

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA,
DELL'AMBIENTE E DELLA VITA (DISTAV)

Classe delle Lauree Magistrali in Biologia LM/6

Corso di Laurea Magistrale in

BIOLOGIA APPLICATA E SPERIMENTALE

CV FORENSE

DALLA RICERCA OTTICA ALLA CONFERMA ANALITICA:
VALUTAZIONE DI UN NUOVO PROTOCOLLO PER LA RILEVAZIONE
DI LIQUIDO SEMINALE NEI CASI DI VIOLENZA SESSUALE

Laureanda:

La Mantia Giulia

6208260

Relatore:

Prof. Barranco Rosario

Correlatore:

Prof. Amaroli Andrea

ANNO ACCADEMICO 2025-2026

RIASSUNTO/ABSTRACT

Nei casi di violenza sessuale, la corretta rilevazione e repertazione delle tracce latenti di liquido seminale costituisce una fase fondamentale per l'isolamento del profilo genetico dell'aggressore e per la ricostruzione della dinamica dell'evento criminoso. Il presente lavoro di tesi si propone di valutare la funzionalità e le prestazioni diagnostiche di una nuova tipologia di dispositivi di campionamento forense non ancora presenti sul mercato, denominati tamponi STK 4N6FLOQSwabs e sviluppati dall'azienda Copan. Tali dispositivi sono stati progettati con l'obiettivo di ottimizzare, velocizzare e semplificare il protocollo tradizionale impiegato nelle indagini di genetica forense per l'analisi e la caratterizzazione delle matrici spermatiche su reperti di interesse investigativo, mostrando una risposta fluorescente visibile diretta quando messi a contatto con il liquido seminale.

La validazione delle performance di rilevazione del dispositivo STK è stata condotta allestendo una curva di diluizione scalare di liquido seminale in acqua priva di acidi nucleici, su cinque differenti concentrazioni. Le aliquote ottenute sono state depositate su vetrini portaoggetti e successivamente campionate mediante i tamponi in esame. Al fine di misurare con accuratezza l'efficacia e la specificità del segnale indotto, è stata eseguita un'analisi comparativa della risposta ottica dei dispositivi sotto luce forense, registrando e documentando i livelli di emissione fluoroforica sia prima del prelievo, per valutare il background basale sul tampone vergine, sia in seguito alla raccolta della traccia biologica.

L'analisi dei risultati ha evidenziato alcuni importanti limiti analitici. In particolare, è stata osservata una fluorescenza intrinseca del tampone vergine che interferisce con il segnale generato dal liquido seminale, riducendo il rapporto segnale/rumore e rendendo più difficile la discriminazione delle tracce, soprattutto alle diluizioni più elevate. Anche in fase di analisi elettroforetica la resa del dispositivo si è mostrata limitata, consentendo l'ottenimento di un profilo genetico parziale solo in corrispondenza dell'aliquote pura.

Nonostante le criticità emerse, l'elaborato fornisce un contributo scientifico per la caratterizzazione dei nuovi dispositivi di campionamento. L'individuazione della fluorescenza di fondo pone le basi per futuri interventi di ottimizzazione tecnologica e di produzione industriale da parte dell'azienda, volti all'eliminazione delle interferenze ottiche e al miglioramento della resa nei protocolli di routine.

La presente attività di ricerca e la relativa fase sperimentale sono state interamente svolte presso il laboratorio accreditato ISO17025 Eurofins Genoma di Milano.

In sexual assault cases, the proper detection and collection of latent seminal fluid traces represent a crucial phase for isolating the perpetrator's genetic profile and reconstructing the crime scene dynamics. This thesis project aims to evaluate the functionality and diagnostic performance of a new type of forensic sampling device not yet available on the market, named STK 4N6FLOQSwabs and developed by Copan. These devices were engineered to optimize, streamline, and simplify the traditional protocol used in forensic genetics for analyzing and characterizing seminal matrices on evidentiary items, displaying a direct visible fluorescent response upon coming into contact with seminal fluid.

The detection performance validation of the STK device was conducted by setting up a scalar dilution curve of seminal fluid in nucleic acid-free water across five different concentrations. The resulting aliquots were deposited onto glass slides and subsequently sampled using the swabs under evaluation. To accurately measure the effectiveness and specificity of the induced signal, a comparative analysis of the devices' optical response was performed under forensic light sources, recording and documenting fluorophoric emission levels both prior to sampling, to evaluate the basal background on the virgin swab, and following the collection of the biological trace.

The analysis of the results highlighted several important analytical limitations. In particular, intrinsic fluorescence was observed in the unused swab, which interfered with the signal generated by seminal fluid, reducing the signal-to-noise ratio and making trace discrimination more difficult, especially at higher dilution levels. The performance of the device was also limited during electrophoretic analysis, allowing the generation of a partial genetic profile only from the undiluted sample.

Despite the critical issues that emerged, the study provides a scientific contribution to the characterization of the new sampling devices. The identification of background fluorescence provides a basis for future technological and manufacturing optimization by the company, aimed at eliminating optical interference and improving the performance of the device in routine forensic workflows.

This research activity and the related experimental phase were entirely carried out at the ISO 17025 accredited laboratory Eurofins Genoma in Milan.

INDICE

INTRODUZIONE	1
1.1 <i>La genetica forense: principi e applicazioni nelle indagini su reati sessuali</i>	<i>1</i>
1.2 <i>La prova biologica nei casi di violenza sessuale</i>	<i>8</i>
1.3 <i>Il liquido seminale: composizione e valore probatorio.....</i>	<i>13</i>
1.4 <i>Metodi tradizionali di diagnosi di natura e loro limiti.....</i>	<i>18</i>
1.4.1 <i>Repertamento e osservazione preliminare</i>	<i>18</i>
1.4.2 <i>Test presuntivi</i>	<i>19</i>
1.4.3 <i>Test confermativi</i>	<i>21</i>
1.4.4 <i>Criticità operative comuni.....</i>	<i>23</i>
SCOPO DELLA TESI	25
MATERIALI E METODI	27
3.1 <i>Caratterizzazione del dispositivo e gestione della matrice biologica</i>	<i>27</i>
3.2 <i>Allestimento della curva di diluizione e protocollo di screening ottico.....</i>	<i>29</i>
3.3 <i>Flusso di analisi molecolare</i>	<i>32</i>
3.4 <i>Estensione del disegno sperimentale.....</i>	<i>39</i>
RISULTATI E DISCUSSIONE	44
4.1 <i>Screening ottico e analisi della fluorescenza nativa</i>	<i>45</i>
4.2 <i>Diagnosi generica e validazione immunocromatografica</i>	<i>50</i>
4.3 <i>Profilazione genetica ed analisi degli elettroferogrammi.....</i>	<i>52</i>
4.4 <i>Valutazione critica delle performance del dispositivo STK 4N6FLOQSwabs.....</i>	<i>59</i>
CONCLUSIONI	62
BIBLIOGRAFIA	64

INTRODUZIONE

1.1 La genetica forense: principi e applicazioni nelle indagini su reati sessuali

La genetica forense è la disciplina che applica le conoscenze e le tecniche della genetica molecolare all'ambito giudiziario, con l'obiettivo primario di identificare individui attraverso l'analisi del DNA presente nei reperti biologici raccolti durante un'indagine. Trova applicazione sia nel diritto penale, dove costituisce uno strumento investigativo e probatorio per l'identificazione degli autori di reati e per il riconoscimento di persone scomparse, sia in ambito civile, per accertare i rapporti di parentela.

Le basi scientifiche della disciplina risalgono alle scoperte di Gregor Mendel nella seconda metà dell'Ottocento e alla successiva identificazione della struttura del DNA da parte di James Watson e Francis Crick nel 1953 (Watson and Crick, 1953). Tuttavia, la nascita della genetica forense moderna viene generalmente fatta risalire al 1984, anno in cui il genetista britannico Alec Jeffreys, presso l'Università di Leicester, osservò l'elevata variabilità interindividuale di alcune regioni genomiche, sviluppando la tecnica di identificazione nota come DNA fingerprinting o "impronta genetica". Questo approccio, il cui impiego operativo ebbe inizio nel 1985, trovò la sua prima e storica applicazione pratica in ambito giudiziario nel 1986 nel Regno Unito per la risoluzione di un duplice omicidio, segnando l'avvio dell'utilizzo sistematico dell'evidenza biologica nelle indagini criminali.

L'importanza della genetica forense è particolarmente evidente nei procedimenti penali relativi a reati di violenza sessuale, dove la prova biologica riveste un ruolo di primaria importanza nell'ambito dell'accertamento tecnico-forense. L'introduzione delle tecniche di biologia molecolare in ambito giudiziario ha profondamente rivoluzionato l'approccio investigativo, consentendo di ottenere informazioni altamente discriminanti anche a partire da quantità minime di materiale biologico rinvenuto sulla scena del crimine o prelevato direttamente da vittime, sospettati e altri soggetti coinvolti nelle indagini.

In questo specifico contesto il corpo della vittima rappresenta esso stesso una scena del crimine primaria (Magalhães et al., 2015), sulla quale possono depositarsi tracce biologiche quali liquido seminale, sangue, saliva, cellule epiteliali di sfaldamento, urine, peli con bulbo pilifero e materiale subungueale, la cui analisi consente non solo l'identificazione genetica dei soggetti coinvolti, ma anche la ricostruzione dinamica dell'evento e la verifica delle

dichiarazioni rese dalle parti, rappresentando spesso un elemento probatorio determinante soprattutto in assenza di testimoni o di altre forme di riscontro oggettivo.

Il substrato molecolare su cui si fonda l'intera analisi genetico-forense è l'acido desossiribonucleico (DNA) (Bukyia et al., 2021), una molecola a doppio filamento antiparallelo composta da unità monomeriche denominate nucleotidi, ciascuna costituita da un gruppo fosfato, uno zucchero pentoso (deossiribosio) e una base azotata (adenina, guanina, citosina o timina). Nel genoma umano il DNA è organizzato in 46 cromosomi e comprende complessivamente circa 3,2 miliardi di coppie di basi, che costituiscono l'intero patrimonio genetico nucleare dell'individuo.

Il principio alla base dell'identificazione genetica risiede nell'unicità del profilo genetico di ciascun individuo, ad eccezione i gemelli monozigoti, che condividono un patrimonio genetico nucleare pressoché identico e rappresentano pertanto uno dei pochi limiti del potere identificativo dell'analisi del DNA. In ambito forense l'attenzione è rivolta al DNA nucleare e, in particolare, a specifiche regioni del genoma caratterizzate da un'elevata variabilità tra gli individui, definite regioni polimorfiche. Tra queste, un ruolo centrale è svolto dalle regioni non codificanti del DNA, che non partecipano direttamente alla sintesi delle proteine ma presentano un elevato grado di variabilità genetica all'interno della popolazione.

I marcatori genetici maggiormente utilizzati nelle analisi forensi sono i microsatelliti, noti anche come Short Tandem Repeats (STR) (Gymrek, 2017), definibili come brevi sequenze di DNA, generalmente costituite da 1 a 6 nucleotidi ripetuti in tandem per un numero variabile di volte in specifiche regioni del genoma. Il numero di ripetizioni presenti in ciascun locus determina l'allele e varia notevolmente da individuo a individuo e proprio questa elevata variabilità conferisce agli STR un elevato potere discriminante, rendendoli i marcatori di elezione per l'identificazione genetica in ambito forense.

La metodica di riferimento (gold standard) per la tipizzazione degli STR è l'elettroforesi capillare, eseguita mediante analizzatori genetici a singolo o multi-capillare, che consente di separare i frammenti di DNA in base alla loro lunghezza all'interno di capillari riempiti con un polimero, mediante l'applicazione di un campo elettrico. Durante la migrazione, lo strumento rileva il segnale di fluorescenza emesso dai singoli frammenti e lo traduce in un elettroferogramma: una rappresentazione grafica in cui ciascun picco corrisponde a un allele. La posizione del picco ne indica la dimensione precisa (espressa in paia di basi), mentre l'altezza e l'area riflettono l'intensità del segnale fluorescente. L'analisi complessiva di questi picchi permette di discriminare gli alleli con estrema accuratezza e di ricostruire il profilo genetico completo del campione analizzato.

Questa fase di separazione è preceduta dalla reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR), una tecnica di amplificazione enzimatica in vitro sviluppata dal chimico Kary Mullis nei primi anni ottanta (Bukyya et al., 2021) che permette di ottenere milioni di copie delle regioni di interesse anche a partire da quantità estremamente ridotte di materiale genetico, rappresentando una delle innovazioni fondamentali che ha reso possibile l'evoluzione moderna della genetica forense.

Nei casi di violenza sessuale, tuttavia, l'interpretazione dei profili genetici può risultare di elevata complessità poiché i campioni biologici (come i tamponi vaginali, cervicali, anali o orali prelevati in sede di visita medico-legale) sono quasi sempre costituiti da una miscela di DNA proveniente da più individui (Hu et al., 2014). In particolare, essi contengono tipicamente un'altissima concentrazione di cellule epiteliali della vittima e una quota proporzionalmente minima di cellule di origine maschile dell'aggressore, principalmente spermatozoi o cellule epiteliali da sfaldamento.

Questa marcata sproporzione quantitativa tra DNA femminile e DNA maschile può raggiungere rapporti anche superiori a 1000:1 e rende spesso difficile, o talvolta impossibile, la corretta tipizzazione del profilo maschile mediante le comuni metodiche STR. In queste condizioni, il DNA femminile tende a prevalere durante l'amplificazione, mascherando il contributo genetico maschile e limitando la possibilità di ottenere un profilo interpretabile. Per superare tale criticità viene comunemente utilizzata la lisi differenziale (differential lysis), una tecnica che sfrutta la maggiore resistenza della membrana nucleare degli spermatozoi all'azione di agenti riducenti e detergenti rispetto alle cellule somatiche. Operativamente, il campione viene sottoposto a una prima lisi all'interno di un tampone non denaturante che determina la rottura selettiva delle sole cellule epiteliali della vittima, liberandone il DNA nella cosiddetta frazione cellulare somatica. Successivamente, il pellet ottenuto tramite centrifugazione, che contiene ancora gli spermatozoi integri, viene sottoposto a una seconda lisi in condizioni chimiche molto più stringenti grazie all'azione combinata del detergente sodio dodecil solfato (SDS) e del ditiotreitolo (DTT); questo agente riducente è essenziale per rompere i ponti disolfuro della membrana cheratinica della testa dello spermatozoo, consentendo così il recupero isolato della frazione di DNA maschile, pressoché priva di contaminazione femminile, da utilizzare come stampo (template) per la successiva fase di amplificazione (Hudson and Dawson Green, 2024).

Qualora la lisi differenziale non consenta una separazione efficace delle frazioni cellulari, situazione ricorrente nei campioni in cui gli spermatozoi siano assenti (ad esempio nei casi di azoospermia), oppure risultino degradati o raccolti a distanza significativa dall'evento,

l'analisi forense può ricorrere alla tipizzazione dei marcatori specifici del cromosoma Y (Y-STR), poiché consente di evidenziare selettivamente la componente genetica maschile.

Il cromosoma Y viene trasmesso esclusivamente per via paterna ed è presente in stato emizigote nei soggetti di sesso maschile, e a differenza della maggior parte del genoma non subisce ricombinazione meiotica se non nelle regioni pseudoautosomiche (PAR1 e PAR2) (Quintana-Murci et al., 2001), caratteristica che determina una forte stabilità della sua trasmissione lungo le generazioni. Questa peculiarità fa sì che gli individui appartenenti alla stessa linea paterna condividano, salvo l'insorgenza di mutazioni, lo stesso aplotipo Y-STR, cioè l'insieme dei marcatori genetici del cromosoma Y trasmessi in blocco dal padre al figlio. Ciò permette di ricostruire le linee di discendenza maschile, ma allo stesso tempo limita la capacità di discriminare tra individui appartenenti alla medesima linea paterna.

I sistemi commerciali attualmente utilizzati per la tipizzazione degli Y-STR, come PowerPlex Y23, Yfiler e Yfiler Plus (Gopinath et al., 2016), permettono l'analisi simultanea di un numero variabile di loci (rispettivamente 17, 23 o 27) in formato multiplex e studi retrospettivi su campioni derivanti da casi di violenza sessuale hanno evidenziato che l'integrazione dell'analisi Y-STR con quella autosomica aumenta significativamente la capacità di ottenere profili informativi, incrementando sia la percentuale di casi interpretabili sia la rilevazione di contributori maschili multipli rispetto alla sola analisi autosomica; in una quota non trascurabile di casi, tale integrazione risulta determinante per giungere a un esito conclusivo.

Ulteriori strumenti di genotipizzazione applicabili in contesti di elevata complessità includono l'analisi degli STR localizzati sul cromosoma X (X-STR), l'impiego dei polimorfismi di singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) e lo studio del DNA mitocondriale (mtDNA). Quest'ultimo (Amorim et al., 2019) assume un ruolo fondamentale nei campioni biologici altamente degradati o a ridotto contenuto di DNA nucleare (come resti ossei, frammenti dentari o capelli privi di bulbo pilifero) grazie all'elevato numero di copie per cellula (da centinaia a migliaia) che gli conferisce una maggiore stabilità.

L'analisi si concentra principalmente sulla regione di controllo (o D-loop), una sequenza non codificante di circa 1.100 coppie di basi caratterizzata da un alto tasso di variabilità dovuto alla presenza di numerosi SNP. Tuttavia, il potere discriminante del mtDNA è inferiore rispetto a quello del DNA nucleare, poiché, essendo ereditato esclusivamente per via materna, viene condiviso dagli individui appartenenti alla stessa linea matrilineare e questa peculiarità riduce la possibilità di attribuire un'identificazione individuale univoca,

ma ne preserva il valore nelle analisi comparative e investigative, soprattutto nei casi in cui il DNA nucleare risulti degradato o non disponibile.

I polimorfismi di singolo nucleotide sono variazioni genetiche determinate dalla sostituzione di una singola base azotata lungo la sequenza del DNA e a causa della dimensione ridotta dei frammenti necessari alla loro analisi, gli SNP costituiscono una classe di marcatori sempre più utilizzata in genetica forense, sia per l'analisi di campioni degradati, sia nell'ambito della fenotipizzazione genetica (Forensic DNA Phenotyping, FDP) (Kayser, 2015) che consente di stimare, a partire dal profilo genetico di un campione ignoto, alcune caratteristiche fenotipiche dell'individuo, quali il colore degli occhi e dei capelli, la tonalità della pelle e l'origine biogeografica.

