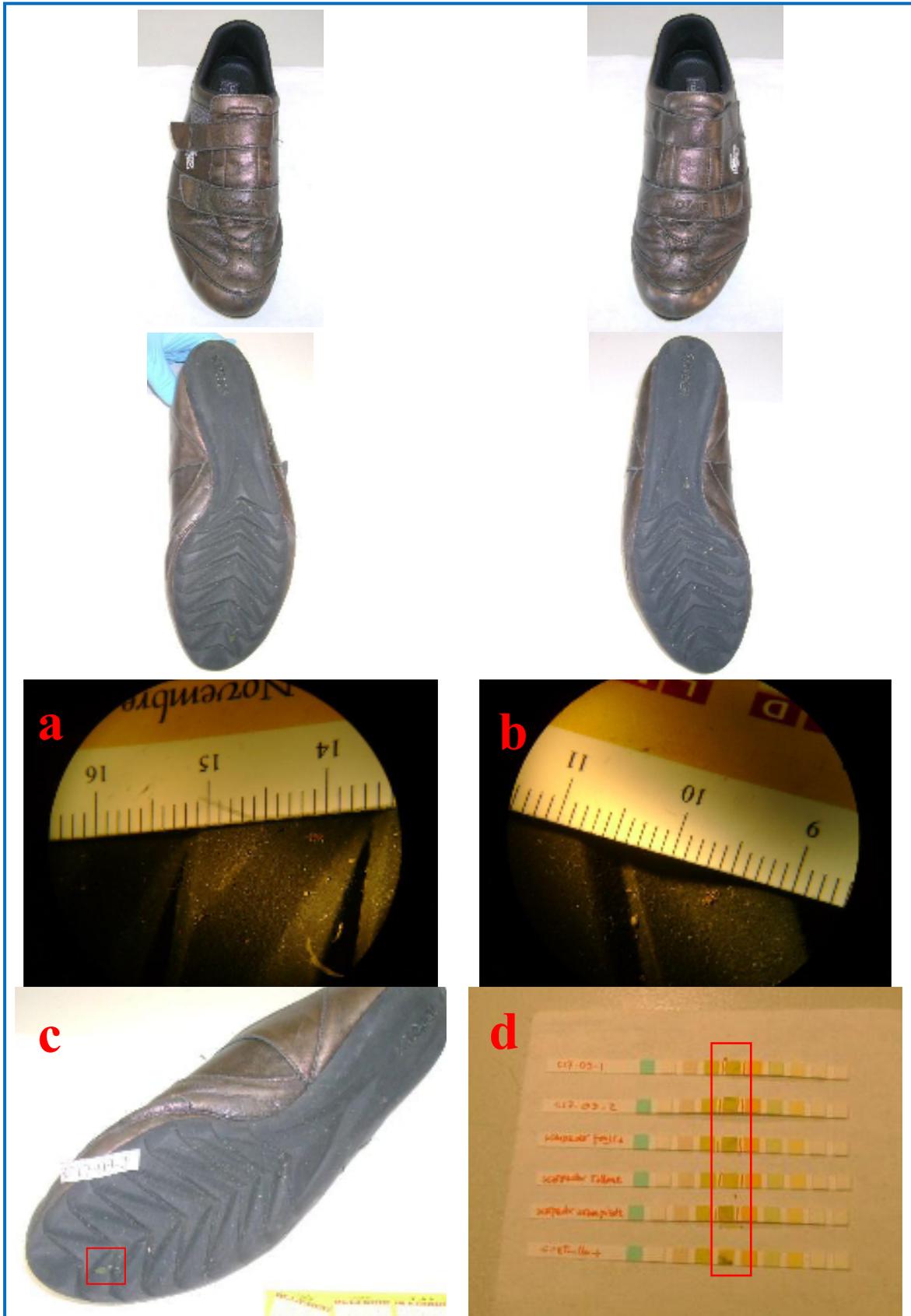


Figura 59 – Scarpe Lacoste di Alberto Stasi – a: particolare della traccia C17.1.09; b: particolare della traccia C17.2.09; c: il residuo vegetale; d: risultati del test con tetrametilbenzidina sulla suola della scarpa destra (l'area di striscia reattiva con tetrametilbenzidina è riquadrata).

La superficie di entrambe le suole (campione C17.3.09 suola destra, campione C17.5.09 suola sinistra), nonché entrambe le tomaie (campione C17.4.09 tomaia destra, campione C17.6.09 tomaia sinistra) che non risultavano in precedenza oggetto d'alcuna indagine, sono state quindi spazzolate con tampone imbevuto di soluzione fisiologica sterile e sottoposte a test immunocromatografico: tutti e quattro i prelievi hanno dato esito negativo.