L'evoluzione più avanzata delle tecniche forensi è però rappresentata dalla tecnologia del Next Generation Sequencing (NGS), denominata anche Massively Parallel Sequencing (MPS) (Pajnic[~], 2026) che a differenza dell'elettroforesi capillare, che fornisce informazioni esclusivamente sulla lunghezza complessiva degli alleli STR, le piattaforme NGS, associate all'impiego di kit dedicati (quali il ForenSeq DNA Signature Prep Kit o il Precision ID Genealogy Panel) permettono di ottenere la sequenza nucleotidica completa di ciascun allele. Ciò rivela la presenza di varianti di sequenza intra-allelica (isoalleli), incrementando sensibilmente il potere discriminante del profilo genetico e consentendo l'analisi simultanea di centinaia di loci in un'unica corsa analitica.

La quantità e l'integrità del DNA estratto dai reperti biologici rappresentano fattori determinanti per il buon esito dell'analisi genetico-forense. L'efficacia delle indagini dipende infatti in modo diretto dalle modalità di repertamento, conservazione e trattamento delle tracce: manipolazioni ripetute, contaminazioni batteriche o stoccaggi inadeguati in contesti ambientali sfavorevoli possono compromettere la stabilità del materiale biologico, riducendone l'amplificabilità e influenzando negativamente la definizione del profilo STR finale. Una volta esposto all'ambiente, il DNA va incontro a rapidi processi degradativi che includono l'azione di nucleasi endogene ed esogene, la deaminazione delle basi azotate, la frammentazione del filamento indotta da radiazioni ultraviolette o ionizzanti, nonché fenomeni ossidativi e rotture della doppia elica causate da valori estremi di pH, temperatura o umidità (Bhoyar et al., 2024). Questi meccanismi determinano una progressiva riduzione della lunghezza e della stabilità dei frammenti di DNA disponibili per l'analisi.

In presenza di DNA fortemente degradato si ricorre spesso ai miniSTR, una variante dei sistemi STR tradizionali in cui i primer sono progettati per legarsi più vicino alla regione

ripetuta, generando così frammenti corti (sotto le 200 paia di basi) che vengono amplificati con molta più facilità ed efficacia nei campioni compromessi.

Per valutare lo stato del DNA prima dell'amplificazione, in ambito forense si usano sistemi di Real-Time PCR (qPCR) come il Quantifiler Trio Kit (Vernarecci et al., 2015), uno strumento che consente di determinare simultaneamente la quantità totale di DNA umano, la quantità di DNA di origine maschile e l'indice di degradazione (Degradation Index, DI), calcolato confrontando la presenza di frammenti corti e frammenti più lunghi.

Alla luce delle criticità legate alla degradazione e alla possibile contaminazione del materiale biologico, la fase di individuazione e campionamento delle tracce assume un ruolo determinante per la riuscita dell'intero processo di analisi genetico-forense. La repertazione deve essere effettuata il più rapidamente possibile rispetto al momento della presunta aggressione, idealmente entro 72 ore, anche se in alcuni casi è stato possibile ottenere profili informativi fino a 5–7 giorni dopo il fatto, a condizione che vengano seguite procedure standardizzate e impiegati kit dedicati, come i Sexual Assault Evidence Kit (SAEK) (Hudson and Dawson Green, 2024).

In questo contesto, lo sviluppo di metodiche e protocolli in grado di preservare l'integrità del materiale genetico fin dalle prime fasi dell'indagine riveste un'importanza fondamentale, soprattutto nei casi in cui le tracce siano limitate o già parzialmente degradate. La gestione della prova biologica si articola in fasi successive (individuazione, repertamento, conservazione e analisi) tutte regolamentate da protocolli standardizzati e conformi a linee guida internazionali, come quelle dell'ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes, 2015) e gli standard ISO/IEC 17025, con l'obiettivo di garantire l'integrità del reperto e la riproducibilità dei risultati. Eventuali errori nelle fasi iniziali possono compromettere in modo irreversibile il materiale biologico, incidendo sull'affidabilità del profilo genetico e sulla sua validità probatoria in sede processuale.

Un ulteriore elemento centrale è rappresentato dalla catena di custodia (chain of custody) (Magalhães et al., 2015), concetto derivato dalla common law anglosassone, che consiste nella documentazione continua e tracciabile di ogni passaggio del reperto: dall'identificazione iniziale, alle modalità di raccolta, ai trasferimenti tra operatori, fino alle condizioni di conservazione e alle analisi effettuate. Qualsiasi interruzione o irregolarità nella catena di custodia può compromettere l'affidabilità del reperto e la sua ammissibilità in sede processuale, rendendolo potenzialmente contestabile dal punto di vista giuridico.

La valutazione del valore probatorio di un profilo genetico richiede l'impiego di un approccio statistico rigoroso, basato sui principi dell'inferenza bayesiana. Lo strumento

principale in questo contesto è il Likelihood Ratio (LR) (Hu et al., 2014), che esprime il rapporto tra due probabilità: da un lato, la probabilità di osservare il profilo genetico trovato sulla scena del crimine assumendo vera l'ipotesi dell'accusa (Hp, cioè che il DNA appartenga all'indagato); dall'altro, la probabilità di osservare lo stesso profilo assumendo vera l'ipotesi alternativa della difesa (Hd, cioè che il DNA appartenga a un individuo non correlato scelto casualmente nella popolazione). Un $LR > 1$ favorisce l'accusa e, di conseguenza, un $LR < 1$ favorisce la difesa.

In termini matematici, per loci autosomici in equilibrio di Hardy-Weinberg, il reciproco del Likelihood Ratio corrisponde alla Random Match Probability (RMP), ossia la probabilità che un individuo selezionato casualmente dalla popolazione presenti esattamente lo stesso profilo genetico (Crow, 1999). Grazie ai moderni pannelli multiplex, che analizzano 20 o più loci autosomici contemporaneamente (Hares, 2015), la RMP raggiunge frequentemente valori estremamente bassi, dell'ordine di 10^{-20} o inferiori, conferendo al DNA uno dei più elevati poteri discriminanti disponibili in ambito identificativo.

Nel caso dei profili Y-STR e Y-SNP, l'approccio statistico è differente. Poiché il cromosoma Y non subisce ricombinazione (ad eccezione delle regioni pseudoautosomiche), non è possibile applicare la regola del prodotto tra loci e di conseguenza, la valutazione della frequenza di un aplotipo si basa su database di riferimento di popolazione, come lo Y Chromosome Haplotype Reference Database (YHRD), che consentono di stimare la frequenza osservata dell'aplotipo nelle diverse popolazioni di comparazione (Willuweit and Roewer, 2015).

La gestione analitica di campioni biologici contenenti materiale genetico proveniente da più individui, mixed DNA profiles, rappresenta una delle sfide più complesse della genetica forense in quanto la difficoltà interpretativa aumenta in modo proporzionale al numero dei contributori e allo squilibrio quantitativo tra le diverse componenti di DNA presenti nel campione. Nei casi di violenza sessuale di gruppo, la risoluzione di questi profili misti richiede spesso l'utilizzo di software di deconvoluzione statistica, quali STRmix (Moretti et al., 2017), TrueAllele o ArmedXpert, che sfruttano modelli probabilistici continui per calcolare la probabilità delle diverse combinazioni genetiche compatibili con il campione, tenendo conto dei difetti e della qualità della traccia biologica.

In situazioni particolarmente complesse possono essere impiegate anche tecniche di separazione fisica del materiale cellulare, come la Laser Capture Microdissection (LCM) (Costa et al., 2017), che permette di isolare singole cellule, ad esempio spermatozoi, da un contesto misto. In questo modo è possibile procedere alla genotipizzazione di contributori

individuali in maniera più diretta, riducendo la sovrapposizione dei segnali genetici. Questo approccio ha trovato applicazione documentata anche in casi caratterizzati dalla presenza di tre o più aggressori, nei quali le sole analisi statistiche di popolazione non risultavano sufficienti a fornire una risoluzione interpretativa univoca.

Il confronto tra i profili genetici ottenuti dai reperti rinvenuti sulla scena del crimine e quelli appartenenti a soggetti noti viene oggi gestito attraverso banche dati del DNA di natura istituzionale, sia a livello nazionale che internazionale. In Italia, tale sistema è stato istituito con la Legge n. 85 del 30 giugno 2009, che ha sancito la creazione della Banca Dati Nazionale del DNA (BDN-DNA) e del Laboratorio Centrale per la gestione delle analisi genetiche, in attuazione degli obblighi derivanti dall'adesione al Trattato di Prüm del 27 maggio 2005 e dalla successiva Decisione del Consiglio dell'Unione Europea 2008/615/GAI.

La normativa consente il prelievo di campioni biologici, effettuato tramite tampone buccale per il reperimento di cellule epiteliali della mucosa orale, nei confronti di soggetti arrestati in flagranza, sottoposti a fermo o a misura cautelare, oppure condannati in via definitiva per delitti non colposi. I profili genetici così ottenuti vengono inseriti nella BDN-DNA e confrontati sia con i profili derivanti da reperti raccolti in scene criminose non risolte, sia con quelli presenti nelle banche dati degli altri Stati membri aderenti al sistema.

A livello pratico, il confronto automatizzato è gestito mediante il software CODIS (Combined DNA Index System), sviluppato dall'FBI e concesso in uso alle forze dell'ordine internazionali. In Italia questo sistema opera su due livelli, dedicati rispettivamente alle ricerche investigative interne e allo scambio di dati con l'estero; quest'ultimo è facilitato dall'allineamento, avviato a partire dal 2017, tra i marcatori genetici usati in Europa (pannello ESS) e negli Stati Uniti (CODIS core loci), che ha garantito un nucleo comune di almeno 12 loci STR condivisi per azzerare il rischio di errori o corrispondenze casuali.

1.2 La prova biologica nei casi di violenza sessuale

Sotto il profilo strettamente giuridico, l'applicazione dell'articolo 609-bis del Codice penale richiede un'attenta valutazione del quadro probatorio, all'interno del quale la prova biologica assume un ruolo di fondamentale importanza non soltanto ai fini dell'identificazione dei soggetti coinvolti, ma anche per la ricostruzione della dinamica dell'evento delittuoso e per la verifica dell'attendibilità delle dichiarazioni rese dalle parti. La giurisprudenza di legittimità ha progressivamente superato la tradizionale distinzione tra la congiunzione carnale (ex art. 519 c.p., comma secondo) e gli atti di libidine, unificandoli

nella più ampia categoria degli “atti sessuali”, e di conseguenza, l'accertamento giudiziario si concentra oggi non tanto sul distretto anatomico interessato, quanto sulla lesione della libertà di autodeterminazione sessuale della vittima, configurandosi il reato ogniqualvolta si realizzi un'invasione della sfera corporea altrui in assenza di un consenso libero e validamente espresso (Cass. Pen., Sez. III, n. 35036/2025).

In questo contesto, il riscontro di macro e micro-tracce biologiche, quali sfregamenti epiteliali o deposizioni di fluidi in sedi atipiche, assume una duplice valenza, poiché da un lato attesta l'effettiva presenza di un soggetto sulla scena del crimine o il contatto fisico intercorso con la vittima, risultando particolarmente rilevanti nei casi in cui l'indagato neghi qualsiasi coinvolgimento; dall'altro possono contribuire alla ricostruzione delle modalità dell'aggressione attraverso l'analisi della distribuzione spaziale delle tracce biologiche. Il rinvenimento di cellule epiteliali saliva, sangue o liquido seminale in sedi anatomiche specifiche può infatti fornire informazioni utili per distinguere tra un contatto occasionale e una condotta sessuale coercitiva, soprattutto nei casi caratterizzati da abuso di autorità, condizioni di vulnerabilità della vittima o stati di alterazione psicofisica indotti dall'assunzione di alcol o sostanze stupefacenti (Cass. Pen., Sez. III, n. 23111/2025).

L'analisi delle evidenze biologiche assume un rilievo cruciale nei procedimenti per violenza sessuale, nei quali l'attività d'indagine si divide in due scenari operativi differenti: il caso in cui l'aggressione provochi il decesso della vittima e quello in cui la persona sopravviva e si presenta presso una struttura sanitaria per ricevere assistenza medica e denunciare l'accaduto.

Nel primo scenario, il corpo assume il ruolo di vera e propria scena del crimine primaria, richiedendo un intervento coordinato tra l'autorità giudiziaria, il medico legale e la polizia scientifica. Gli operatori che accedono per primi sul luogo del fatto devono procedere a una valutazione preliminare della scena, documentando accuratamente la posizione del corpo, degli oggetti circostanti e delle eventuali tracce visibili, al fine di preservare lo stato dei luoghi ed evitare alterazioni che possano compromettere gli accertamenti successivi (Van Oorschot et al., 2019).

Il medico legale, una volta giunto sulla scena, svolge un ruolo fondamentale nella valutazione preliminare del cadavere e prima di qualsiasi manipolazione, procede all'osservazione sistematica del corpo nella posizione in cui è stato rinvenuto, documentando la postura, l'orientamento, l'abbigliamento, la presenza di lesioni evidenti, di tracce ematiche, di fluidi biologici e di eventuali segni riconducibili a colluttazione o violenza sessuale. Particolare attenzione viene riservata all'esame degli indumenti, che possono presentare

strappi, macchie biologiche o alterazioni indicative della dinamica dell'aggressione. Il medico legale valuta, inoltre, i fenomeni trasformativi post-mortali, quali raffreddamento corporeo (*algor mortis*), rigidità cadaverica (*rigor mortis*) e ipostasi (*livor mortis*), al fine di ottenere una prima stima dell'intervallo post-mortale e verificare l'eventuale compatibilità tra la posizione del corpo e la dinamica ipotizzata dei fatti.

Durante il sopralluogo vengono inoltre ricercate e repertate eventuali tracce biologiche presenti sul corpo della vittima, comprese secrezioni genitali, materiale biologico sotto le unghie, capelli, peli pubici estranei o altre evidenze di contatto fisico con l'aggressore (Woollacott et al., 2025). Nei sospetti casi di violenza sessuale, particolare attenzione è dedicata all'esame delle regioni genitali, perigenitali e anali, nonché alla documentazione fotografica di lesioni traumatiche, ecchimosi, abrasioni o lacerazioni che possano essere correlate all'aggressione. Tutte le osservazioni vengono accuratamente annotate e documentate fotograficamente, poiché costituiscono un riferimento essenziale per i successivi accertamenti autoptici e per la ricostruzione medico-legale dell'evento.

Le attività di prelievo e repertamento richiedono tempestività e rigore metodologico, poiché le evidenze biologiche presenti sul cadavere, sugli indumenti e sugli oggetti circostanti possono subire rapidi processi di degradazione a causa dell'azione di agenti ambientali, microrganismi e fenomeni post-mortali (Zupanič, 2025). L'individuazione delle tracce biologiche richiede procedure sistematiche e non invasive, spesso supportate da tecniche di screening preliminare, come l'utilizzo di fonti di luce forense (*Alternative Light Source*, ALS) a diverse lunghezze d'onda o reagenti specifici per l'identificazione presuntiva dei fluidi biologici (Virkler and Lednev, 2009). Una corretta attività di repertamento è essenziale per garantire l'integrità del campione e prevenire fenomeni di contaminazione o degradazione del DNA; per questo motivo, tutte le operazioni devono essere eseguite in conformità con i protocolli standardizzati e le linee guida del Ge.F.I. (Genetisti Forensi Italiani, 2023), che prevedono l'impiego di dispositivi sterili, strumenti DNA-free e adeguate misure di protezione individuale da parte degli operatori.

Nel secondo scenario, la vittima sopravvive all'aggressione e si reca autonomamente presso una struttura sanitaria, generalmente il pronto soccorso, dove riferisce l'accaduto e viene presa in carico secondo protocolli dedicati alla gestione dei casi di violenza sessuale (D.P.C.M. 24 novembre 2017 in G.U. n. 24/2018). In questa fase l'intervento tempestivo è essenziale, poiché il tempo trascorso dall'evento influisce in modo diretto sulla possibilità di recuperare tracce biologiche utili ai fini medico-legali e genetico-forensi.

La gestione clinico-forense prevede, in primo luogo, l'accoglienza della vittima (Du Mont et al., 2009) da parte di personale adeguatamente formato, in un ambiente protetto e riservato, al fine di garantire la tutela della dignità e la riduzione del rischio di ulteriore traumatizzazione. Prima dell'esecuzione della visita medico-legale e delle procedure di raccolta delle evidenze biologiche, è necessario acquisire il consenso informato scritto della vittima, indispensabile per autorizzare gli accertamenti clinici e forensi e il prelievo dei campioni biologici destinati alle successive analisi. Viene effettuata un'anamnesi mirata, condotta da personale medico, durante la quale si raccolgono informazioni essenziali sull'evento, sul tempo intercorso e su eventuali attività svolte dopo l'aggressione (lavaggio e pulizia con detergenti) che potrebbero influenzare la presenza delle tracce biologiche. Segue quindi la visita medico-legale, effettuata secondo protocolli standardizzati e linee guida nazionali e internazionali, che prevede l'utilizzo di kit dedicati (Sexual Assault Evidence Collection Kit, SAECK) (Ladd and Seda, 2023), i quali comprendono materiale sterile e certificato DNA-free per il prelievo di campioni biologici da diverse sedi corporee potenzialmente coinvolte, inclusi tamponi vaginali, cervicali, anali, orali e cutanei, oltre a campioni ungueali e tamponi da eventuali lesioni o aree di contatto. Viene inoltre prevista la raccolta degli indumenti indossati al momento dell'aggressione, che rappresentano una fonte fondamentale di tracce biologiche e di contatto.

Il personale medico che entra in contatto con la vittima deve essere dotato di dispositivi di protezione individuale per evitare contaminazioni, deve assicurare la corretta etichettatura dei campioni con identificativi univoci, e la documentazione dettagliata di ogni fase del prelievo. Ogni reperto viene poi sigillato e conservato in condizioni idonee, generalmente in contenitori traspiranti come buste di carta, per preservarne l'integrità e impedire processi di degradazione del materiale genetico o in provette sterili dedicate. L'identificazione delle prove biologiche in laboratorio rappresenta una fase centrale del processo genetico-forense, in cui le tracce raccolte sulla scena del crimine o in ambito clinico vengono trasformate in dati scientifici utilizzabili per finalità investigative e giudiziarie.

Dopo il ricevimento dei reperti, il laboratorio avvia una serie di procedure standardizzate che comprendono la registrazione del campione, la verifica della catena di custodia (Magalhães et al., 2015) e la valutazione preliminare dello stato del materiale, al fine di escludere contaminazioni evidenti o condizioni di degrado incompatibili con le analisi successive. La prima fase analitica riguarda la ricerca e l'identificazione presuntiva delle tracce biologiche, che avviene inizialmente mediante osservazione ad occhio nudo dei reperti e, successivamente, attraverso l'impiego di luci forensi che consentono di evidenziare

la possibile presenza di fluidi biologici, come sangue, urina, sudore, liquido seminale o secrezioni vaginali, i quali possono manifestare fenomeni di fluorescenza o variazioni cromatiche in seguito all'interazione con specifiche lunghezze d'onda.

Una volta individuata la traccia biologica, si procede al suo prelievo. Qualora le dimensioni e la concentrazione del materiale lo consentano, si raccomanda l'esecuzione di prelievi in duplicato (Pang and Cheung, 2007) per ciascuna area di interesse mediante l'impiego di tamponi sterili. Uno dei campioni viene utilizzato per l'esecuzione dei test presuntivi di natura chimica, biochimica o immunologica, finalizzati a confermare la presenza e la tipologia del fluido biologico rinvenuto. Tali accertamenti preliminari consentono di indirizzare le successive fasi analitiche limitando il consumo del reperto e in caso di esito positivo, il secondo tampone viene destinato alle analisi genetiche.

A tal proposito, le linee guida del Ge.F.I. adottano una precisa scelta strategica poiché l'accertamento della natura della traccia comporta un inevitabile consumo del campione, questa indagine può rivelarsi rischiosa in presenza di materiale fortemente degradato o a basso contenuto di DNA (*Low Copy Number*, LCN) e di conseguenza, la diagnosi di natura non è considerata un passaggio sempre obbligatorio prima dell'analisi genetica. L'unica eccezione in cui tale accertamento diventa un requisito procedurale tassativo riguarda i casi in cui si sospetti la presenza di una miscela biologica contenente liquido seminale. In questo scenario, l'identificazione confermativa dello sperma è fondamentale sia per la scelta della corretta tecnica estrattiva (come l'estrazione differenziale per separare la frazione spermatica da quella epiteliale), sia per la successiva interpretazione del profilo genetico misto.

Al di là degli aspetti strettamente di laboratorio, la determinazione della natura della traccia risponde a un'esigenza ricostruttiva e probatoria di primaria importanza. Se la tipizzazione genetica risponde al quesito "a chi appartiene il DNA" (identificazione individuale), la diagnosi di natura risponde al quesito "attraverso quale fluido e con quale modalità il DNA si è depositato". In molte fattispecie di reato (come casi di violenza sessuale su minori, maltrattamenti in famiglia o reati commessi tra conviventi o soggetti legati da relazioni intime pregresse) la sola presenza del profilo genetico dell'indagato sul corpo o sugli indumenti della vittima non è sufficiente a provarne la colpevolezza, potendo essere giustificata da contatti leciti, occasionali o da un trasferimento secondario di DNA di contatto (*touch DNA*). In tali contesti, dimostrare in modo inequivocabile che il profilo genetico deriva da un fluido specifico (come liquido seminale, sangue o secrezioni vaginali) assume un valore aggiunto decisivo, consentendo di contestualizzare l'evento come un effettivo atto a sfondo sessuale e di smentire eventuali ipotesi difensive alternative.

Completati gli accertamenti preliminari, il campione destinato alla genotipizzazione viene sottoposto al processo di estrazione del DNA, nel quale le cellule vengono lisate per liberare il materiale genetico, che viene poi separato e purificato dagli altri componenti cellulari e dai potenziali inibitori (proteine, lipidi, emoglobina). Successivamente, l'estratto viene quantificato mediante Real-Time PCR (qPCR), una tecnica che consente non solo di determinarne la concentrazione esatta, ma anche di valutarne il grado di degradazione e l'eventuale presenza di sostanze inibitrici, fornendo così le informazioni necessarie per ottimizzare la quantità di DNA da amplificare.

Valutata la qualità e la quantità del campione, si procede alla tipizzazione genetica mediante amplificazione PCR e successiva separazione degli ampiconi in elettroforesi capillare. L'elaborazione dei dati tramite *software* dedicati restituisce l'elettroferogramma finale, permettendo di ricostruire il profilo genetico dei contributori della traccia biologica.

1.3 Il liquido seminale: composizione e valore probatorio

Il liquido seminale rappresenta una matrice biologica complessa e altamente specializzata, costituita da una componente cellulare, rappresentata dagli spermatozoi, e da una componente fluida extracellulare, il plasma seminale, derivante principalmente dalle ghiandole accessorie del sistema riproduttivo maschile, le quali riversano nel canale uretrale un complesso insieme di molecole organiche, ioni, enzimi e proteine strutturali. La composizione del liquido seminale riflette l'attività fisiologica di tali strutture ed è caratterizzata da una miscela eterogenea di molecole con funzioni biochimiche e riproduttive specifiche.

Il volume complessivo di un eiaculato umano normale oscilla generalmente tra i 2 e i 5 ml, ed è regolato dal contributo biochimico di tre distretti ghiandolari principali: le vescicole seminali, la prostata e le ghiandole bulbouretrali o ghiandole di Cowper. Le vescicole seminali contribuiscono in maniera predominante, fornendo circa il 60–70% del volume totale attraverso un fluido viscoso, debolmente alcalino (pH ~7.2–7.6), ricco di fruttosio (Toragall et al., 2019), che funge da principale substrato energetico per la produzione di ATP mitocondriale da parte dello spermatozoo, e di prostaglandine, molecole lipidiche che modulano la risposta contrattile della muscolatura liscia uterina e tubarica. In ambito forense, il secreto delle vescicole seminali assume un rilievo cruciale per la presenza di flavine, composti eterociclici dotati di forti proprietà luminescenti: se eccitate da sorgenti di luce forense (Pollitt et al., 2016) a lunghezze d'onda comprese tra 365 e 415 nm, esse emettono

un'intensa autofluorescenza verde-giallastra, permettendo l'immediata localizzazione macroscopica delle tracce latenti su indumenti o superfici. Sotto il profilo strutturale, le vescicole seminali producono le semenogeline I e II (SgI, SgII) (Pang and Cheung, 2007) e la fibronectina, macro-proteine che polimerizzano immediatamente dopo l'emissione, inducendo la coagulazione protettiva dell'eiaculato. La prostata, responsabile di circa il 20–30% del volume totale, secerne un fluido debolmente acido (pH ~6.5) contenente acido citrico, zinco, magnesio e la fosfatasi acida prostatica (PAP). La funzione biologica principale del secreto prostatico è la liquefazione del coagulo seminale, un processo mediato dalla callicreina ghiandolare KLK3, universalmente nota come PSA (Prostate Specific Antigen) o proteina p30 (Hochmeister et al., 1999). Il PSA è una serin-proteasi che idrolizza selettivamente i legami peptidici delle semenogeline, provocando la dissoluzione del gel seminale entro un range temporale di 5–30 minuti dall'eiaculazione, liberando così gli spermatozoi.

Le ghiandole bulbouretrali o di Cowper, infine, rilasciano una secrezione mucoide pre-eiaculatoria ricca di glicoproteine ad alto peso molecolare che lubrifica il canale uretrale e ne neutralizza l'acidità residua dovuta al transito urinario, ottimizzando la protezione degli spermatozoi durante il transito.

Nelle indagini forensi, la diagnosi di natura sul materiale biologico sospetto segue un approccio gerarchico che discrimina i test presuntivi dai test di confermativi. Storicamente, il primo screening biochimico si è basato sulla ricerca della fosfatasi acida prostatica (PAP) mediante il saggio colorimetrico alla brentamina, in cui l'enzima idrolizza il substrato α -naftilfosfato e il prodotto reagisce con un sale di diazonio generando un viraggio cromatico verso il viola intenso. Sebbene rapido, il test soffre di cross-reattività con le fosfatasi acide di origine vaginale, batterica o vegetale, rendendolo puramente presuntivo. La certezza diagnostica si ottiene attraverso due vie alternative o complementari: la rilevazione immunocromatografica di proteine tessuto-specifiche o l'osservazione microscopica degli spermatozoi. A tal proposito, i moderni kit a flusso laterale come Seratec® PSA SemiQuant o RSID™-Semen, sfruttano anticorpi monoclonali mirati per rilevare l'antigene PSA o le semenogeline (Old et al., 2012); tra queste, la semenogelina viene oggi considerata un marcatore più specifico rispetto al PSA, poiché quest'ultimo può essere secreto in tracce anche nel fluido vaginale, nel siero e nelle urine femminili, sebbene a concentrazioni infinitesimali rispetto al liquido seminale umano. Nei campioni privi di cellule, come il liquido seminale acellulare da soggetti azoospermici, vasectomizzati (Sensabaugh, 1978) o a causa di una severa degradazione termica ed enzimatica, l'analisi dei soli biomarcatori

proteici rappresenta l'unica via per confermare la natura della traccia. La frontiera diagnostica attuale sta superando i limiti immunologici grazie all'analisi dell'RNA tessuto-specifico (mRNA e miRNA profiling) (Zubakov et al., 2010) e attraverso la RT-qPCR o il sequenziamento massivo, viene quantificata l'espressione di trascritti specifici del testicolo e della prostata (es. *PRM1*, *PRM2*, *TGM4*), permettendo di distinguere con assoluta certezza il fluido seminale da altre matrici biologiche anche in campioni altamente degradati o in miscele complesse.

Dal punto di vista genetico, lo spermatozoo maturo rappresenta la matrice d'elezione per l'isolamento e la tipizzazione del DNA nucleare maschile. La cellula è una struttura altamente polarizzata e idrodinamica, suddivisa morfologicamente e funzionalmente in tre segmenti principali: la testa, il colletto (la porzione intermedia) e il flagello (la coda).

La testa racchiude due strutture fondamentali: l'acrosoma e il nucleo aploide. L'acrosoma è una vescicola a forma di cappuccio che copre i due terzi anteriori del nucleo; essa deriva dall'apparato di Golgi durante la spermiogenesi e racchiude enzimi idrolitici (tra cui acrosina, ialuronidasi e neuraminidasi) indispensabili per la digestione della zona pellucida dell'ovocita durante la reazione acrosomiale. Al di sotto dell'acrosoma risiede il nucleo aploide, il quale contiene 23 cromosomi (22 autosomi e un singolo cromosoma sessuale, X o Y), quantificabili in circa 1.65×10^9 coppie di basi (pari alla metà del corredo diploide somatico, che si attesta a circa 3.3×10^9 bp) (Morton, 1991).

Dal punto di vista chimico, il nucleo dello spermatozoo ha una caratteristica unica rispetto a tutte le altre cellule: è più solido, compatto e resistente. Durante la fase finale della spermiogenesi (la spermiotilosi), l'intera architettura cromatinica subisce un radicale rimodellamento molecolare finalizzato a ridurre al minimo il volume nucleare per favorire l'idrodinamicità della cellula e a proteggere il messaggio genetico da fattori chimici, fisici o biologici esterni che lo possono danneggiare (Ribas-Maynou et al., 2022). Questo processo si articola attraverso la sostituzione sequenziale degli istoni somatici prima con le transition proteins (TP1 e TP2) e, infine, con le protamine (P1 e P2) (Balhorn, 2007), piccole proteine nucleari (circa la metà delle dimensioni di un istone) caratterizzate da un punto isoelettrico fortemente basico dovuto all'elevata concentrazione di residui di arginina, la quale, grazie alle sue cariche positive, neutralizza i gruppi fosfato (carichi negativamente) dello scheletro del DNA, annullando le repulsioni elettrostatiche e permettendo un ripiegamento ultracompatto dei filamenti in strutture toroidali anziché nei classici nucleosomi somatoidi.

Oltre all'arginina, le protamine sono ricche di residui di cisteina. Man mano che lo spermatozoo transita e matura nell'epididimo, i gruppi sulfidrilici ($-SH$) delle cisteine

adiacenti subiscono un processo di ossidazione guidato, che porta alla formazione di una fitta ed estesa rete tridimensionale di ponti disolfuro inter- e intra-catena (-S-S-). Questa transizione biochimica induce un grado di compattazione della cromatina spermatica circa sei volte superiore a quello riscontrabile in una comune cellula somatica, trasformando il nucleo in una struttura cristallina, quasi del tutto disidratata e altamente idrofobica.

Tale architettura molecolare conferisce al DNA aploide dello spermatozoo una straordinaria resistenza all'autolisi enzimatica, agli stress meccanici e alla degradazione ambientale. È proprio questa barriera chimica a permettere l'applicazione della lisi differenziale (Gill et al., 1985), consentendo la rottura selettiva delle membrane delle cellule epiteliali somatiche mediante detergenti deboli, mentre il nucleo dello spermatozoo rimane integro fino all'aggiunta di un agente riduttore forte come il ditionitrito (DTT).

La porzione intermedia (o colletto) funge da centrale energetica dello spermatozoo in quanto essa ospita la guaina mitocondriale, una struttura elicoidale formata da circa 50-75 mitocondri disposti attorno all'assonema centrale. Questa guaina racchiude centinaia di copie di DNA mitocondriale e sotto il profilo biologico ed evolutivo, questo DNA è caratterizzato da un'ereditarietà strettamente matrilineare. Sebbene lo spermatozoo introduca i propri mitocondri all'interno dell'ovocita durante la fecondazione, la guaina mitocondriale paterna viene marcata selettivamente con ubiquitina all'interno dello zigote e precocemente distrutta attraverso via autofagica (mitofagia) nelle prime fasi dello sviluppo embrionale. Ai fini delle indagini forensi identificative individuali, il contributo genetico seminale utile risiede esclusivamente nel compartimento nucleare della testa. L'analisi del mtDNA estratto da una macchia di liquido seminale rifletterebbe unicamente l'aplotipo mitocondriale dell'aggressore, strumento utile in caso di marcata degradazione del DNA nucleare ma dotato di un potere discriminante nettamente inferiore rispetto ai loci STR autosomici.

Infine, la coda (o flagello) è costituita dall'assonema, una struttura microtubulare altamente conservata basata sulla configurazione di nove coppie di microtubuli periferici disposte attorno a una coppia centrale, stabilizzata da bracci di dineina e raggi radiali che consumano l'ATP prodotto nel colletto per generare il movimento flagellare (Inaba, 2011). Sebbene la coda contenga prevalentemente strutture proteiche strutturali (come le fibre dense esterne) e sia priva di materiale genetico nucleare, la sua osservazione morfologica al microscopio ottico tramite colorazioni istochimiche specifiche (come la colorazione di Christmas Tree) rappresenta il test di certezza visivo (Allery et al, 2001) fondamentale per confermare la presenza di liquido seminale in un reperto. Nel tempo, tuttavia, la coda tende a distaccarsi precocemente dalla testa a causa di stress meccanici o fenomeni putrefattivi;

per tale ragione, i biologi forensi concentrano la ricerca microscopica sulle teste isolate, la cui persistenza nei distretti intimi della vittima (fino a 72 ore in sede vaginale e oltre in sede rettale) è garantita proprio dalla robustezza del nucleo protaminizzato.

Quando l'analisi dei sistemi polimorfici autosomici eseguita con kit multiplex standard quali ad esempio GlobalFiler™ (Thermo Fisher Scientific) o PowerPlex® Fusion 6C (Promega) fallisce a causa del fenomeno del mascheramento allelico, in cui il profilo della vittima supera quantitativamente il contributo maschile oltre il rapporto critico di 1000:1, l'analisi del cromosoma Y diventa la via d'elezione. Il cromosoma Y è un acrocentrico di piccole dimensioni (circa 60–65 Mb), che rappresenta poco più del 2% del genoma aploide maschile. La sua organizzazione strutturale descrive una marcata asimmetria funzionale e morfologica, divisa tra le regioni pseudoautosomiche (PAR1 e PAR2) e la regione non ricombinante (NRY / MSY) (Rappold, 1993). Collocate rispettivamente all'estremità terminale del braccio corto (Yp) e del braccio lungo (Yq), le regioni pseudoautosomiche rappresentano le uniche porzioni omologhe al cromosoma X, infatti, durante la profase della meiosi I maschile, le regioni PAR sono obbligate ad appaiarsi con le corrispondenti regioni dell'X per garantire la corretta segregazione dei gonosomi. In particolare, la PAR1 mostra un tasso di crossing-over e una frequenza di ricombinazione meiotica insolitamente elevata, circa venti volte superiore alla media autosomica e i marcatori situati nelle PAR non seguono un'ereditarietà patrilineare, ma mostrano un assortimento di tipo autosomico.

La regione non ricombinante, che costituisce il 95% della lunghezza complessiva del cromosoma ed è compresa tra le regioni PAR1 e PAR2, non partecipa ad alcun fenomeno di ricombinazione meiotica e viene trasmessa in blocco come un unico e stabile aplotipo lungo la linea genealogica paterna (Skaletsky et al., 2003). Dal punto di vista strutturale, questa porzione si configura come un mosaico eterogeneo di eterocromatina costitutiva ed eucromatina, dove la prima, localizzata prevalentemente sul braccio lungo nella banda Yq12, si presenta priva di geni funzionali, altamente condensata, ricca di DNA satellite ripetitivo e soggetta a marcate variazioni di lunghezza polimorfica su base individuale. Al contrario, la frazione eucromatica racchiude al suo interno le unità trascrizionali fondamentali sia per il differenziamento sessuale primario, diretto dal gene *SRY*, sia per il corretto svolgimento della spermatogenesi, regolata dai fattori *AZF* (*Azoospermia Factor*).