L'estrazione di DNA e la successiva quantificazione nei suddetti quattro campioni indicava l'apparente assenza negli stessi (o presenza in quantità residuali, per la suola della scarpa sinistra) di DNA genomico umano. I campioni sono stati egualmente sottoposti ad amplificazione e genotipizzazione: è stato così osservato che, per i prelievi da entrambe le suole, era comunque possibile caratterizzare profili genetici. La lettura di detti profili (i cui elettroferogrammi sono riportati in appendice: campioni C17.3.09 e C17.5.09) risulta ostacolata da tutte quelle difficoltà interpretative precedentemente segnalate in presenza di DNA esiguo; è tuttavia possibile notare come entrambi i profili non siano compatibili con quello della vittima; viceversa il profilo ottenuto dalla scarpa sinistra, in particolare, pur in presenza di alleli soprannumerari e saltuaria assenza totale/parziale di alleli (picchi sotto la soglia di detezione di 50 rfu), appare compatibile con quello di Alberto Stasi. Il risultato, che conferma peraltro quanto già ottenuto dal R.I.S., non è stato ulteriormente approfondito (mediante replica delle amplificazioni o potenziamento delle condizioni di PCR rispetto a quelle standard), alla luce della sua scarsa rilevanza al fine della risposta al quesito peritale.

Scarpe nuove Lacoste (10/07/2009)

- Calpestamento gocce umide e ampia macchia umida: gli esiti del trasferimento al tempo 0 sono mostrati nelle Figure 61-63. Dopo 3 ore di uso in ambiente chiuso, la scarpa che ha calpestato l'ampia macchia umida mostra ancora abbondanti tracce di sangue macroscopicamente evidenti (positive a test con tetrametilbenzidina) (Fig. 69); la scarpa che ha calpestato gocce umide mostra ancora residui delle tracce evidenziate al tempo 0

positivi alla prova della tetrametilbenzidina (Fig. 70) in corrispondenza di rilievi sulla punta; l'esito del test del tallone è viceversa dubbio: in assenza di tracce evidenti, il viraggio colorato è analogo per tempo di comparsa e intensità a quello ottenuto per campionature casuali effettuate in aree del tallone non interessate a trasferimento di sangue al tempo 0.

- Calpestamento gocce secche: gli esiti del trasferimento al tempo 0 sono mostrati nella Figura 68. In assenza di ben evidenti tracce di sangue al tempo 0, che consentissero di "mirare" l'effettuazione del test con tetrametilbenzidina dopo 3 ore di uso in ambiente chiuso, esso è stato condotto a campione, con esito positivo tanto per la punta che per il tallone (Figg. 72-73).
- Calpestamento ampia macchia prevalentemente (ma non completamente) secca: gli esiti del trasferimento al tempo 0 sono mostrati nella Figura 67. Dopo 3 ore di uso in ambiente chiuso, la suola mostra ancora residui delle tracce evidenziate al tempo 0 positivi alla tetrametilbenzidina (Fig. 71) in corrispondenza di rilievi sulla punta, l'esito del test del tallone è viceversa dubbio: il viraggio colorato è analogo per tempo di comparsa e intensità a quello ottenuto per campionature casuali effettuate in aree del tallone non interessate a trasferimento di sangue al tempo 0.



Figura 60 – Macchie umide prima del calpestamento.



Figura 61 – Scarpa destra subito dopo calpestamento di ampia pozza di sangue umido.



Figura 62 – Scarpa sinistra subito dopo il calpestamento di gocce umide.



Figura 63 – Dettaglio della precedente

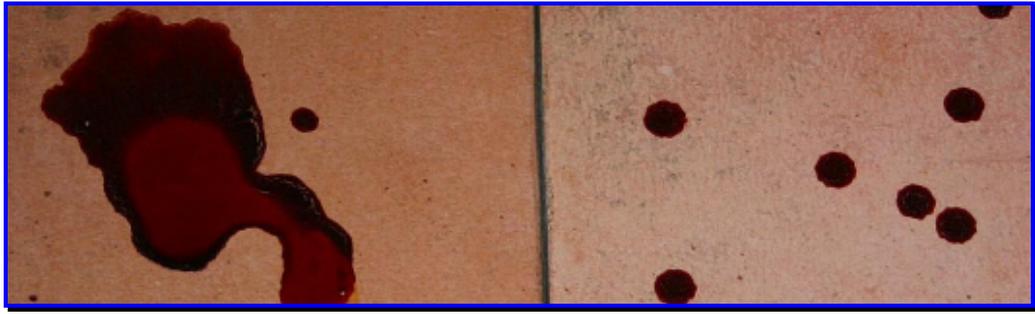


Figura 64 – Ampia macchia parzialmente essiccata e gocce secche prima del calpestamento



Figura 65 – L'ampia macchia parzialmente essiccata dopo il calpestamento

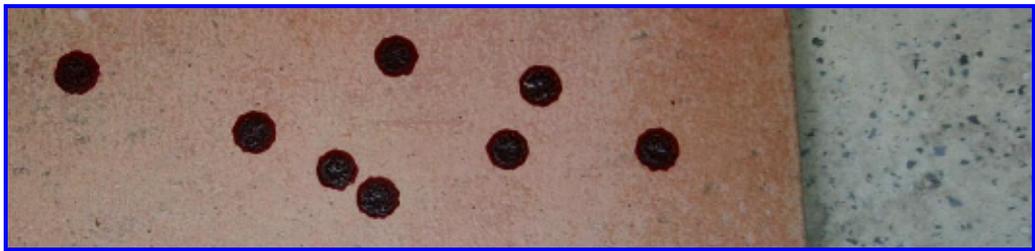


Figura 66 – Gocce secche dopo il calpestamento



Figura 67 – Scarpa destra subito dopo calpestamento di ampia macchia parzialmente essiccata