L'insieme degli alleli osservati sul cromosoma Y costituisce un aplotipo, il quale viene ereditato fedelmente da tutti i membri maschili dello stesso nucleo familiare patrilineare (padre, figli, fratelli, nonno paterno), pertanto tale condivisione tra parenti maschi rappresenta il principale limite intrinseco dell'analisi Y-STR classica, in quanto non

consente di distinguere l'indagato da un suo consanguineo in linea paterna. Per superare questa limitazione, la ricerca scientifica ha introdotto i *Rapidly Mutating Y-STR* (RM Y-STR) (Ballantyne et al., 2014), un sottogruppo di 13 loci STR (tra cui *DYF387S1*, *DYS576*, *DYS612*) caratterizzati da un tasso di mutazione eccezionalmente elevato, superiore a 10^{-2} mutazioni per locus per generazione, rispetto al tasso standard degli STR classici (pari a circa 2×10^{-3}). La frequenza di mutazione dei loci RM è tale da indurre variazioni alleliche tra padri e figli o tra fratelli maschi in oltre il 20–30% dei casi, restituendo al cromosoma Y un potere discriminante quasi individuale e risolvendo incertezze identificative altrimenti irrisolvibili in casi di violenza sessuale con sospetti consanguinei.

1.4 Metodi tradizionali di diagnosi di natura e loro limiti

La diagnosi di natura del liquido seminale si articola in una sequenza di fasi analitiche progressivamente più specifiche: osservazione preliminare della scena e individuazione delle tracce, applicazione di test di orientamento diagnostico (presuntivi) e successiva conferma. Questi metodi costituiscono lo standard operativo nei laboratori forensi, pur presentando alcune limitazioni sia biologiche che operative di seguito analizzate.

1.4.1 Repertamento e osservazione preliminare

Il repertamento delle tracce biologiche rappresenta la fase operativa iniziale e condiziona in modo determinante l'esito di tutte le analisi di laboratorio successive. Le aree sospette vengono individuate macroscopicamente sulla scena del crimine o direttamente sugli oggetti mediante sorgenti di luce forense nell'intervallo tra 350 e 560 nanometri, all'interno dello spettro ultravioletto-visibile, in combinazione con occhiali e lenti barriera dotate di cutoff a 520–550 nanometri. La fluorescenza osservata durante questo screening ottico è determinata dall'eccitazione di specifici fluorofori endogeni, la cui struttura molecolare viene tuttavia progressivamente modificata dai processi degradativi post-emissione. Nel plasma seminale, la risposta fotonica è riconducibile alle elevate concentrazioni di flavine, colina e precursori della porfirina, i quali contengono sistemi di doppi legami coniugati eccitabili a specifiche lunghezze d'onda (Virkler and Lednev, 2009). Nella saliva e nelle secrezioni vaginali, la luminescenza è invece mediata da componenti proteiche, come amilasi e mucine, nonché dai metaboliti della flora batterica locale, che manifestano proprietà fluorescenti nell'ultravioletto vicino (De Beijer et al., 2018).

L'ispezione ottica sconta tuttavia limiti intrinseci di selettività. Poiché l'eccitazione fotonica non è una prerogativa esclusiva della frazione seminale, risposte luminose analoghe possono essere emesse sia dalle altre matrici organiche citate (oltre a sudore e muco), sia da composti chimici industriali come detergenti domestici, fibre sintetiche e sbiancanti ottici tessili. La sovrapposizione di questi segnali spettrali genera inevitabili falsi positivi, imponendo la necessità di successivi accertamenti di laboratorio.

La sensibilità di questa tecnica di screening è inoltre inversamente correlata all'invecchiamento del reperto, poiché la degradazione ossidativa e fotolitica dei fluorofori, accelerata dall'esposizione alla radiazione ultravioletta solare, al calore e a tassi elevati di umidità, innesca infatti fenomeni fisici di *quenching* (spegnimento) chimico-ambientale, in cui l'ossigeno atmosferico e i radicali liberi sottraggono energia allo stato eccitato della molecola, riducendo progressivamente l'intensità del segnale emesso e ostacolando la localizzazione di tracce storiche (Lakowicz, 2006). A queste variabili si aggiungono le interferenze ottiche del substrato, frequenti nei tessuti moderni che assorbono l'energia luminosa nello stesso spettro di eccitazione delle sorgenti forensi, o in supporti polimerici scuri (come nylon o poliestere nero) in cui si verifica un trasferimento energetico per risonanza (FRET) che annulla visivamente il contrasto della macchia (Stoilovic, 1991).

Per integrare l'ispezione ottica in casi di bassa riflettanza o su substrati complessi, il repertamento può prevedere l'applicazione topica di coloranti chimici come il Blu di Metilene o la fluoresceina, volti a evidenziare le componenti proteiche del plasma seminale. Nonostante il miglioramento del contrasto visivo, l'introduzione di tali reattivi comporta una parziale alterazione del campione a causa della loro spiccata affinità elettrostatica per gli acidi nucleici. Il Blu di Metilene, ad esempio, agisce come agente intercalante tra le coppie di basi del DNA, alterandone la temperatura di fusione (*melting*) durante la denaturazione termica nella PCR (Tuite and Kelly, 1993). Inoltre, la presenza residua di questi coloranti nel lisato cellulare satura i siti di legame delle membrane di silice nei sistemi di purificazione automatizzata, riducendo la resa dell'estrazione (Opel et al., 2010) o disattivando direttamente il sito attivo della *Taq* Polimerasi, con il rischio di generare fallimenti nell'amplificazione (*locus drop-out*) (Bessetti, 2007).

1.4.2 Test presuntivi

I test di screening biochimici e immunologici hanno la funzione di guidare l'operatore nella selezione accurata delle aree da sottoporre a successiva validazione genetica, ottimizzando il campionamento ed evitando la campionatura massiva dei reperti. Per

comprendere l'efficacia e i limiti di questi strumenti, è necessario esaminarne il principio molecolare, il quale si basa principalmente su due diverse architetture analitiche: l'immunocromatografia a flusso laterale (*lateral flow assay*, LFA) per il rilevamento di antigeni specifici come il PSA o la semenogelina, e le reazioni enzima-substrato per la rilevazione della fosfatasi acida prostatica (PAP).

I moderni dispositivi immunocromatografici sfruttano la capillarità di una membrana di nitrocellulosa accoppiata all'elevata affinità delle interazioni tra anticorpi monoclonali e sito antigenico (*epitopo*). Il processo biochimico inizia nel pozzetto di caricamento, dove la traccia seminale preventivamente solubilizzata entra in contatto con un cuscinetto di rilascio contenente anticorpi mobili coniugati con particelle rivelatrici, generalmente oro colloidale o microsfere di lattice colorato (Posthuma-Trumpie et al., 2009). Questi anticorpi si legano selettivamente al primo epitopo disponibile sul target (PSA o semenogelina), formando un complesso antigene-anticorpo mobile e spinto dalle forze di capillarità, questo complesso migra lungo la membrana fino a raggiungere la linea del test, dove è immobilizzata una seconda popolazione di anticorpi monoclonali diretti verso un epitopo differente e non sovrapponibile della medesima molecola proteica.

Quando il complesso mobile attraversa questa zona, l'antigene viene bloccato in una configurazione fissa, definita "a sandwich", dove la concentrazione locale e la conseguente precipitazione delle particelle d'oro colloidale o di lattice ancorate al sandwich generano il viraggio cromatico visibile (linea del test). Il fluido residuo prosegue poi la sua migrazione fino alla linea di controllo, dove anticorpi anti-immunoglobuline di specie catturano gli anticorpi mobili rimasti liberi, validando la corretta funzionalità del dispositivo.

I test biochimici per la fosfatasi acida prostatica sfruttano invece la capacità di questo enzima di scindere i legami estere tra un gruppo fosfato e un substrato organico all'interno di un ambiente acido con un pH ottimale attorno a 4.8–5.5 (Sensabaugh, 1978). Nel saggio classico alla brentamina, la frazione seminale viene posta a contatto con il substrato artificiale sodio alfa-naftil fosfato affinché la PAP idrolizzi liberando alfa-naftolo, il quale reagisce istantaneamente con un sale di diazonio co-introdotta nel sistema (come la brentamina *Fast Dark Blue* o *Fast Blue B*) attraverso una reazione di accoppiamento diazoico (Davidson and Jalowiecki, 2012). Questo processo sintetizza un azocomposto insolubile che genera un viraggio cromatico dal rosa chiaro al viola scuro, la cui velocità e intensità di transizione, che deve idealmente manifestarsi entro trenta secondi, risultano direttamente proporzionali all'attività enzimatica della PAP presente nel campione.

Nonostante la consolidata utilità, questi protocolli presentano criticità operative e biologiche significative, a partire dalla specificità parziale dei marcatori prostatici. Sebbene la concentrazione di antigene prostatico specifico sia predominante nell'eiaculato, quote rilevabili di questa glicoproteina sono state documentate nelle secrezioni delle ghiandole femminili di Skene, nel tessuto periuretrale, nel latte materno e nel liquido amniotico (Kamenov et al., 2001), una distribuzione ubiquitaria che può generare falsi positivi durante il campionamento intimo effettuato su vittime di sesso femminile (Hochmeister et al., 1999). Analogamente, la comparsa di risultati falsi negativi non consente di escludere categoricamente la presenza di fluido seminale, poiché il segnale biochimico può scendere al di sotto della soglia di rilevabilità analitica in presenza di forti diluizioni della traccia, di un'avanzata degradazione proteolitica della matrice causata da esonucleasi batteriche ambientali, o qualora l'aggressore sia stato sottoposto a interventi di prostatectomia radicale.

Sotto il profilo biochimico, i test immunocromatografici a flusso laterale soffrono inoltre del fenomeno cinetico noto come effetto gancio ad alte dosi (*High-Dose Hook Effect*), dove in presenza di una concentrazione massiva e sovrabbondante di target, comune nel liquido seminale puro, l'eccesso di molecole proteiche satura completamente sia i siti di legame degli anticorpi mobili nel pozzetto, sia i siti degli anticorpi di cattura sulla linea del test. Di conseguenza, l'antigene libero viaggia più velocemente e occupa la linea del test prima che il complesso marcato con oro colloidale possa arrivarvi, impedendo la formazione del sandwich macroscopico (Hoofnagle and Wener, 2009). Questa saturazione chimica produce una falsa banda negativa che può trarre in inganno l'analista, a meno che non si proceda a una preventiva e calibrata diluizione seriale del campione.

A queste limitazioni biologiche si sommano infine la consumazione materiale del reperto, causata dal prelievo fisico e dalla solubilizzazione dell'aliquota di traccia necessaria a bagnare la membrana reattiva, che riduce progressivamente la massa critica di matrice disponibile per l'estrazione, e la natura puramente indicativa del dato ottenuto, che richiede necessariamente ulteriori passaggi di laboratorio per confermare l'esatta identità della matrice, prolungando i tempi investigativi e incrementando i passaggi di manipolazione del target con un conseguente aumento del rischio di contaminazione esogena.

1.4.3 Test confermativi

Il rinvenimento di spermatozoi morfologicamente identificabili costituisce la prova regina della presenza di liquido seminale in sede processuale, poiché queste cellule sono prodotte esclusivamente dall'apparato genitale maschile e la loro rilevazione possiede un

valore probatorio assoluto, non potendo essere attribuita ad alcuna altra sorgente biologica (Davies and Wilson, 1974). Per comprendere come si giunga a questa certezza diagnostica in laboratorio, è necessario esaminare i meccanismi molecolari e fisici alla base delle colorazioni istochimiche convenzionali e dei sistemi fluorogeni avanzati.

Il metodo confermativo classico in campo chiaro, rappresentato dalla colorazione di Christmas Tree (tecnicamente denominata colorazione al Nuclear Fast Red e Picroindigocarmin), che sfrutta la differente affinità dei componenti dello spermatozoo nei confronti di due coloranti somministrati in sequenza (Virkler and Lednev, 2009). Durante la prima fase del saggio, l'uso del Nuclear Fast Red permette di legare selettivamente il DNA del nucleo spermatico, colorando la porzione posteriore della testa di un rosso-scarlatto intenso e lasciando la porzione anteriore acrosomiale di una tonalità rosa più chiara. Successivamente, nella seconda fase, l'applicazione del Picroindigocarmin agisce come colorante di contrasto legandosi alle proteine strutturali del flagello e della porzione intermedia, colorando così la coda di verde o blu-verdastro.

Come evidenziato dall'analisi comparativa condotta da Allery et al. (2001), il netto contrasto cromatico che ne deriva permette al biologo forense di validare con certezza la tipica morfologia dello spermatozoo attraverso l'individuazione della testa ovoidale bicolore rossa e rosa e del flagello verde. Questa colorazione riduce drasticamente il rischio di falsi positivi poiché consente di escludere altri elementi microscopici comuni sulla scena del crimine o nei tamponi vaginali, come spore fungine, lieviti o batteri, che non reagiscono a questa colorazione specifica e assumono una tinta monocromatica e uniforme.

Tuttavia, quando i fattori ambientali accelerano la degradazione biologica provocando il distacco della coda, la ricerca visiva delle sole teste isolate diventa estremamente complessa a causa della sovrapposizione con le cellule epiteliali di sfaldamento della vittima (Vandewoestyne and Deforce, 2010). Per ovviare a tali criticità e incrementare la sensibilità analitica, i moderni protocolli integrano la microscopia avanzata a fluorescenza mediante l'impiego di agenti intercalanti del DNA, quali il DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) o i coloranti della famiglia Hoechst. Sotto il profilo chimico, il DAPI (Karg and Golic, 2018) è una molecola planare idrofobica che penetra attraverso le membrane e si inserisce per via non covalente nel solco minore della doppia elica del DNA, mostrando una preferenza per le sequenze ripetute ricche di basi adenina e timina (A-T).

Il principio di funzionamento di questi sistemi si basa sulla capacità del DAPI di legarsi al DNA e di emettere una brillante luminescenza blu quando viene eccitato da una sorgente di luce ultravioletta (Lakowicz, 2006). Poiché il nucleo dello spermatozoo racchiude un

DNA estremamente compatto rispetto a quello delle cellule somatiche, la concentrazione locale del segnale fluorescente in questa cellula è straordinariamente elevata. Questa differenza permette all'analista di distinguere istantaneamente le teste degli spermatozoi, che appaiono come piccoli ovali brillantissimi, dai nuclei delle cellule epiteliali della vittima, che mostrano invece una fluorescenza più debole e diffusa, ottimizzando i tempi di analisi anche in campioni altamente degradati o con scarsa presenza di liquido seminale.

1.4.4 Criticità operative comuni

I protocolli tradizionali di immunocromatografia e citologia forense presentano una serie di vulnerabilità operative e sistemiche che si ripercuotono direttamente sulle delicate fasi di tipizzazione genetica posizionate a valle del flusso di lavoro. La dinamica di consumazione distruttiva della traccia rappresenta la criticità a maggiore impatto forense, in quanto ogni singolo saggio biochimico di orientamento o l'allestimento di uno striscio microscopico richiede l'asportazione fisica di un'aliquota del reperto e la sua irreversibile solubilizzazione in buffer estrattivi.

Nei campioni caratterizzati da una quantità minima di materiale biologico, catalogati come *Low Copy Number* (LCN), in cui la quantità totale di acido nucleico recuperato si attesta al di sotto della soglia critica di 100–200 picogrammi, l'erosione progressiva della matrice nelle fasi pre-analitiche riduce la massa critica di DNA disponibile per la successiva reazione di PCR (Budowle et al., 2009). Questo deficit quantitativo altera i meccanismi di amplificazione enzimatica, inducendo la comparsa di artefatti nei profili STR autosomici, quali il fenomeno dell'allele *drop-out* (in cui uno dei due alleli di un locus eterozigote non viene amplificato), marcati sbilanciamenti inter-allelici o gli *stutter*, i quali possono superare le soglie di filtro standard. Tali anomalie inficiano l'idoneità del profilo per i confronti investigativi in banca dati o per il calcolo statistico di identità.

A questa problematica si sommano i complessi meccanismi di contaminazione esogena e la gestione dei profili misti asimmetrici. Lo spermatozoo, in virtù del suo assetto aploide, trasporta circa 3,3 picogrammi di DNA nucleare, ovvero la metà esatta rispetto al patrimonio racchiuso in una comune cellula somatica diploide (Butler, 2012). Nei reati di violenza sessuale, la traccia seminale è quasi costantemente immersa in un volume sovrabbondante di secrezioni e cellule epiteliali della vittima; in questo contesto, ogni manipolazione ripetuta del campione aumenta esponenzialmente il rischio di introdurre frammenti di DNA esogeno appartenenti all'operatore o derivanti da fenomeni di *cross-contamination* tra reperti

simultanei, complicando in modo critico l'interpretazione biostatistica delle miscele polimorfiche in sede di calcolo del *Likelihood Ratio* (LR).

Infine, la sensibilità e la robustezza del dato molecolare subiscono l'azione di inibitori chimici ed enzimatici estratti dal substrato o dalle matrici biologiche accessorie. Fattori inibitori non completamente eliminati dai lavaggi, come l'emoglobina derivante da contesti di contemporaneo sanguinamento traumatico, i coloranti acidi dei tessuti d'arredo o degli indumenti, e gli acidi umici nel caso di reperti rinvenuti sul terreno, agiscono bloccando direttamente il sito attivo della *Taq* Polimerasi o sequestrando gli ioni magnesio (Mg^{2+}), cofattori indispensabili per la catalisi (Alaeddini, 2012). Questo blocco chimico mima gli effetti di una falsa degradazione del DNA, compromettendo in modo selettivo l'amplificazione dei loci STR a peso molecolare più elevato (*amplicon drop-out*).

L'insieme di questi limiti evidenzia la stringente necessità, sia ingegneristica che forense, di superare l'approccio sequenziale classico a favore di strumenti diagnostici di nuova generazione, capaci di fondere la diagnosi di natura e il campionamento in un'unica architettura analitica non distruttiva (Bruijns et al., 2016), preservando l'integrità del DNA e azzerando i rischi di contaminazione legati alla manipolazione.

SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi si colloca nell'ambito dell'ottimizzazione delle indagini di genetica forense nei casi di violenza sessuale, ponendosi l'obiettivo di valutare l'efficacia di un metodo diagnostico alternativo per l'identificazione di tracce di liquido seminale che mostri una particolare attenzione alla preservazione del materiale biologico destinato alle successive analisi identificative. L'obiettivo primario della ricerca consiste nella valutazione sperimentale, in fase di pre-commercializzazione, dei nuovi dispositivi di campionamento STK 4N6FLOQSwabs sviluppati dall'azienda Copan.

Tale tecnologia si propone come una soluzione bio-analitica innovativa, finalizzata all'identificazione visiva immediata della traccia seminale direttamente sul supporto di raccolta. Il principio chimico-fisico alla base del dispositivo sfrutta i fenomeni di fluorescenza intrinseca dei componenti del liquido seminale mediante l'eccitazione con una sorgente luminosa idonea nello spettro dell'ultravioletto (UV): a una lunghezza d'onda compresa tra i 330 nm e i 395 nm, il tampone dovrebbe idealmente consentire una discriminazione immediata tra campioni positivi e negativi al fluido biologico. Verificare se questo approccio possa migliorare l'efficienza operativa complessiva, riducendo i tempi analitici e il rischio di consumazione precoce del campione, rappresenta uno degli obiettivi di questa attività di ricerca.

Un ulteriore vantaggio applicativo di questa tecnologia risiede nella possibilità di condurre la fase di screening visivo e la successiva estrazione del DNA a partire dallo stesso identico dispositivo di campionamento. Nei casi in cui la traccia biologica sia esigua o fortemente degradata, la necessità di effettuare test di orientamento preliminari su porzioni o aliquote separate comporta spesso la perdita irreparabile di quote preziose di materiale; poter procedere alla caratterizzazione della traccia e alla successiva lisi cellulare direttamente sullo stesso supporto evita passaggi intermedi di trasferimento, preserva integralmente l'estratto ed elimina il rischio di dispersione del DNA, risultando determinante per il buon esito della genotipizzazione sui campioni a basso contenuto di materiale.

L'introduzione di questa tecnologia nel workflow forense mira a risolvere una delle principali criticità operative nei casi di violenza sessuale, caratterizzati tipicamente dalla raccolta massiva e standardizzata di numerosi tamponi per singolo caso, frequentemente dieci o più dispositivi per i differenti distretti anatomici. L'impiego degli STK

4N6FLOQSwabs è finalizzato a supportare uno screening preliminare (*pre-selection*) direttamente in fase di classificazione dei reperti, permettendo all'operatore di indirizzare le successive fasi di estrazione e tipizzazione del DNA aploipico e autosomico solo verso quei supporti (mediamente due o tre) che mostrano un'effettiva positività. Questo approccio è teorizzato per massimizzare la probabilità di successo nell'ottenimento di profili STR (*Short Tandem Repeats*) idonei al confronto in banca dati (BDN-DNA), minimizzando al contempo i costi transazionali di laboratorio e lo sforzo analitico su campioni privi di interesse investigativo.

Infine, il presente elaborato si propone di analizzare criticamente le prestazioni analitiche e i limiti operativi emersi durante la fase di test dei dispositivi. L'attività sperimentale è stata infatti condotta con l'obiettivo di valutare la specificità e la sensibilità del segnale di fluorescenza, verificando l'eventuale presenza di interferenze o segnali di fondo legati ai materiali costitutivi del tampone (*signal-to-noise ratio*), specialmente in presenza di tracce a bassa concentrazione o ad elevate diluizioni. I dati raccolti intendono così fornire un contributo scientifico utile per l'eventuale ottimizzazione tecnologica dei dispositivi e per il perfezionamento dei futuri protocolli di produzione industriale nel settore del campionamento forense.

MATERIALI E METODI

Le attività sperimentali sono state condotte presso le aree di laboratorio dedicate all'analisi dei reperti forensi, operando in condizioni controllate di luce naturale e artificiale e applicando rigorosi protocolli di prevenzione della contaminazione esogena da DNA. Il disegno sperimentale è stato strutturato per valutare, attraverso una progressione analitica standardizzata, la risposta ottica, la diagnostica immunocromatografica e la profilazione molecolare dei dispositivi di campionamento pre-commerciali STK 4N6FLOQSwabs.

3.1 Caratterizzazione del dispositivo e gestione della matrice biologica

L'attività sperimentale è incentrata sulla validazione e sull'impiego dei dispositivi di campionamento pre-commerciali STK 4N6FLOQSwabs (Copan Group, Brescia, Italia). Dal punto di vista strutturale, questi strumenti sfruttano la tecnologia del tampone floccato (*flocked swab*), in cui una densa matrice di fibre sintetiche di nylon a filamento corto è disposta in modo perpendicolare rispetto al supporto in plastica flessibile tramite deposizione elettrostatica. Questa specifica geometria elimina la presenza della camera interna di assorbimento tipica dei tamponi tradizionali in cotone, mantenendo il materiale biologico campionato adesivo sulla superficie esterna delle fibre per favorire un maggior rilascio.

Anatomicamente, il dispositivo è ingegnerizzato per massimizzare l'ergonomia e la sicurezza durante le fasi di repertamento sulla scena del crimine. Esso si articola in un corpo centrale cilindrico in plastica flessibile, progettato per flettere in modo calibrato sotto pressione e favorire un contatto omogeneo della punta sulle superfici irregolari, e un'estremità apicale floccata. La porzione basale è invece costituita da un elemento in plastica rigida sagomata a doppia funzione: essa agisce sia come impugnatura ergonomica per l'operatore durante il campionamento, sia come tappo ermetico di chiusura del contenitore di custodia. Dal punto di vista metrico, il dispositivo presenta una lunghezza complessiva standard di 150 mm, con un diametro dell'asta flessibile di circa 2.5 mm, mentre la testa floccata mostra dimensioni ottimizzate per il recupero di micro-tracce, caratterizzandosi per una lunghezza della porzione attiva di circa 15 mm e un diametro di 3 mm.

Al fine di garantire l'assoluta integrità dell'evidenza biologica ed escludere fenomeni di contaminazione crociata esogena post-campionamento, ciascun tampone è singolarmente alloggiato all'interno di un tubo di custodia cilindrico in polipropilene trasparente della lunghezza di 160 mm (Figura 1). Il dispositivo è provvisto di un tappo di colore blu, strutturato per consentire un sistema di apertura e chiusura rapido e manovrabile con l'utilizzo di una sola mano, evitando così che l'operatore entri in contatto diretto con il corpo del tampone o con la matrice biologica repertata.

A seguito del prelievo e della registrazione del campione all'interno del sistema gestionale informatico, viene stampata e applicata sulla superficie esterna del tubo un'etichetta identificativa provvista di campi specifici e codice univoco. Tale procedura garantisce la tracciabilità e la catena di custodia del reperto, riportandovi in modo chiaro il codice identificativo del caso, la data di prelievo e la relativa topografia anatomica o di superficie.

La linea STK si distingue, infine, per un trattamento chimico delle fibre che costituiscono la testa del tampone, appositamente progettato per interagire con i costituenti nativi dei fluidi biologici e sviluppare una luminescenza se sottoposto a eccitazione mediante sorgenti luminose forensi (ALS).



Figura 1: Tampone STK 4N6FLOQSwab

Il materiale biologico di riferimento è costituito da un campione di liquido seminale (Figura 2) proveniente da un singolo donatore sano di sesso maschile, interamente

anonimizzato nel rispetto delle normative vigenti in materia di privacy e bioetica per scopi di ricerca scientifica. Subito dopo il prelievo, la matrice biologica è stata trasferita all'interno di una provetta sterile e conservata all'interno di un congelatore alla temperatura costante di -20°C per preservare l'integrità delle componenti cellulari, proteiche e del DNA nucleare fino al momento del suo utilizzo sperimentale.

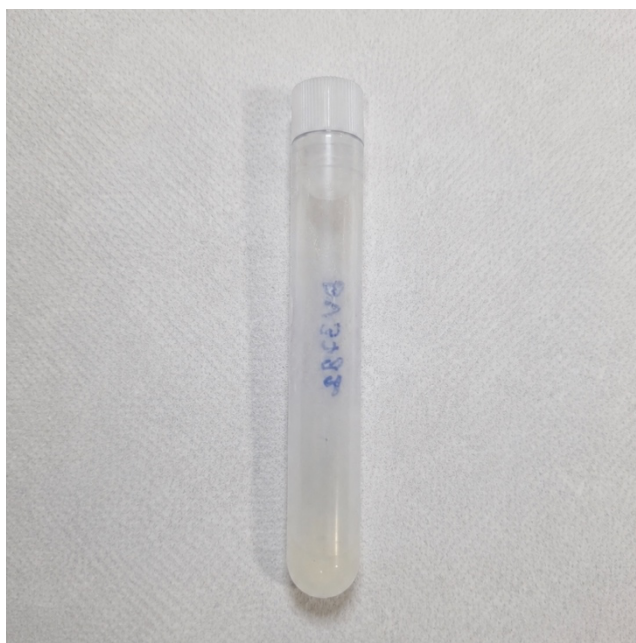


Figura 2: Provetta contenente liquido seminale del donatore

3.2 Allestimento della curva di diluizione e protocollo di screening ottico

Al fine di determinare i limiti di rilevabilità e la sensibilità ottica del sistema, è stata allestita una curva di diluizione scalare a cinque gradienti di concentrazione, utilizzando come diluente acqua priva di DNA di grado molecolare. Il protocollo di diluizione è stato standardizzato secondo i seguenti passaggi operativi:

1. Campione puro 1:1 (SP1): aliquota di liquido seminale non diluito;
2. Diluizione 1:5 (SP2): preparata miscelando 10 μL di sperma puro con 40 μL di acqua priva di DNA, per un volume finale di 50 μL ;
3. Diluizione 1:25 (SP3): allestita mediante diluizione seriale, prelevando 10 μL dalla soluzione 1:5 e addizionandovi 40 μL di acqua molecolare (volume finale 50 μL);
4. Diluizione 1:125 (SP4): allestita prelevando 10 μL dalla soluzione 1:25 e addizionandovi 40 μL di acqua molecolare (volume finale 50 μL);

5. Diluizione 1:625 (SP5): allestita prelevando 10 μ L dalla soluzione 1:125 e addizionandovi 40 μ L di acqua molecolare (volume finale 50 μ L).

Per ciascun gradiente di concentrazione sono state allestite due tracce replicate, depositando un volume fisso di 10 μ L della rispettiva soluzione su vetrini portaoggetti in vetro commerciale, di dimensioni 26 X 76 mm e spessore circa 1 mm (Figura 3). Ciascun supporto, provvisto di un'estremità opaca, è stato preventivamente siglato con il livello di diluizione corrispondente al fine di garantirne l'univoca identificazione e la tracciabilità durante le successive fasi di screening ottico. I campioni così allestiti sono stati lasciati asciugare completamente a temperatura ambiente per favorire la formazione della macchia essiccata.

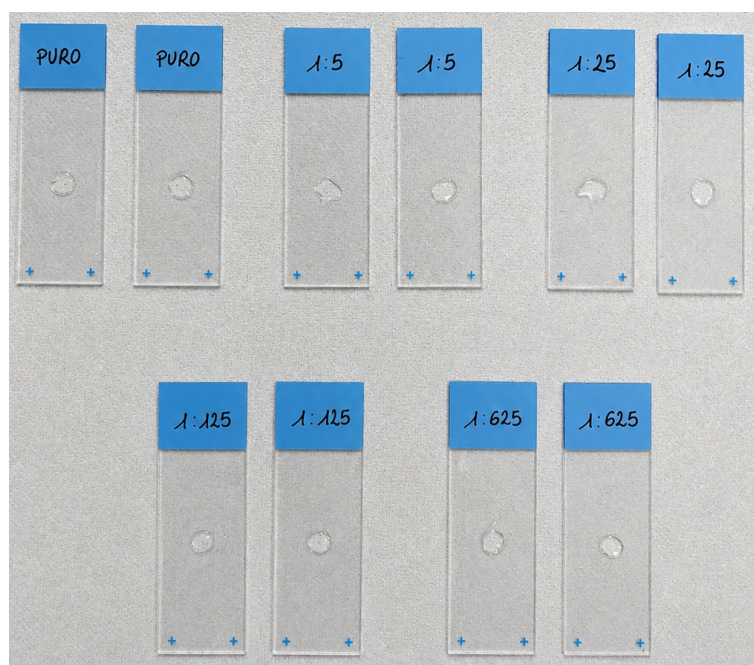


Figura 3: Vetrini portaoggetti allestiti con 10 μ L di campione biologico puro e con le diluizioni seriali (1:5, 1:25, 1:125 e 1:625)

Prima di procedere alla raccolta del materiale biologico, ogni tampone STK 4N6FLOQSwab vergine è stato sottoposto a una verifica ottica preliminare sotto lampada UV a 365 nm per documentare l'eventuale presenza di una luminescenza basale nativa del supporto (*background*). Lo stato di attivazione iniziale dei dispositivi è stato registrato tramite acquisizione fotografica (Figura 4).

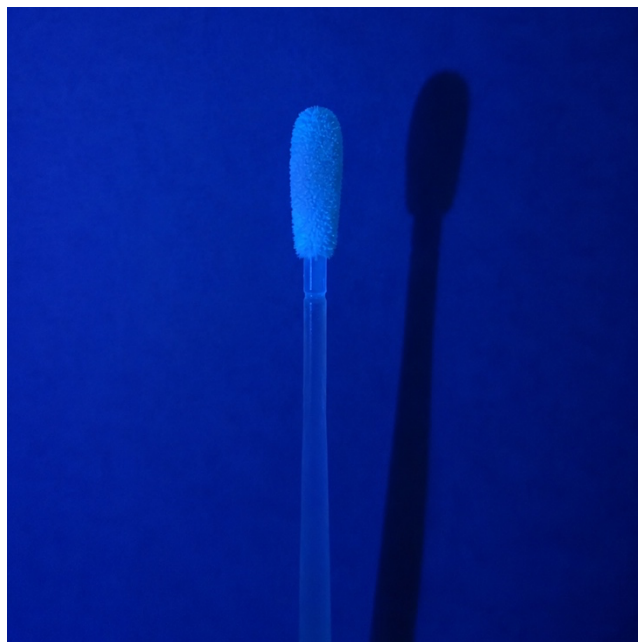


Figura 4: Tampone STK 4N6FLOQSwab vergine sotto luce UV a 365 nm

Il recupero delle tracce essiccate sui vetrini è stato eseguito applicando la tecnica del doppio tampone (*double-swab*), secondo il protocollo descritto di seguito:

1. Un singolo lato della punta del tampone STK è stato preventivamente inumidito con 20 μ L di acqua priva di DNA mediante l'ausilio di una micropipetta, mantenendo il lato opposto della testina completamente asciutto.
2. È stata esercitata un'azione combinata di sfregamento e rotazione sulla traccia del vetrino utilizzando l'estremità inumidita, al fine di solubilizzare e raccogliere la maggior quota possibile di matrice biologica.
3. Immediatamente dopo, il dispositivo è stato ruotato sul lato asciutto per completare l'asportazione del fluido e massimizzare l'efficienza di trasferimento sul supporto d'analisi.

La procedura è stata ripetuta per garantire il campionamento di due replicati per ogni livello di diluizione, consentendo così una successiva valutazione della fluorescenza dei tamponi carichi mediante una nuova esposizione alla sorgente UV a 365 nm in comparazione con i rispettivi controlli negativi, costituiti da tamponi privi di matrice biologica.

3.3 Flusso di analisi molecolare

Conclusa la fase di screening ottico, un set rappresentativo composto da 5 dei 10 campioni totali, identificati con i numeri 1, 3, 5, 7 e 9 e corrispondenti a un singolo tampone per ciascun gradiente della curva di diluizione allestita sui vetrini, è stato avviato alle indagini biomolecolari per verificarne la resa complessiva in termini di acidi nucleici estraibili, è stato applicato il protocollo di estrazione del kit *Qiagen Investigator*, secondo le seguenti fasi operative:

1. Fase di lisi: la matrice di ciascun tampone è stata inserita all'interno di un dispositivo *spin basket* alloggiato in una provetta da 1.5 ml siglata con il relativo codice identificativo.
 - Ad ogni campione sono stati addizionati 400 μ L di *Buffer ATL* e 25 μ L di Proteinasi K.
 - Trattandosi di tracce contenenti liquido seminale, sono stati inseriti direttamente nello *spin basket* anche 10 μ L di DTT, necessari per la rottura dei ponti disolfuro delle membrane degli spermatozoi.
 - Il composto è stato omogeneizzato tramite agitazione su vortex e sottoposto a incubazione a 56C° in un termoblocco per almeno 1 ora.
 - Al termine dell'incubazione, gli *spin basket* sono stati centrifugati a 14000 rpm per 3 minuti per recuperare l'intero lisato, separandolo dalle fibre del tampone.
 - Al surnatante ottenuto sono stati aggiunti 200 μ L di *Buffer AL*; il campione è stato vortexato e incubato a 70C° per 10 minuti, per poi subire una breve centrifugazione a 6000 rpm per 30 secondi.
2. Caricamento su colonnina: al lisato sono stati addizionati 150 μ L di etanolo puro al 100% preraffreddato a -20C°.
 - La miscela è stata omogeneizzata mediante pipettamento con una p1000 e il lisato (fino a un massimo di 720 μ L) è stato trasferito sulla colonnina di purificazione *QIAamp MinElute Column*.
 - La colonnina è stata centrifugata a 8000 rpm per 1 minuto per favorire l'adsorbimento selettivo del DNA sulla membrana di silice, provvedendo poi alla sostituzione del tubo di raccolta di scarto.
3. Fase di lavaggi: sono stati dispensati sulla colonnina 500 μ L di *Buffer AW1*, seguiti da una centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto (con successiva sostituzione del tubo di scarto).

- Sono stati aggiunti 700 μ L di *Buffer AW2*, eseguendo una prima centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto e una seconda a 14000 rpm per 3 minuti (con successiva sostituzione del tubo di scarto).
 - Sono stati addizionati 560 μ L di etanolo al 100% e la colonnina è stata centrifugata a 14000 rpm per 3 minuti per eliminare ogni residuo salino o alcolico. Durante questa fase, sono stati siglati i codici identificativi sulle provette finali da 1.5 ml, nelle quali sono state poi alloggiate le colonnine.
4. Eluizione del DNA: le colonnine sono state lasciate a temperatura ambiente sotto cappa per almeno 10 minuti con il tappo aperto, favorendo la completa evaporazione dei residui di etanolo.
- L'eluizione è stata eseguita dispensando al centro della membrana di silice un volume mirato di 25 μ L di acqua di grado molecolare preriscaldata a 56°C°.
 - Dopo un'incubazione di 5 minuti nel termoblocco, il DNA purificato è stato raccolto mediante due centrifugazioni consecutive: la prima a 8000 rpm per 1 minuto e la seconda a 14000 per 3 minuti.