Figura 68 – Scarpa sinistra subito dopo calpestamento di gocce secche



Figura 69 – Scarpa destra dopo calpestamento di ampia macchia umida e svolgimento di attività varie nell'interno dell'Istituto di Medicina Legale di Torino (pavimenti lisci) per circa 3 ore.



Figura 70 – Scarpa sinistra dopo calpestamento di gocce umide e svolgimento di attività varie nell'interno dell'Istituto di Medicina Legale di Torino (pavimenti lisci) per circa 3 ore; è cerchiata la sede di traccia di sangue residua



Figura 71 – Scarpa destra dopo calpestamento di ampia macchia parzialmente essicata e svolgimento di attività varie nell'interno dell'Istituto di Medicina Legale di Torino (pavimenti lisci) per circa 3 ore



Figura 72 – Scarpa sinistra dopo calpestamento di gocce secche e svolgimento di attività varie nell'interno dell'Istituto di Medicina Legale di Torino (pavimenti lisci) per circa 3 ore



Figura 73 – Dettaglio della precedente, con reazione positiva al test con tetrametilbenzidina

Scarpe nuove Lacoste (14/07/2009)

Si effettuano dieci sfregamenti su ampia macchia “spugnata” e secca e dieci calpestamenti di gocce secche: il trasferimento di sangue al tempo 0 dopo tali attività è illustrato rispettivamente nelle Figure 74 e 75. Dopo un’ora di marcia all’aperto, in assenza di ben evidenti tracce di sangue al tempo 0 che consentissero di “mirare” l’effettuazione del test con tetrametilbenzidina sulla suola che ha pestato la macchia spugnata, l’esame effettuato mediante campionature casuali sulla parte anteriore ha avuto esito negativo. Il test ha invece esito positivo su una traccia circoscritta evidenziabile, su rilievo sagittale posto nella regione tra punta e tacco, che è tuttavia palesemente costituita da materiale acquisito durante la camminata (Fig. 76). Per quanto riguarda la suola della scarpa che ha calpestato gocce secche (Fig. 77), il test con tetrametilbenzidina effettuato sulla parte anteriore (in maniera *random*, in assenza di chiare tracce di sangue evidenziabili al tempo 0 ed eventualmente persistenti) ha generato risultato dubbio; sul tallone il risultato è positivo per una traccia circoscritta, ma anche in questo caso non si tratta di materiale preesistente, ma acquisito durante la camminata. Su entrambe le suole è stata effettuata ricerca di emoglobina umana con esiti negativi. L’isolamento e successiva amplificazione del DNA non ha prodotto alcun profilo genetico evidenziabile.



Figura 74 – Suola della scarpa destra dopo dieci strisciate su ampia macchia secca



Figura 75 – Suola della scarpa sinistra dopo dieci calpestamenti di gocce secche



Fig. 76 – Suola della scarpa destra dopo camminata di un'ora all'aperto; la freccia indica residuo tetrametilbenzidina-positivo catturato durante la marcia



Figura 77 – Parte posteriore della suola della scarpa sinistra dopo camminata di un'ora all'aperto

Scarpe nuove Lacoste (20/07/2009)

- Calpestamento di gocce secche: il trasferimento di sangue al tempo 0 è mostrato in figura 78a. Dopo un'ora circa di marcia all'aperto, il test con tetrametilbenzidina, effettuato sul tacco in un punto ove era evidente al tempo 0 una traccia da trasferimento (ora non più visibile), dà esito positivo. Debole positività si osserva anche per multiple campionature casuali e non mirate effettuate sul tacco. Positività al test con tetrametilbenzidina si evidenzia anche per una traccia posta sul margine laterale della punta. La ricerca di emoglobina umana sulla suola ha viceversa esito negativo. Estrazione, quantificazione e successiva tipizzazione di DNA umano: DNA isolato in concentrazioni subottimali con profilo genetico parziale/misto ai limiti delle soglie di interpretazione analitiche, apparentemente non compatibile con quello della donatrice (l'elettroferogramma, campione C17.21.09, è riportato in appendice)
- calpestamento gocce parzialmente umide: il trasferimento di sangue al tempo 0 è mostrato in figura 78b. Dopo un'ora circa di marcia all'aperto, sulla suola tanto in corrispondenza della punta che del tacco, si osserva positività al test con tetrametilbenzidina su isolati agglomerati non preesistenti, acquisiti durante la marcia (Fig. 79). Sul tacco, in assenza di tracce visibili a occhio nudo al tempo 0, si effettua anche un test con tetrametilbenzidina mediante tocature multiple, che risulta positivo. La ricerca di emoglobina umana sulla suola è negativa. Estrazione, quantificazione e successiva tipizzazione di DNA umano: DNA isolato in concentrazioni subottimali con profilo genetico parziale/misto ai limiti delle soglie di interpretazione analitiche, apparentemente non compatibile con quello della donatrice (l'elettroferogramma, campione C17.20.09, è riportato in appendice).