Contestualmente alla lavorazione dei campioni biologici, ciascuna sessione di estrazione prevede l'allestimento di un controllo negativo di estrazione (*Extraction Negative Control*), il quale viene sottoposto al medesimo iter procedurale al fine di monitorare la purezza dell'intero processo. Ciò consente di escludere la presenza di contaminazioni crociate tra i campioni o introdotte dall'operatore, nonché di attestare la completa assenza di acidi nucleici esogeni nei reattivi, nel materiale monouso e nella strumentazione di laboratorio utilizzata.

Nel kit *Qiagen Investigator*, specifico per l'identificazione umana in ambito forense, ciascun buffer svolge un ruolo chimico preciso e sequenziale volto a isolare, purificare e legare selettivamente gli acidi nucleici alla membrana di silice. Il processo (Figura 5) inizia con il *Buffer ATL*, un tampone di lisi iniziale che lavora in stretta sinergia con la *Proteinasi K* per demolire le membrane cellulari e digerire le proteine strutturali, liberando così il DNA in soluzione; nei protocolli di estrazione differenziale, questo specifico reagente agisce in modo sufficientemente delicato da rompere le cellule epiteliali della componente somatica, preservando al contempo l'integrità degli spermatozoi. Successivamente interviene il *Buffer AL*, la cui formulazione ricca di sali caotropici non solo completa la lisi cellulare residua, ma stabilisce anche le condizioni ideali di pH e forza ionica necessarie a promuovere il legame stabile del DNA alla silice della colonnina, consentendo ai detriti cellulari di essere eliminati. Infine, l'azione di lavaggio è affidata ai *Buffer AW1* e *Buffer*

AW2, i quali contengono etanolo e vengono impiegati rigorosamente in sequenza per eliminare tutti i contaminanti chimici accumulati nei passaggi precedenti, i sali in eccesso e i potenziali inibitori della PCR, dove il *Buffer AW1* effettua una prima rimozione aggressiva delle frazioni proteiche degenerate e il *Buffer AW2* allontana i residui salini finali, preparando la membrana alla completa asciugatura per garantire un eluato purissimo (Qiagen, 2020).

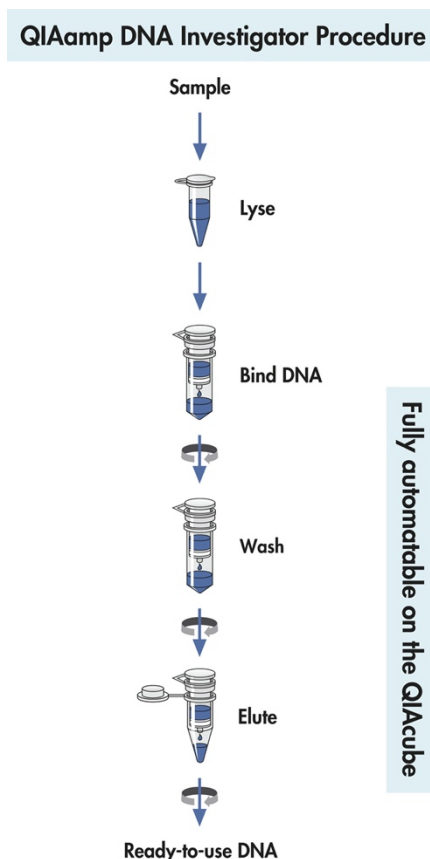


Figura 5: Procedura Qiagen Investigator (Qiagen, 2020)

Al termine della procedura di estrazione e purificazione, il DNA purificato eluito dalla colonna in matrice di silice, è stato sottoposto alla successiva fase di quantificazione (Tabella 1) che consente di valutare non solo l'effettiva concentrazione di materiale genetico recuperato, ma anche di determinare la presenza della sola frazione maschile (target Y) e verificare l'assenza di eventuali inibitori residui della PCR che potrebbero essere sfuggiti alle fasi di lavaggio con i Buffer AW1 ed AW2.

La quantificazione è stata condotta tramite la Real-Time PCR (qPCR), allestendo le reazioni per i campioni in esame (SP1–SP5), per il controllo negativo di estrazione (CNE)

e per gli standard di calibrazione (Std1 e Std2), necessari per l'elaborazione della curva di taratura.

ID Tubo	N° pratica	Concentrazione (small - Y)	V mix	V DNA
Std1	/	/	190	10
Std2	/	/	190	10
1	SP1	0.81 – 0.79	198	2
2	SP2	0.09 – 0.08	198	2
3	SP3	0.004 – 0.005	198	2
4	SP4	0.001 – 0.002	198	2
5	SP5	0.001 – 0.0	198	2
6	CNE	/	198	2

Tabella 1: Foglio di lavoro quantificazione Q-Bit

I risultati ottenuti riflettono l'andamento atteso della curva di diluizione scalare: l'estratto relativo all'aliquota pura (SP1) ha mostrato una concentrazione ottimale (pari a 0.81 ng/μL), mentre si osserva un progressivo e lineare decremento del segnale all'aumentare del fattore di diluizione (SP2–SP5), fino al raggiungimento del limite di sensibilità dello strumento. Parallelamente, la totale assenza di amplificazione nel CNE ha confermato la corretta esecuzione dei passaggi di lisi e lavaggio, garantendo l'assenza di contaminazioni crociate nel processo estrattivo.

Al fine di garantire un'amplificazione ottimale mediante il kit GlobalFile, i campioni estratti sono stati opportunamente diluiti per portare la concentrazione di DNA al valore target di 0.1 ng/μL (all'interno dell'intervallo operativo raccomandato di 0.1 – 0.3 ng/μL). Per la reazione di PCR, è stato prelevato un volume di 7.5 μL da ciascuna diluizione, garantendo così un *input* totale di DNA pari a 0.75 ng per miscela di reazione (Tabella 2).

ID Tubo	Concentrazione	CONC	V DNA	H2O	VOL F
SP1	0.81	0.1	3	-3	0
SP2	0.09	0.1	3	-3	0
SP3	0.004	0.1	3	-3	0
SP4	0.001	0.1	3	-3	0
SP5	0.001	0.1	3	-3	0
CP-PCR	/	0.1	3	-3	0
CN-PCR	/	0.1	3	-3	0
DNA 0.1 – 0.3 ng/μL	7.5 μL				

Tabella 2: Foglio di lavoro diluizioni DNA

Conclusa la stima quantitativa, i campioni di DNA sono stati avviati alla fase di amplificazione molecolare multiplex mediante l'impiego del sistema analitico *GlobalFiler™*, procedendo inizialmente all'allestimento della *master mix* di reazione (Tabella 3) preparata unendo accuratamente la *Master Mix* e il *Primer Set* in un rapporto volumetrico standardizzato pari rispettivamente a 3.75 μL e 1.25 μL per singola determinazione. Il volume di 5 μL di miscela complessiva così ottenuto è stato successivamente dispensato in ciascuna delle provette contenenti i 5 campioni selezionati (SP1, SP2, SP3, SP4 e SP5), a cui sono stati affiancati un controllo negativo di amplificazione (CN-PCR), per monitorare eventuali contaminazioni esogene, e un controllo positivo (CP-PCR) per verificare l'efficienza della reazione (Tabella 4).

	X1	X7
Mix	3.75	26.25
Primer Set	1.25	8.75
Totale	5	35

Tabella 3: Preparazione Master Mix

N° pratica	ID Tubo
SP1	1
SP2	2
SP3	3
SP4	4
SP5	5
CP-PCR	6
CN-PCR	7

Tabella 4: Foglio di lavoro PCR Global Filer

Le provette sono state poi inserite all'interno del termociclatore, strumento dotato di un blocco termico in grado di sottoporre i campioni a cicli ripetuti e controllati di temperatura per guidare le tre fasi fondamentali della reazione: la denaturazione iniziale a 94-96°C per separare le due eliche del doppio filamento di DNA, l'ibridazione (*annealing*) dei primer alle sequenze fiancheggiatrici dei loci STR (condotta a temperature comprese tra 55 e 56°C in base alle specifiche termiche degli inneschi) e, infine, l'estensione del nuovo filamento ad opera della DNA polimerasi termostabile (Taq polimerasi) a 72°C.

Questo processo di replica esponenziale consente di ottenere milioni di copie dei loci STR autosomici e dei marcatori del sesso target; contestualmente, grazie all'impiego di primer coniugati a specifici fluorofori, i prodotti di amplificazione (ampliconi) così generati risultano marcati fluorescentemente, prerequisito fondamentale per la loro successiva separazione in base alla lunghezza tramite elettroforesi capillare (CE) e la conseguente ricostruzione del profilo genetico.

Prima di avviare l'elettroforesi nel 3500 Genetic Analyzer, è stata preparata la miscela di caricamento (loading cocktail, Tabella 5) unendo la formammide deionizzata (Hi-Di Formamide) allo standard di dimensioni GeneScan 600 LIZ v2.0. Ciascun pozzetto della piastra è stato allestito dispensando 10 µL di questa miscela di fondo e addizionandovi individualmente 1 µL di prodotto amplificato del campione, oppure 1 µL di Allelic Ladder, rispettando la mappatura dell'array (Tabella 6).

	X1	X8
HI-DI Formamide	9.6	76.8
Primer Set	0.4	3.2
Totale	10	80

Tabella 5: Foglio di lavoro elettroforesi capillare

ID Tubo	ID campione in plate	Posizione
Ladder GF	Ladder GF	A08
1	SP1	B08
2	SP2	C08
3	SP3	D08
4	SP4	E08
5	SP5	F08
6	CP-PCR	G08
7	CN-PCR	H08

Tabella 6: Posizionamento campioni sulla piastra per l'elettroforesi capillare

La formammide costituisce la componente principale della miscela poiché garantisce il mantenimento del DNA allo stato denaturato (a singolo filamento lineare), impedendo così che i filamenti complementari si appaiano di nuovo o formino strutture tridimensionali che danneggerebbero la qualità della separazione. Lo *Size Standard* LIZ, marcato con un fluorocromo specifico, viene iniettato nel capillare insieme al campione amplificato per fungere da preciso riferimento metrico interno ad ogni singola corsa, consentendo al software di calcolare in modo automatico, oggettivo e accurato la lunghezza esatta (espressa in paia di basi, bp) di tutti i frammenti allelici isolati durante la migrazione.

A completamento dell'allestimento, negli appositi pozzetti della medesima piastra viene inserito l'Allelic Ladder, uno standard esterno costituito da una miscela di tutti i principali

alleli noti per i loci STR analizzati dal kit *GlobalFiler*TM. Mentre lo Size Standard LIZ consente di determinare la lunghezza fisica dei frammenti in paia di basi, fornendo una scala di riferimento interna per la misura delle dimensioni, l'Allelic Ladder risulta indispensabile per la successiva tipizzazione allelica poiché il software confronta le dimensioni dei frammenti amplificati dal campione con quelle degli alleli di riferimento presenti nello standard (migrati nelle medesime condizioni elettroforetiche), permettendo così l'assegnazione della nomenclatura allelica corrispondente basata sul numero di ripetizioni STR presenti in ciascun locus.

Una volta completato l'allestimento dei pozzetti, la piastra viene sigillata e inserita nell'alloggiamento dell'analizzatore genetico per l'avvio della corsa elettroforetica automatizzata. Lo strumento sfrutta un array a otto capillari in silice fusa, all'interno dei quali viene introdotto un polimero di corsa fluido ad alta risoluzione (POP-4TM), che agisce da matrice di setaccio molecolare consentendo la separazione dei frammenti di DNA in funzione della loro lunghezza. L'applicazione di un campo elettrico ad alto voltaggio determina infatti la migrazione dei frammenti attraverso il polimero e, al termine del percorso capillare, questi transitano davanti a una finestra di rilevazione dove vengono eccitati mediante un raggio laser; la fluorescenza emessa dai fluorocromi associati al *GlobalFiler* e allo standard LIZ viene quindi acquisita in tempo reale da una telecamera CCD, che converte i segnali ottici in dati digitali grezzi (raw data) successivamente elaborati dai software dedicati per la generazione e l'interpretazione del profilo genetico.

3.4 Estensione del disegno sperimentale

Nell'ultima fase della sperimentazione, l'intero protocollo d'indagine e campionamento è stato applicato al di fuori delle condizioni ideali e controllate del supporto in vetro, al fine di testare le performance operative dei dispositivi STK 4N6FLOQSwabs su materiale autentico di interesse giudiziario. A tale scopo, l'attività di ricerca ha previsto l'analisi di una porzione di tessuto di rivestimento originale proveniente da un coprisedile automobilistico (Figura 6), effettivamente repertato nell'ambito di un'indagine per il reato di violenza sessuale, sul quale si ipotizzava la presenza di tracce latenti di liquido seminale.



Figura 6: Coprisedile automobilistico

Poiché tali deposizioni biologiche risultavano completamente invisibili a un esame visivo diretto a occhio nudo in condizioni di illuminazione ambientale standard (Figura 7), si è resa necessaria un'attività preliminare di screening e localizzazione topografica, condotta in ambiente oscurato mediante sorgenti di luce forense (ALS) tarate sulla lunghezza d'onda di 365 nm (Figura 8). Questo passaggio ha permesso non solo di mappare l'interferenza ottica e la fluorescenza di fondo nativa della trama tessile sintetica, ma anche di stimare l'effettiva risposta fluoroforica dei costituenti del fluido biologico racchiuso nella traccia reale, consentendo l'esatta individuazione e la successiva mappatura delle aree d'interesse da sottoporre a campionamento.



Figura 7: Traccia n°1 illuminazione ambientale standard



Figura 8: Traccia n°1 visibile sotto luce UV a 365 nm

Una volta identificate e mappate le regioni d'interesse sul tessuto del coprisedile, si è proceduto al prelievo del materiale biologico impostando un'analisi comparativa diretta tra

la metodica tradizionale di routine (4N6FLOQSwabs) e il sistema innovativo (STK 4N6FLOQSwabs).

Al fine di garantire una corretta comparazione dei dati in seguito alle successive fasi di estrazione e amplificazione molecolare, l'area della traccia è stata campionata per prima tramite due tamponi floccati classici (Figura 9) conservati singolarmente in confezioni sterili. Tale ordine cronologico di prelievo si è reso sperimentalmente indispensabile poiché l'impiego immediato del nuovo dispositivo STK, richiedendo una bagnatura preventiva con acqua priva di DNA, avrebbe potuto causare un'indesiderata diluizione o diffusione della traccia biologica pura sul tessuto, alterando la reale concentrazione del reperto a scapito del metodo di routine.



Figura 9: Tampone classico 4N6FLOQSwabs

Successivamente, sul medesimo sito d'interesse, è stato applicato il dispositivo pre-commerciale STK 4N6FLOQSwabs, seguendo il protocollo di bagnatura frazionata e rotazione della punta già descritto per i vetrini portaoggetti. In questa fase, l'ispezione sotto luce forense ha permesso di monitorare la risposta ottica del dispositivo sia in condizioni di verginità, al fine di valutare l'interferenza del background luminescente costitutivo del supporto in nylon, sia in seguito al prelievo della traccia dal copriesedile, per verificare l'effettivo trasferimento della fluorescenza dalla trama tessile alla testa del tampone.

Al fine di confermare la natura biologica del fluido rilevato oltre lo screening puramente fisico della luminescenza, tramite l'uso di uno dei due tamponi 4N6FLOQSwabs, è stato

eseguito il saggio immunocromatografico presuntivo SERATEC® PAM Test per l'individuazione simultanea dell'antigene prostatico specifico (PSA o p30) e dell'alfa-amilasi mediante immunodosaggio a flusso laterale.

Operativamente, la determinazione analitica ha richiesto una fase preliminare di estrazione e solubilizzazione della traccia biologica raccolta dal dispositivo. Una porzione del tampone floccato è stata inserita all'interno di una microprovetta contenente un volume standardizzato di tampone di diluizione (*dilution buffer*) fornito dal produttore. Questo reagente è costituito da una soluzione salina fosfato-tamponata (PBS) formulata a pH 7.4 al fine di preservare l'integrità strutturale degli antigeni, mimare le condizioni fisiologiche ideali per il successivo legame anticorpale e favorire il rilascio immediato delle proteine target dalle fibre di nylon. La presenza dell'azide di sodio all'interno della miscela agisce da agente batteriostatico e conservante, prevenendo la proliferazione microbica e garantendo la stabilità del buffer durante lo stoccaggio. La miscela così allestita è stata omogeneizzata tramite agitazione su vortex e lasciata incubare a temperatura ambiente per un tempo compreso tra i 10 e i 20 minuti, consentendo il trasferimento delle macromolecole proteiche nella fase liquida (Seratec, 2025).

Una volta conclusa l'estrazione, un'aliquota di 120 µL di lisato (corrispondenti a 3-4 gocce) è stata prelevata mediante una pipetta a volume variabile e dispensata all'interno del pozzetto di caricamento della card. Da questo momento, il fluido migra per capillarità lungo i compartimenti reattivi della membrana in nitrocellulosa; gli antigeni eventualmente presenti incontrano gli anticorpi monoclonali mobili coniugati con particelle di oro colloidale, sviluppando la caratteristica reazione immunitaria a "sandwich" che porta alla comparsa delle bande cromatiche in corrispondenza della linea di controllo (C), dell'antigene prostatico specifico (P) e dell'amilasi (A)

RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo vengono presentate, analizzate e discusse criticamente le evidenze sperimentali ottenute nel corso del presente lavoro di ricerca, finalizzato alla validazione operativa e molecolare dei dispositivi di campionamento pre-commerciali STK 4N6FLOQSwabs. L'obiettivo cardine della sperimentazione è stato quello di valutare l'efficacia di questi strumenti innovativi all'interno di un flusso di lavoro (*workflow*) ottimizzato per l'ambito forense, con particolare riferimento ai casi di violenza sessuale e al repertamento di tracce seminali latenti su matrici complesse.

Al fine di garantire una valutazione sistematica e coerente, i risultati del presente studio sono stati organizzati seguendo la stessa sequenza operativa che caratterizza un'indagine di genetica forense; pertanto, l'analisi ripercorre le diverse fasi del protocollo analitico, dall'individuazione della traccia biologica fino alla sua caratterizzazione molecolare.

L'indagine ha avuto inizio con uno screening macroscopico non invasivo del reperto, effettuato mediante l'impiego di sorgenti luminose alternate (ALS), tecnica che consente di individuare e mappare le potenziali tracce biologiche preservandone l'integrità. Una volta localizzate le aree di interesse, si è proceduto alla diagnosi generica attraverso test immunocromatografici, finalizzati alla conferma della natura della matrice biologica mediante la ricerca di specifici marker proteici.