Figura 78 (a,b) – Suole delle scarpe dopo calpestamento di gocce di sangue secche (a) e di gocce di sangue parzialmente umide (b)



Figura 79 – Punta della suola della scarpa destra dopo camminata di un'ora all'aperto: risultato positivo del test con tetrametilbenzidina su materiale catturato nel corso della marcia

Calpestamento di erba bagnata

Indossando le scarpe Lacoste utilizzate nel primo esperimento per il calpestamento del sangue umido (con riguardo a quella ampiamente imbrattata di sangue per avere calpestato una grossa pozza), è stata calpestata erba appena irrigata con impianto automatico per circa tre minuti.



Figura 80 – L'erba bagnata dall'irrigatore

La sequenza di immagini che riportiamo di seguito documenta le variazioni dell'aspetto della suola in varie fasi dell'esperimento.



Figura 81 – Prima della marcia



Figura 82 – Dopo 7 passi



Figura 83 – Dopo 15 passi



Figura 84 – Dopo 22 passi



Figura 85 – Dopo 29 passi

La scarpa è stata lasciata asciugare all'aria e posta in scatola di cartone. Il successivo 23 luglio, in occasione di operazioni peritali in Pisa di seguito descritte è stato anche effettuato test con tetrametilbenzidina a campione sulla suola, con esito positivo. Il perito prof. Ciardelli ci ha fatto in seguito pervenire mezzo posta due tamponi di cotone da lui utilizzati per spazzolare la suola. La ricerca di emoglobina umana su di essi ha avuto esito negativo. La quantificazione e tipizzazione del DNA effettuate dopo l'estrazione hanno avuto anch'esse esiti negativi.

Scarpe Lacoste sequestrate ad Alberto Stasi (Pisa, 23/07/2009)

Le modalità di esecuzione degli esperimenti sono dettagliatamente descritte nel verbale delle operazioni peritali; i risultati sono illustrati nella tabella riportata qui di seguito.

Stato del sangue	Tipo di attività dopo calpestamento del sangue	Sede del prelievo	Luminol	TMB	Ricerca emoglobina umana	Profilo del DNA**
Fresco	Guida auto 1 con scarpa destra	Pedale acceleratore	Non effettuato	+	-*	Parziale, non compatibile con donatore (C17.22/3A.09)
Fresco	Guida auto 1 con scarpa destra	Pedale freno	Non effettuato	+	-	Parziale, non compatibile con donatore (C17.22/3F.09)
Fresco	Guida auto 1 con scarpa destra	Tappetino	Isolata area positiva	+(area luminol-positiva)	-(area luminol-positiva)	Parziale/misto, dubbia compatibilità con donatore (C17.22/1T.09)
Fresco	Camminata all'aperto su asfalto/marciapiede 1h circa	Suola	Non effettuato	+	+	Parziale/misto, compatibile con donatore (C17.22/7.09)
Semi-secco	Guida auto 1 con scarpa sinistra	Pedale frizione	Non effettuato	+	-	Parziale/misto, non compatibile con donatore (C17.22/5FR.09)
Semi-secco	Guida auto 1 con scarpa sinistra	Tappetino	Due aree positive (A e B)	+(A,B)	A: - B: +	A: parziale, non compatibile con donatore (C17.22/3TA.09) B: misto, compatibile con donatore (C17.22/3TB.09)
Semi-secco	Camminata all'aperto su asfalto/marciapiede 1h circa	Suola	Non effettuato	+	+	Misto, compatibile con donatore (C17.22/8.09)
Secco	Guida auto 2 con scarpa sinistra	Pedale frizione	Non effettuato	+	+	Parziale/misto, compatibile con donatore (C17.22/11.09)
Secco	Guida auto 2 con scarpa sinistra	Tappetino	Negativo	Non effettuato	Non effettuato	Non effettuato
Secco	Camminata all'aperto su asfalto/marciapiede 1h circa	Suola (tacco e punta ⁵²)	Non effettuato	Tacco: + Punta: +	Tacco: -* Punta: -	Tacco: parziale, non compatibile con donatore (C17.22/9.09) Punta: parziale, non compatibile con donatore (C17.22/10.09)

* Debolissima positività comparsa oltre i 10 minuti di tempo di lettura.

** Per ciascun prelievo si indica il codice del relativo elettroferogramma, allegato in appendice. In appendice è riportato l'elettroferogramma del profilo genetico del donatore, ottenuto con il sistema Identifiler (C17.SP.09).

⁵² Con il termine "punta" si intende, per semplicità, tutta la parte anteriore della suola della scarpa.

Si segnala che la quantità di DNA isolata dai prelievi riportati in tabella è risultata sempre estremamente ridotta (pochi picogrammi per microlitro di estratto), se non addirittura non determinabile in taluni campioni che hanno comunque poi generato un profilo genetico. La lettura dei tracciati elettroforetici era pertanto soggetta ai tipici fenomeni che ostacolano l'interpretazione di profili di DNA esiguo (parziale/completa assenza di amplificazione per determinati loci, presenza di alleli soprannumerari di potenziale natura artefattuale).

Posto che lo scopo della sperimentazione era esclusivamente quello di verificare trasferibilità e permanenza di sangue del donatore sotto le scarpe o sulle superfici venute a contatto con esse, il criterio in base al quale è stato formulato il giudizio di compatibilità tra profili ottenuti e genotipo del donatore è stato volutamente di tipo qualitativo e in generale piuttosto "lasso". Sono stati indicati come incompatibili i profili che presentavano, per un numero cospicuo di marcatori suscettibili di tipizzazione, discrepanze alleliche con il genotipo del donatore. All'estremo opposto, il giudizio di compatibilità è stato applicato, talora, pur in presenza di alleli soprannumerari (campioni misti) o parziali/totali discordanze in singoli marcatori (ad es. campione C17.22/11.09).

Il profilo del campione C17.22/1T.09 appariva particolarmente lacunoso e di complessa interpretazione, tuttavia il riscontro di alcuni alleli caratteristici del donatore e rari nella popolazione (ad es. allele 27 al locus FGA), e dunque poco probabilmente di natura artefattuale, inducono a non escludere la possibilità che esso sia derivato da sangue, da cui il cauto giudizio di dubbia compatibilità.



Figura 86 – Sangue secco appena calpestato: la suola è stata parzialmente mascherata per renderla disponibile ad altre prove



Figura 87 – La stessa suola della figura precedente dopo un'ora di marcia

DISCUSSIONE

Questioni sul metodo di sperimentazione

Nel corso delle operazioni peritali vi sono stati alcuni momenti di confronto con i consulenti delle parti, circa il miglior metodo utilizzabile per l'esecuzione degli esperimenti. In particolare, il c.t. cap. Marino ha proposto (anche per iscritto) di effettuare una serie di esperimenti, che non abbiamo ritenuto utili, non perché da noi considerati sbagliati, ma perché avrebbero comportato tempi di esecuzione tali da superare le concrete possibilità nell'ambito della perizia e soprattutto perché i risultati attesi – pur scientificamente forse pregevoli – avrebbero fornito indicazioni solo di ordine generale e teorico, non potendosi comunque riprodurre le numerosissime circostanze variabili (ed in buona parte a noi ignote) che hanno caratterizzato il caso concreto del quale si discute.

Per fare alcuni esempi, sappiamo che Alberto Stasi dopo l'intervento della forza pubblica nell'abitazione della famiglia Poggi rimase per qualche tempo (ma non sappiamo quanto) sulla strada davanti all'abitazione stessa. In quel frangente, c'è chi lo vide camminare e c'è chi lo vide fermo; non sappiamo se trascinasse i piedi o se li sollevasse ad ogni passo; né sappiamo se avesse magari continuato a strisciare le suole su ghiaietto o se invece fosse rimasto quasi sempre fermo sull'asfalto. Ci è stato riferito che vi fu anche una marcia (quanti passi?) su erba probabilmente bagnata, ma non possiamo valutare l'attendibilità di questa notizia. Non sappiamo con certezza se durante la sua riferita permanenza in casa Poggi il sangue presente sul pavimento fosse già completamente secco oppure no.

Per non parlare del ruolo che possono avere svolto alcuni parametri fisici, come la temperatura dell'asfalto e l'umidità ambientale, sempre per esempio.

In pratica, abbiamo preferito creare dei modelli che potessero essere paradigmatici, verificandone di volta in volta i risultati ed impostando su questi gli esperimenti successivi,

sempre finalizzati a ottenere informazioni utili come riferimento, senza la pretesa di riprodurre esattamente le circostanze del caso in esame.

L'apprezzamento macroscopico del sangue sulle scarpe di Alberto Stasi

Risulta dagli atti che poco dopo l'intervento della forza pubblica ad Alberto Stasi fu richiesto di mostrare le suole delle scarpe che indossava e che non venne osservata la presenza di sangue.

Le nostre sperimentazioni hanno dimostrato come una grossolana evidenza di sangue appaia solo dopo il calpestamento di grosse macchie umide, mentre il calpestamento di gocce (non solo secche, ma anche ancora liquide) dà luogo al più alla presenza di piccole tracce, talvolta visibili ad occhio nudo, ma solo se attentamente ricercate. Inoltre non va dimenticato che i nostri esperimenti sono stati condotti su scarpe con suola bianca, sulla quale la presenza di sangue spicca in modo evidente, mentre le calzature di Alberto Stasi hanno suola scura.

Il fatto che nell'immediatezza non sia stato possibile individuare sangue sulla suola di quelle scarpe ci pare quindi trascurabile.