Successivamente, lo studio si è concentrato sulla caratterizzazione molecolare dei campioni, attraverso le fasi di estrazione differenziale automatizzata del DNA, quantificazione, amplificazione mediante PCR e successiva tipizzazione mediante elettroforesi capillare. Questa impostazione metodologica ha consentito di seguire in maniera progressiva l'intero iter analitico, verificando l'efficacia del dispositivo in ciascuna delle fasi che conducono dall'individuazione della traccia biologica all'ottenimento del profilo genetico finale.

I risultati ottenuti hanno permesso non solo di valutare le prestazioni analitiche del dispositivo rispetto al protocollo tradizionalmente impiegato nei laboratori di genetica forense, ma anche di delinearne criticamente le potenzialità applicative e le principali limitazioni emerse nel corso della sperimentazione. Nel loro complesso, tali evidenze costituiscono una solida base per discutere i punti di forza e le criticità del sistema, nonché per valutarne le concrete prospettive di integrazione nei protocolli operativi adottati nell'ambito delle indagini di polizia giudiziaria.

4.1 Screening ottico e analisi della fluorescenza nativa

La fase iniziale della sperimentazione è stata dedicata alla valutazione della risposta ottica dei dispositivi STK 4N6FLOQSwabs mediante l'impiego di sorgenti di luce forense (Figure 10 - 14), con lo scopo di verificare la capacità del trattamento chimico di evidenziare la presenza di tracce biologiche attraverso l'emissione di fluorescenza. In particolare, l'analisi è stata condotta confrontando la fluorescenza dei tamponi vergini, utilizzati come controlli negativi, con quella dei tamponi impiegati per il campionamento di liquido seminale a diverse concentrazioni, al fine di valutare la capacità del dispositivo di distinguere il segnale prodotto dalla traccia biologica dalla fluorescenza di fondo del materiale costitutivo del tampone.

Lo screening è stato eseguito utilizzando due diverse lunghezze d'onda di eccitazione. Dal confronto tra le immagini acquisite è emerso che la luce UV a 365 nm ha prodotto i risultati migliori, consentendo di osservare con maggiore chiarezza la fluorescenza dei campioni e di distinguerla più facilmente rispetto a quella del tampone vergine. L'altra lunghezza d'onda testata (395 nm) ha invece fornito un contrasto nettamente meno marcato, rendendo complessa la discriminazione visiva delle tracce biologiche; per tale ragione, i relativi dati non sono stati inclusi nel presente elaborato.

L'intensità della fluorescenza è stata valutata in modo qualitativo, considerando la facilità con cui il segnale risultava visibile a occhio nudo rispetto al fondo del dispositivo. Questa prima fase ha permesso di verificare l'efficacia dello screening ottico e di individuare l'eventuale presenza di una fluorescenza intrinseca del tampone, aspetto che è stato successivamente approfondito mediante le analisi immunocromatografiche e molecolari.

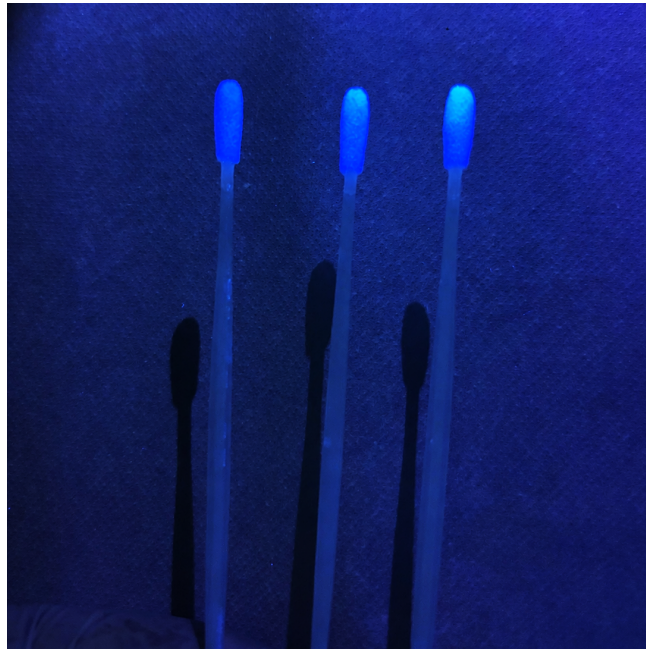


Figura 10: Tampone STK 4N6FLOQSwab vergine a sinistra, tamponi con prelievo di materiale puro al centro (1) e a destra (2)

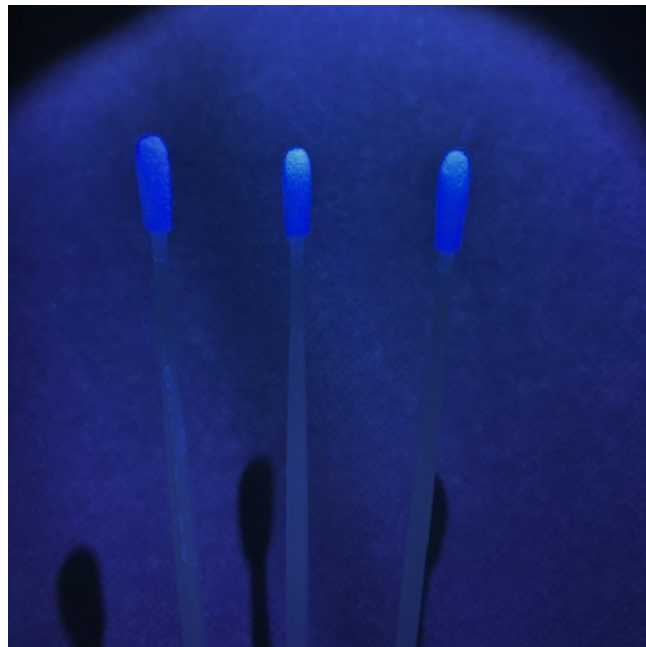


Figura 11: Tampone STK 4N6FLOQSwab vergine a sinistra, tamponi con prelievo di diluizione 1:5 al centro (3) e a destra (4)

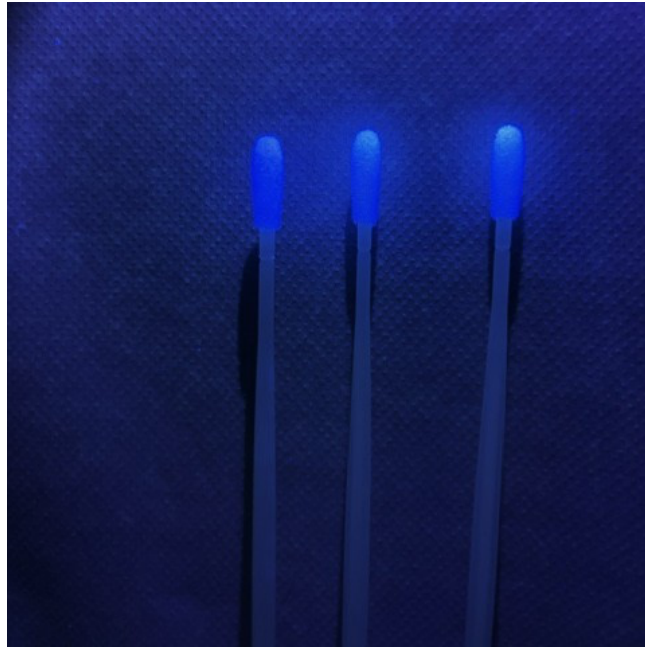


Figura 12: Tampone STK 4N6FLOQSwab vergine a sinistra, tamponi con prelievo di diluizione 1:25 al centro (5) e a destra (6)

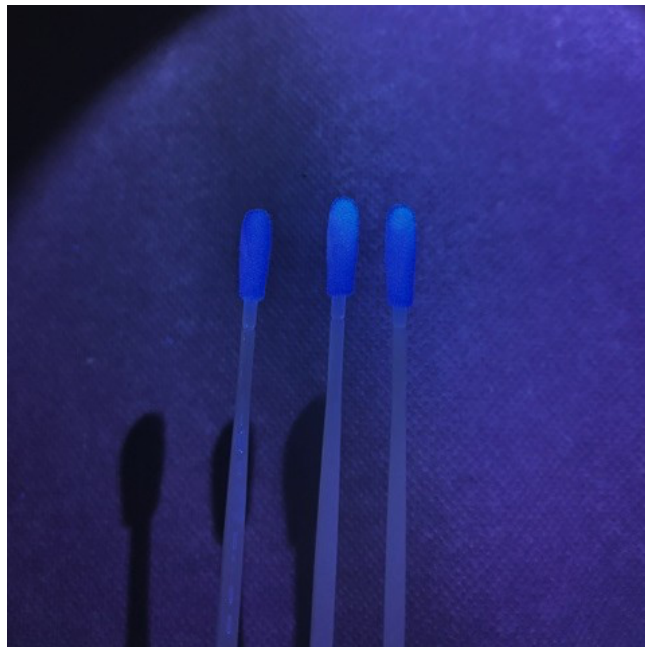


Figura 13: Tampone STK 4N6FLOQSwab vergine a sinistra, tamponi con prelievo di diluizione 1:125 al centro (7) e a destra (8)

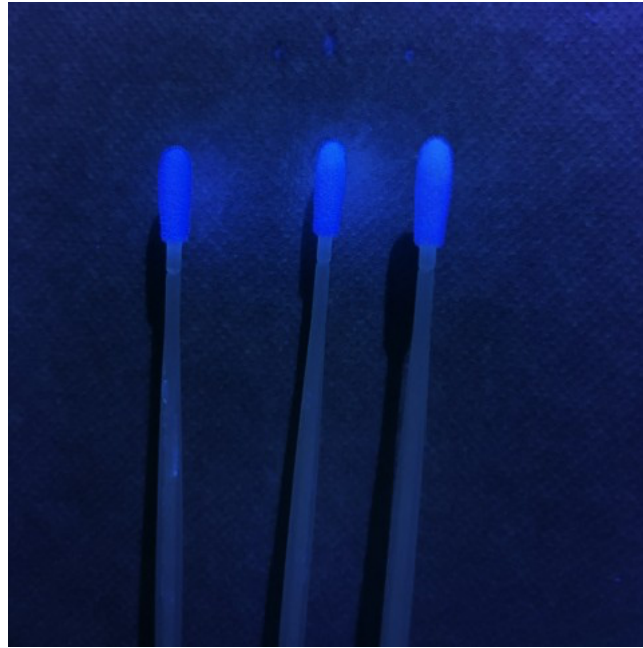


Figura 14: Tampone STK 4N6FLOQSwab vergine a sinistra, tamponi con prelievo di diluizione 1:625 al centro (9) e a destra (10)

Le risultanze sperimentali hanno evidenziato comportamenti nettamente differenti a seconda del fattore di diluizione della traccia, delineando un vero e proprio effetto soglia legato all'interazione tra il liquido di inumidimento (acqua priva di DNA) e la concentrazione della componente biologica:

- Liquido seminale puro, diluizioni 1:5 e 1:25 (Figure 10-11-12): l'emissione fluoroforica è risultata marcata, vivida e facilmente identificabile, mostrando un netto stacco cromatico rispetto al controllo negativo. In queste prime tre condizioni, l'elevata densità di fluorofori biologici nativi (come le flavine e le poliammine) ha lavorato in sinergia con l'effetto di rifrazione dell'acqua e il liquido ha agito da veicolo ottico, massimizzando la diffusione della luce ultravioletta all'interno della matrice floccata e amplificando un segnale biologico già intrinsecamente forte, generandone una risposta visiva ottimale.
- Diluizione 1:125 (Figura 13): si è registrato un progressivo decremento della risposta ottica, caratterizzata da una fluorescenza scarsa e più sfumata;
- Diluizione 1:625 (Figura 14): ha rappresentato il limite di rilevabilità visiva del sistema, con una risposta che è apparsa estremamente debole o quasi del tutto assente.

Nelle ultime due condizioni di forte diluizione (1:125 e 1:625), questo effetto di amplificazione fisica è venuto a mancare. A concentrazioni così basse, la quantità di materiale biologico trattenuto sul tampone è infinitesimale; il numero di fluorofori presenti scende sotto la soglia minima necessaria a generare una fluorescenza apprezzabile e di conseguenza, l'acqua non ha potuto favorire l'intensità del segnale, poiché non vi era una densità biologica sufficiente da veicolare o risaltare.

Sotto il profilo metodologico, la discriminazione analitica accurata del segnale alle alte diluizioni ha risentito in modo significativo dell'interferenza ottica determinata dal rumore di fondo. Il dispositivo vergine, infatti, possiede una debole fluorescenza intrinseca che, in assenza di un forte segnale biologico, viene messa in evidenza dall'idratazione della fitta trama di nylon e sovrapponendosi ai segnali biologici più fievoli, questa luminescenza di base ha ridotto il contrasto visivo necessario per una rilevazione netta della traccia, rendendo complessa e ambigua la diagnosi visiva ai limiti di sensibilità del kit.

Ai fini della validazione in uno scenario operativo reale, lo screening ottico è stato esteso al confronto diretto tra il dispositivo vergine (controllo negativo) e il tampone impiegato per il repertamento della traccia latente rinvenuta sul coprisedile automobilistico (Figura 15). Anche in questo caso, il pannello fotografico mostra a sinistra il dispositivo non caricato, caratterizzato dalla sua fluorescenza di base, affiancato a destra dal tampone utilizzato per il prelievo sul tessuto, il quale mostra un'emissione fluoroforica nettamente più intensa.



Figura 15: Traccia n°1 visibile sotto luce UV a 365 nm. Tampone STK vergine a sinistra e tampone STK post prelievo a destra

In questo caso, l'ottima resa visiva della traccia forense beneficia del medesimo fenomeno di sinergia ottica precedentemente descritto per i campioni concentrati su vetro. L'impiego dell'acqua priva di DNA per l'inumidimento della testa floccata (*wet-dry technique*), pur non introducendo una fluorescenza propria, ha modificato la rifrazione della luce ultravioletta sulla matrice in nylon, agendo da amplificatore del segnale biologico recuperato dalle fitte trame del tessuto. Nel valutare lo stacco di luminescenza sul reperto reale è stato tuttavia necessario isolare criticamente questa componente di illuminazione fisica dovuta all'idratazione, confermando che il netto contrasto visivo fosse supportato da un'effettiva e abbondante presenza di fluorofori biologici originari della traccia di reato.

4.2 Diagnosi generica e validazione immunocromatografica

Parallelamente alle indagini ottiche condotte sul coprisedile automobilistico, e al fine di superare il dato puramente fisico della luminescenza riscontrata sotto luce ALS, l'effettiva natura biologica del fluido latente è stata confermata analiticamente attraverso un saggio immunocromatografico presuntivo eseguito mediante la card SERATEC® PAM Test (Figura 16). Tale accertamento è stato effettuato sfruttando il materiale biologico raccolto tramite un campionamento indipendente con il tampone classico di routine, la cui esecuzione si è resa indispensabile per ottenere l'assoluta certezza scientifica circa la presenza di liquido seminale nell'area d'interesse.

I risultati del saggio hanno infatti confermato la netta positività simultanea per entrambi i target biologici ricercati: l'antigene prostatico specifico (PSA o p30) e l'alfa-amilasi. Visivamente, la card ha sviluppato in modo marcato e privo di ambiguità sia la linea di controllo (C) sia le bande cromatiche in corrispondenza della linea della traccia spermatica (P) e della traccia salivare (A).

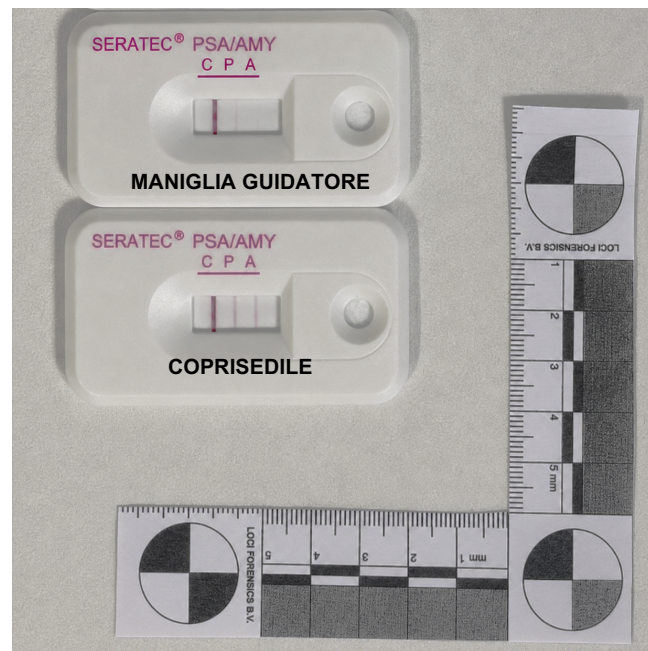


Figura 16: Test presuntivo Seratec® PSA/AMY

Sotto il profilo analitico, la presenza e l'intensità delle linee P e A hanno fornito importanti indicazioni sul carico biologico originario del reperto. Il SERATEC® PAM Test, infatti, non si configura come un saggio esclusivamente qualitativo del tipo "positivo/negativo", ma possiede caratteristiche semi-quantitative. Ciò significa che l'intensità cromatica delle bande reattive sulla membrana in nitrocellulosa è direttamente proporzionale alla concentrazione degli antigeni proteici presenti nel lisato e, di riflesso, alla quantità di sperma e saliva originariamente depositati sul tessuto del copri sedile.