La sperimentazione effettuata presso il R.I.S. di Parma

I risultati sono noti: dopo calpestamento di sangue descritto come quasi completamente secco⁵³, residuavano sulla superficie della suola delle scarpe utilizzate macchie di sangue macroscopicamente visibili; dopo molte ore, di tale sangue permanevano ancora tracce visibili macroscopicamente (ed evidenziabili con Luminol), con possibilità di estrazione del DNA del donatore.

Il dato è a prima vista suggestivo; tuttavia, negli esperimenti che abbiamo condotto questa situazione si è verificata solo nel caso di calpestamento di macchie umide di dimensioni

⁵³ Vi è stato anche il calpestamento di un ritaglio di moquette, ma dalla relazione di consulenza non si capisce se esso fosse stato preventivamente imbrattato di sangue o meno. Analogamente, non sono comprensibili i risultati ottenuti su pedali e tappetini di auto dopo guida con le scarpe imbrattate di sangue.

ragguardevoli. Questi risultati sono pertanto da interpretare con attenzione e come rappresentazione solo parziale delle varie situazioni prospettabili.

Gli esperimenti effettuati nella perizia

Attribuire ai nostri risultati un significato più che orientativo sarebbe arbitrario.

Una sperimentazione scientificamente pregevole avrebbe dovuto comportare la riproduzione esatta di tutte le condizioni – in gran parte ignote – peculiari del caso concreto. Abbiamo quindi preferito limitare gli esperimenti ad un piccolo numero, in modo tale da avere risultati di significato anche solo orientativo, ma che nel contempo verificassero l'effettiva possibilità del realizzarsi di determinati fenomeni nelle circostanze impostate.

I nostri risultati sono stati discretamente disomogenei, in parte in relazione alle diverse situazioni sperimentali ed in parte probabilmente per effetto del caso.

Il primo dato di rilievo è costituito dalla probabile influenza esercitata dalla particolare geometria che caratterizza le soles di quelle scarpe; esse, nella parte anteriore, sono dotate di pronunciati rilievi disposti a spina di pesce, tra i quali sono situati profondi avvallamenti. Calpestando sangue posto su una superficie liscia, le zone di contatto sono molto limitate, a meno che il sangue non sia raccolto in pozze estese e di un certo spessore. In quest'ultimo caso, una buona parte del sangue non solo imbratta il vertice dei rilievi a spina di pesce, ma si addentra anche nei solchi; il successivo uso delle scarpe con deambulazione su pavimenti lisci non interferisce sulle superfici di questi solchi e riduce solo in minima parte il complessivo imbrattamento.

Nel caso di sangue secco, invece, la cattura da parte delle soles avviene tendenzialmente sotto forma di piccoli frantumi, la cui persistenza dopo l'uso delle scarpe è probabilmente condizionata in larga misura dalla sede ove aderiscono, oltre che dalle caratteristiche dei substrati sui quali avviene la deambulazione.

Nei nostri esperimenti abbiamo osservato che le superfici lisce dei normali pavimenti sono scarsamente adatte a rimuovere il sangue da quelle soles, quando detto sangue sia stato calpestato umido. Le stesse superfici sono in grado di determinare una maggiore dispersione dei residui di sangue, se secco al momento del calpestamento.

Quando la marcia con le scarpe imbrattate avvenga su substrati più vari (nel nostro caso un'ora all'aperto con passaggio su ghiaia), abbiamo osservato in più di un'occasione la completa perdita⁵⁴ del sangue calpestato da secco e in una occasione anche del sangue solo parzialmente essiccato.

In un'altra occasione (Pisa, 23 luglio) abbiamo rilevato persistenza della possibilità di individuare il sangue calpestato in forma umida o parzialmente umida dopo marcia di circa un'ora (non su ghiaia); sulla scarpa che aveva calpestato gocce secche la ricerca di sangue del donatore ha dato invece esito sostanzialmente negativo.

Questi risultati, nel loro complesso, inducono a prospettare l'ipotesi che una azione abrasiva prodotta da substrati irregolari possa essere assai efficace nel rimuovere in breve tempo residui di sangue, anche catturati in forma parzialmente umida, dalle soles di quelle scarpe.

Il dato più significativo a nostro parere è rappresentato comunque dal fatto che l'imbrattamento – salvo che per il caso di grosse pozze liquide – avviene in modo molto disomogeneo, in forma di poche, piccole concentrazioni di materiale, sparse sulla superficie delle soles. È chiaro che il destino di tali piccole concentrazioni non può che essere fortemente condizionato anche dal caso: l'azione abrasiva di un singolo granello di ghiaietto può diventare importantissima perché interferisce non già nel contesto di un'ampia macchia, impoverendola, bensì sull'inezienza di uno dei pochi piccoli residui di materiale presenti sulla suola. Questo fatto, al quale nel caso in esame potrebbe essersi sovrapposta una azione di diluizione e lavaggio del sangue eventualmente ancora presente da parte del calpestamento di erba bagnata, può

⁵⁴ Scriviamo “perdita” solo per semplicità: con questo termine intendiamo l'impossibilità di rilevare presenza di sangue umano e DNA del donatore di tale sangue, quindi assenza di sangue ovvero presenza in quantità inferiori ai limiti di sensibilità dei metodi analitici impiegati.

spiegare la negatività di alcuni risultati anche dei test più sensibili effettuati da noi durante la perizia ed eventualmente quella del test con luminol eseguito dal R.I.S. di Parma sulle scarpe sequestrate ad Alberto Stasi.

Senz'altro determinanti sulla presenza o meno di sangue sulla superficie della suola dopo l'asserito transito di Alberto Stasi in casa Poggi sono state le modalità d'appoggio del piede, la traiettoria seguita e le caratteristiche delle macchie eventualmente calpestate (secche o umide). Di queste variabili abbiamo solo una parziale ed incerta conoscenza. Possiamo escludere in ogni caso che Alberto Stasi abbia calpestato grosse pozze di sangue parzialmente fluido, di consistenza tale da conservare impronte: nell'intera abitazione non sono state osservate impronte riferibili alle scarpe Lacoste, né in forma di calpestamento di macchie, né come "timbrature". Si può escludere inoltre un calpestamento molto ripetuto, anche su gocce secche: nelle prove che abbiamo eseguito, le gocce secche tendevano a conservare il loro aspetto originario dopo singoli calpestamenti, ma quasi invariabilmente dopo dieci pedate presentavano vistose alterazioni, con più o meno ampi distacchi. Ciò significa che un singolo passaggio su una goccia può non aver determinato alterazioni grossolane e che pertanto quanto osservato dagli operanti intervenuti e documentato dalle prime fotografie di sopralluogo è compatibile con l'ipotesi che Alberto Stasi abbia effettuato all'interno dell'abitazione quanto da lui stesso dichiarato. Notiamo in particolare che l'ampia macchia "spugnata" che abbiamo prodotto nel nostro esperimento si è essiccata velocemente, prima delle singole gocce, e non si è alterata macroscopicamente dopo ben dieci energici sfregamenti della scarpa. Le macchie ampie presenti al piano terreno dell'abitazione della famiglia Poggi, per effetto di strisciamento di parti del corpo della vittima, hanno caratteristiche assai simili a quella da noi riprodotta sperimentalmente.

Sul fatto che le macchie presenti sul pavimento fossero già completamente secche nel momento dell'asserito passaggio di Alberto Stasi non abbiamo certezze assolute. Possiamo ritenere questo fatto relativamente probabile sulla base delle fotografie scattate poche decine di minuti dopo, ma in ogni caso abbiamo osservato nei nostri esperimenti come sia possibile una

dispersione completa del sangue calpestato in forma parzialmente umida dopo anche solo un'ora di marcia su substrati vari (si noti che le condizioni sperimentali in cui ci si è posti – dieci pedate su macchie concentrate – hanno per lo più comportato un contatto con il sangue ragionevolmente maggiore rispetto a quello conseguente alla situazione descritta da Alberto Stasi).

Come per quanto riguarda la traiettoria seguita, le modalità della marcia di Alberto Stasi ci sono ignote. Possiamo a grandi linee ritenere che un prevalente appoggio sulla parte anteriore del piede (in corrispondenza della quale la suola presenta, come detto, rilievi a lisca di pesce e quindi minore superficie di contatto con il terreno) avrebbe ridotto le possibilità di cattura del sangue.

Considerazioni non dissimili da quelle sinora esposte possono essere fatte riguardo alle conseguenze del contatto delle scarpe subito dopo il calpestamento del sangue con pedali e tappetini di autovetture. Anche in questo caso i risultati ottenuti sono disomogenei e dimostrano che esiste la possibilità che detto contatto non determini un trasferimento di sangue di entità tale da essere evidenziabile con i metodi specifici utilizzati.

In ultimo, sono di interesse i risultati dell'esperimento condotto marciando con una scarpa imbrattata di sangue sull'erba bagnata.

È stata utilizzata una delle scarpe già usate nel primo esperimento (10 luglio), quella con cui era stata calpestata un'ampia e spessa pozza di sangue liquido. La suola, dopo tre ore di uso su pavimenti lisci, presentava ancora, come già detto, un cospicuo imbrattamento di sangue.

All'inizio dell'esperimento su erba bagnata il sangue era, come è ovvio, completamente secco. Dopo 29 passi, all'esame macroscopico non se ne apprezzava più traccia alcuna. Sono eloquenti a questo proposito le fotografie scattate ogni sette-otto passi (Figg. 81-85), che documentano la progressiva detersione della suola.

Il significato di questo esperimento non è quello di verificare la eventuale completa scomparsa del sangue dopo marcia su erba bagnata, quanto piuttosto di dare una rappresentazione macroscopica di un fenomeno che senz'altro si verifica anche a livello microscopico⁵⁵, determinato dall'indubbia capacità del prato bagnato di lavare il sangue, anche se secco.

In conclusione, le attività sperimentali che sono state condotte documentano l'effettiva possibilità che le scarpe di Alberto Stasi disperdano tracce eventualmente raccolte per calpestamento di limitate quantità di sangue, a seguito di sollecitazioni meccaniche correlate ad un successivo uso delle calzature.

⁵⁵ In ogni caso, la ricerca di emoglobina umana con test immunocromatografico e la caratterizzazione di DNA umano hanno avuto entrambe esito negativo, nella sperimentazione effettuata.

In data 19 agosto 2009 ci è giunta una breve relazione del c.t. Cap. Marino, che alleghiamo alla presente.

L'ampio termine che avevamo concesso ai consulenti per l'invio di commenti sulle questioni trattate in questa parte della perizia era scaduto da una settimana; pertanto discutiamo qui le ultime argomentazioni del Cap. Marino, a margine delle nostre considerazioni.

Leggendo quelle note, non abbiamo motivo per modificare l'impostazione del testo della perizia, poiché a nostro parere esse non sollevano questioni nuove e non discusse precedentemente.

Per quanto riguarda gli esperimenti di calpestio, possiamo dire che:

- L'ipotesi di creare situazioni "estreme" era stata da noi presa in considerazione, come eventualità nel caso in cui le condizioni meno estreme fornissero risultati non utili.
- Al contrario, abbiamo verificato che anche in condizioni tutt'altro che estreme esiste la possibilità di una detersione delle suole sufficiente per determinare negatività dei test.
- La positività al test della tetrametilbenzidina osservata in più occasioni sulle scarpe dopo calpestio di sangue e marcia in ambiente aperto è un dato insignificante: la scarsa specificità del test non consente di riferire tale positività a persistenza di sangue; in alcune occasioni, tra l'altro, il test della tetrametilbenzidina è risultato positivo in corrispondenza di concentrazioni di sporcizia sicuramente raccolta dalle scarpe durante la marcia all'aperto.
- L'aver utilizzato una sola piastrella per il calpestamento da parte di ciascuna scarpa è stata una scelta ponderata e condivisa anche dallo stesso Cap. Marino, che durante le operazioni peritali non ha fatto sul punto alcuna obiezione. In ogni caso, questo modo di procedere rientra nel tentativo di creare situazioni semplici, ben comprensibili e in

qualche modo paradigmatiche, senza avere la pretesa di ricreare le condizioni concrete del caso di cui si discute. Si consideri comunque che in quasi tutte le occasioni il calpestio è stato ripetuto molte volte e che la frantumazione delle gocce secche conseguente alle numerose sollecitazioni ha verosimilmente determinato una maggiore possibilità di “cattura” di residui di sangue da parte delle soles.

- L’aver camminato su un ponte di legno non crediamo possa avere avuto un ruolo particolarmente rilevante. I percorsi scelti (ed in parte dettati dal caso) sono stati comunque utili per creare quelle situazioni paradigmatiche che ci hanno consentito di giungere alle conclusioni sopra riportate.
- Ribadiamo che il test specifico immunocromatografico per l’emoglobina umana è l’unico in grado di documentare la presenza di sangue umano su una determinata superficie. Il test con tetrametilbenzidina, eufemisticamente definito “speditivo”, ha valore solo orientativo. Per meglio spiegarci, possiamo dire che in caso di positività non possiamo sapere quale tra le numerose sostanze dotate di attività perossidasi (tra le quali il sangue, non necessariamente umano) ne sia responsabile; in caso di negatività, dato che la ricerca è effettuata “a campione” sulla superficie, non abbiamo la certezza che in zone non testate non vi sia sangue umano.
- Gli esperimenti condotti su pedali e tappetini di autovetture non hanno dato risultati sempre positivi: dopo calpestamento di sangue secco, il tappetino è risultato luminol-negativo;
- Quanto alla presenza di DNA di Alberto Stasi sulla suola delle sue stesse scarpe, essa è sicuramente in qualche modo sorprendente, ma non per questo deve avere significati particolari. Il fatto che DNA sia presente non ci permette di dire quando esso sia stato trasferito (per esempio nel momento in cui sono state sfilate l’ultima volta).

In data 1 settembre 2009 abbiamo ricevuto una breve relazione del c.t. dott. Capra (datata 31 agosto); anch'essa viene allegata alla presente.

In proposito osserviamo che il dott. Capra fa riferimento ai risultati del test orientativo con tetrametilbenzidina per affermare che nelle varie condizioni sperimentali impostate si sarebbe sempre verificata la persistenza di sangue dopo utilizzo delle scarpe. Come già più volte ribadito, il test ha valore solo presuntivo e inoltre in più di un'occasione la positività si è riscontrata in corrispondenza di accumuli di materiale acquisito durante la marcia.

Non condividiamo inoltre le affermazioni che riguardano la cessione di sangue su pedali e tappetini di autovettura. I risultati che abbiamo ottenuto nei nostri esperimenti non indicano affatto una costante presenza di sangue su questi substrati.

Dott. Fabrizio BISON

Dott. Carlo ROBINO

Dott. Lorenzo VARETTO