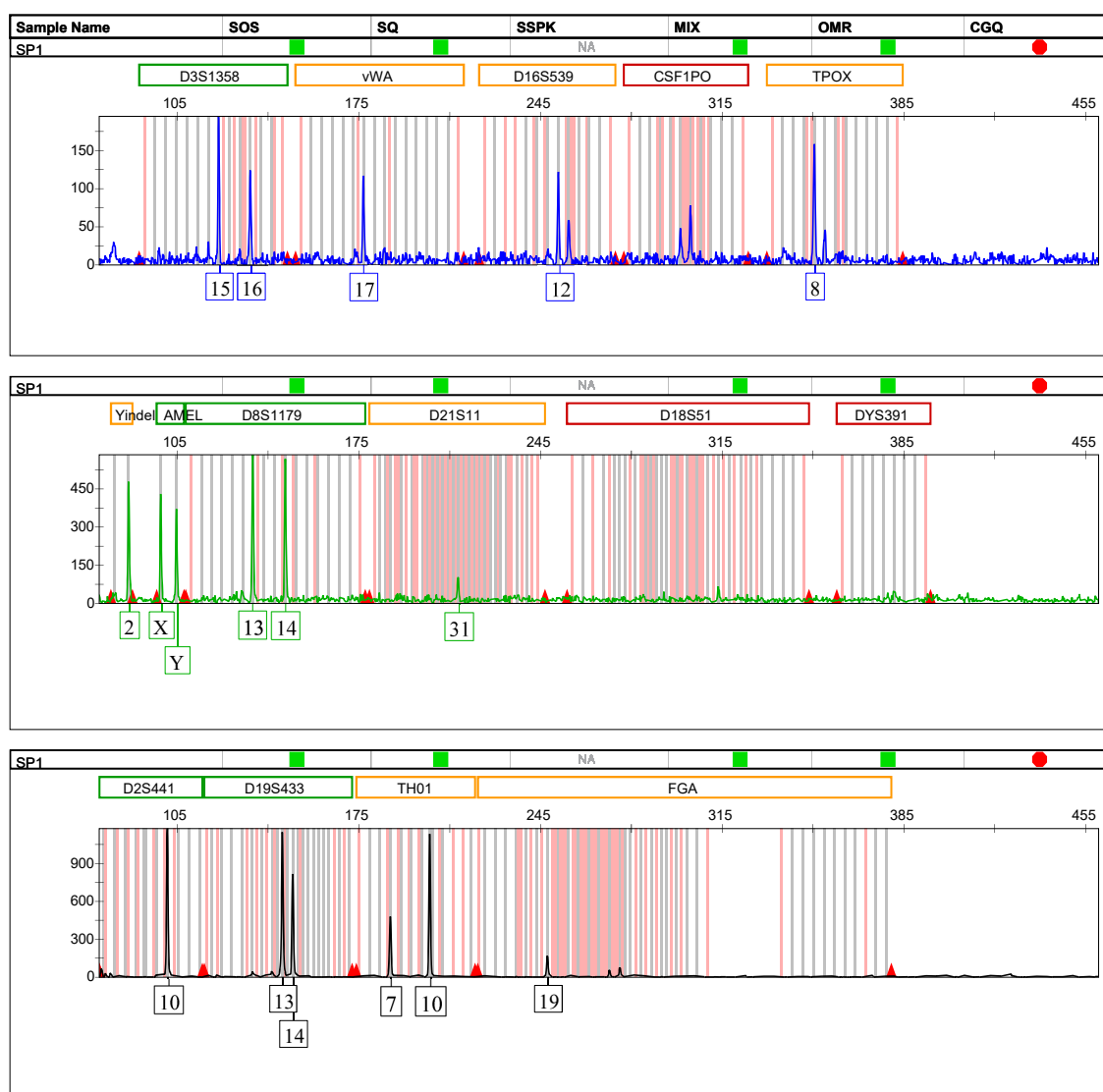
La comparsa di bande cromatiche intense e ben definite sul campione reale ha quindi dimostrato non solo l'effettiva presenza di un fluido biologico misto (liquido seminale e saliva), ma anche un ottimo stato di conservazione e un'abbondante concentrazione dei marker proteici sul tessuto, nonostante le fitte trame sintetiche e le potenziali interferenze ambientali del veicolo.

Il saggio immunocromatografico è stato eseguito anche sulla traccia prelevata dalla maniglia del veicolo oggetto d'indagine, ma i risultati non sono stati inclusi nel presente lavoro sperimentale in quanto non rilevanti ai fini degli scopi della ricerca.

4.3 Profilazione genetica ed analisi degli elettroferogrammi

La fase cruciale della validazione molecolare ha previsto la verifica della capacità dei dispositivi STK 4N6FLOQSwabs di rilasciare efficacemente il materiale cellulare intrappolato nelle fibre di nylon per consentirne la successiva tipizzazione genetica. Dei 10 dispositivi complessivamente utilizzati per la curva di calibrazione su supporto in vetro, un'aliquota rappresentativa di 5 tamponi è stata selezionata e sottoposta all'estrazione.

L'analisi quantitativa e qualitativa dei tracciati elettroforetici, effettuata tramite il software di analisi dei dati GeneMapper™ ID-X (Applied Biosystems), ha evidenziato limiti analitici significativi nella risposta del dispositivo. Risultati parzialmente informativi sono stati ottenuti esclusivamente dal campione caricato con liquido seminale puro (SP1), il quale ha tuttavia restituito un profilo genetico incompleto (Figura 17).



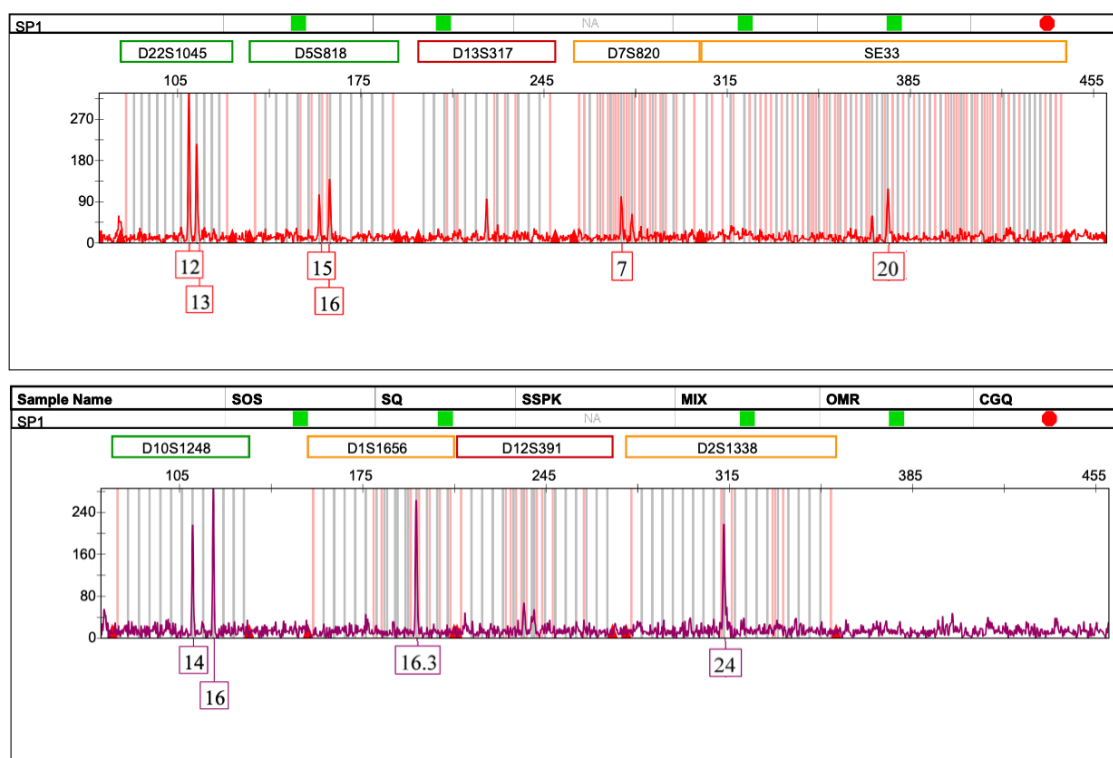


Figura 17: Elettroferogramma campione SP1, liquido seminale puro

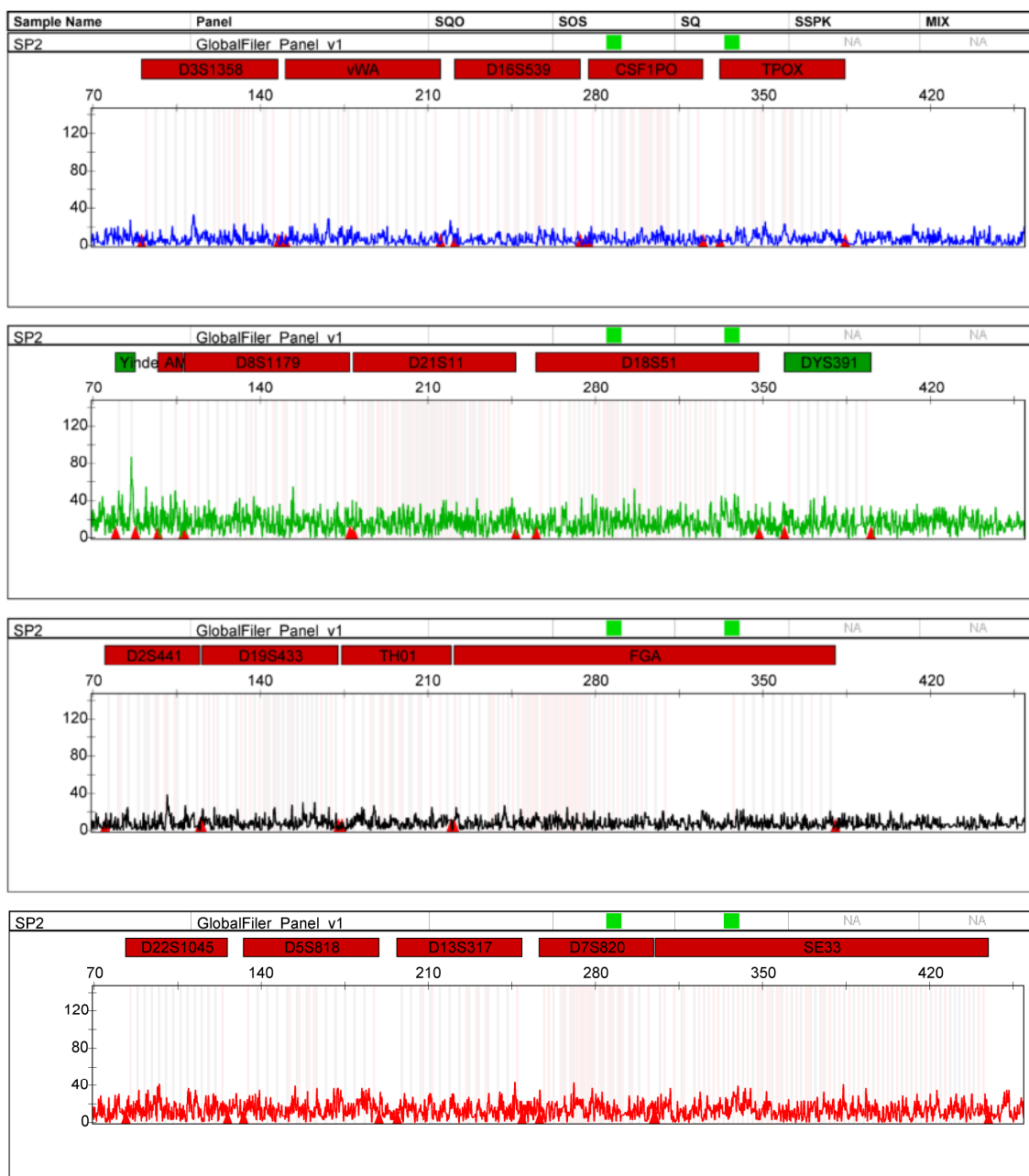
L'analisi del tracciato elettroforetico generato mediante GeneMapper™ ID-X per il campione SP1, raccolto mediante dispositivo STK 4N6FLOQSwab, evidenzia l'ottenimento di un profilo genetico parziale. La presenza degli alleli X e Y al locus Amelogenina, associata alla rilevazione dell'allele al locus Y-indel, conferma l'origine maschile del contributore del campione.

Dal punto di vista della distribuzione del segnale, l'elettroferogramma mostra una marcata dipendenza dell'intensità dei picchi dalla dimensione degli ampliconi, riconducibile al cosiddetto effetto ski-slope. I loci caratterizzati da ampliconi di dimensioni ridotte, generalmente inferiori a 200 bp, mostrano infatti una migliore efficienza di amplificazione, con picchi ben definiti e intensità adeguate, mentre all'aumentare della lunghezza dei frammenti si osserva una progressiva riduzione del segnale, particolarmente evidente nei loci con ampliconi superiori a circa 250–300 bp. Tale andamento determina la perdita improvvisa di marcatori informativi a causa di diffusi fenomeni di *locus drop-out*, rendendo il profilo privo del numero di alleli necessario per un'attribuzione o un confronto idoneo secondo gli standard forensi.

A questa distribuzione non uniforme del segnale si associa inoltre una marcata differenza nell'intensità di fluorescenza tra i diversi canali di rilevazione, con alcuni canali

caratterizzati da picchi nettamente più elevati e altri da segnali fortemente ridotti e prossimi alla linea di base (*baseline*).

Nell'insieme, il tracciato rivela una resa complessiva e un bilanciamento intra- ed inter-locus del tutto subottimali. Dal momento che l'analisi è stata condotta su una matrice biologica concentrata e pura (SP1), tali evidenze analitiche suggeriscono una limitata efficienza del dispositivo STK 4N6FLOQSwab nella fase di eluizione e rilascio del materiale genetico, oltre a una possibile parziale inibizione della PCR, non garantendo la robustezza e la completezza attese da un campione non diluito.



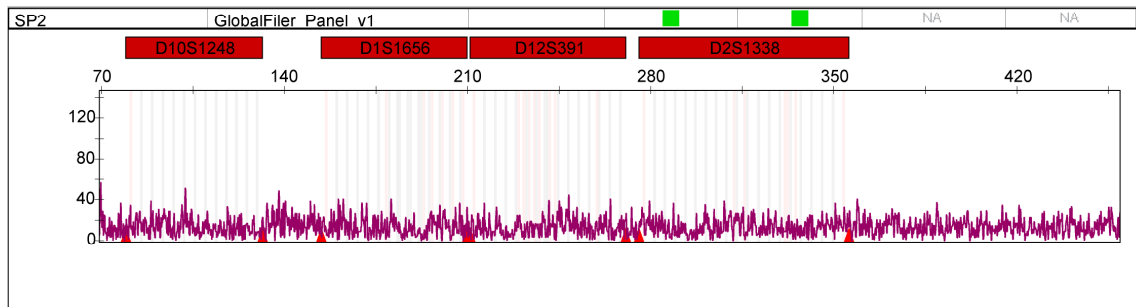


Figura 18: Elettroferogramma campione SP2, liquido seminale diluito 1:5

L'elettroferogramma del campione SP2 evidenzia l'assenza di un profilo genetico interpretabile. In tutti i canali di fluorescenza (blu, verde, giallo, rosso e viola) non sono presenti picchi allelici riconducibili ai loci analizzati; il tracciato mostra esclusivamente il rumore di fondo dello strumento, con picchi di bassa intensità distribuiti casualmente lungo tutto l'intervallo di migrazione e con valori che rimangono ben al di sotto della soglia normalmente utilizzata per la rilevazione degli alleli.

L'assenza di segnali interessa indistintamente tutti i marcatori del pannello, anche il locus dell'amelogenina non presenta alcun picco, per cui non è possibile determinare il sesso biologico del donatore, così come non è rilevabile il marcatore Y DYS391.

La linea di base appare relativamente uniforme e priva di anomalie evidenti, indicando che il sistema di rilevazione ha funzionato correttamente ma che non è stato rilevato DNA amplificato e la spiegazione più probabile da attribuire a questo risultato è una quantità di DNA bassa, insufficiente a consentire l'amplificazione dei loci STR.

Poiché nessun locus risulta amplificato, non è possibile ottenere un profilo genetico utilizzabile a fini identificativi, né effettuare confronti con altri campioni o interpretazioni statistiche. In ambito forense, un risultato di questo tipo viene generalmente classificato come profilo nullo o negativo.

Si specifica che i tracciati elettroforetici relativi ai restanti campioni della curva di calibrazione (SP3, SP4 e SP5) non sono stati inseriti all'interno del presente elaborato in quanto a causa del progressivo incremento dei fattori di diluizione (da 1:25 fino a 1:625), i grafici sono risultati strutturalmente ancora più inconcludenti rispetto a quello del campione SP2, mostrando linee di base completamente piatte e l'assoluta assenza di segnali sopra la soglia, rendendo la loro inclusione fotografica del tutto ridondante ai fini della discussione dei dati.

Per verificare se i nuovi strumenti funzionano anche in una situazione reale e non controllata in laboratorio, sono stati estratti e analizzati i DNA raccolti sui tamponi usati

per il prelievo delle tracce latenti sul coprisedile dell'auto. In questa fase, il nuovo tampone STK è stato confrontato direttamente con un tampone classico 4N6FLOQSwabs, analizzandoli entrambi esattamente nello stesso modo.

L'analisi comparativa degli elettroferogrammi ha rivelato differenze analitiche quantitative e qualitative tra i due campioni oggetto di sperimentazione:

- Tampone classico 4N6FLOQSwabs di riferimento: ha permesso di ottenere un tracciato elettroforetico con un'intensità di segnale decisamente più elevata e definita. I picchi allelici presentano altezze (RFU) nettamente superiori, con valori compresi prevalentemente tra 600 RFU e 1800 RFU, e un eccellente rapporto segnale/rumore, garantendo un profilo genetico completo, bilanciato e pienamente fruibile ai fini identificativi.
- Dispositivo STK 4N6FLOQSwabs: ha mostrato una resa quantitativa e analitica inferiore. Il tracciato presenta una marcata riduzione generale dell'intensità del segnale, con altezze di picco contenute perlopiù tra 150 RFU e 450 RFU (con valori di 270 RFU e 240 RFU, raggiungendo la soglia di 900 RFU solo in rari casi). Sebbene gli alleli identificati risultino concordi e perfettamente sovrapponibili al profilo di riferimento (es. Amelogenina X,Y; TH01 6, 9.3; D10S1248 14, 16), la presenza di numerosi picchi attestate in prossimità della soglia analitica di rilevazione (*analytical threshold*) espone il profilo a un elevato rischio di *allelic drop-out* e a una complessa interpretazione genotipica, confermando una minore efficienza complessiva del dispositivo.

Di seguito vengono riportati i tracciati elettroforetici a confronto (Figure 19 – 23). La sovrapposizione visiva dei tracciati (tampone 4N6FLOQSwab classico in alto e dispositivo pre-commerciale STK 4N6FLOQSwab in basso) documenta in modo immediato e diretto la differente resa analitica, la disparità nell'altezza dei picchi (RFU) e la diversa efficienza nel recupero e rilascio del materiale genetico da parte dei due dispositivi a partire dal medesimo reperto biologico:

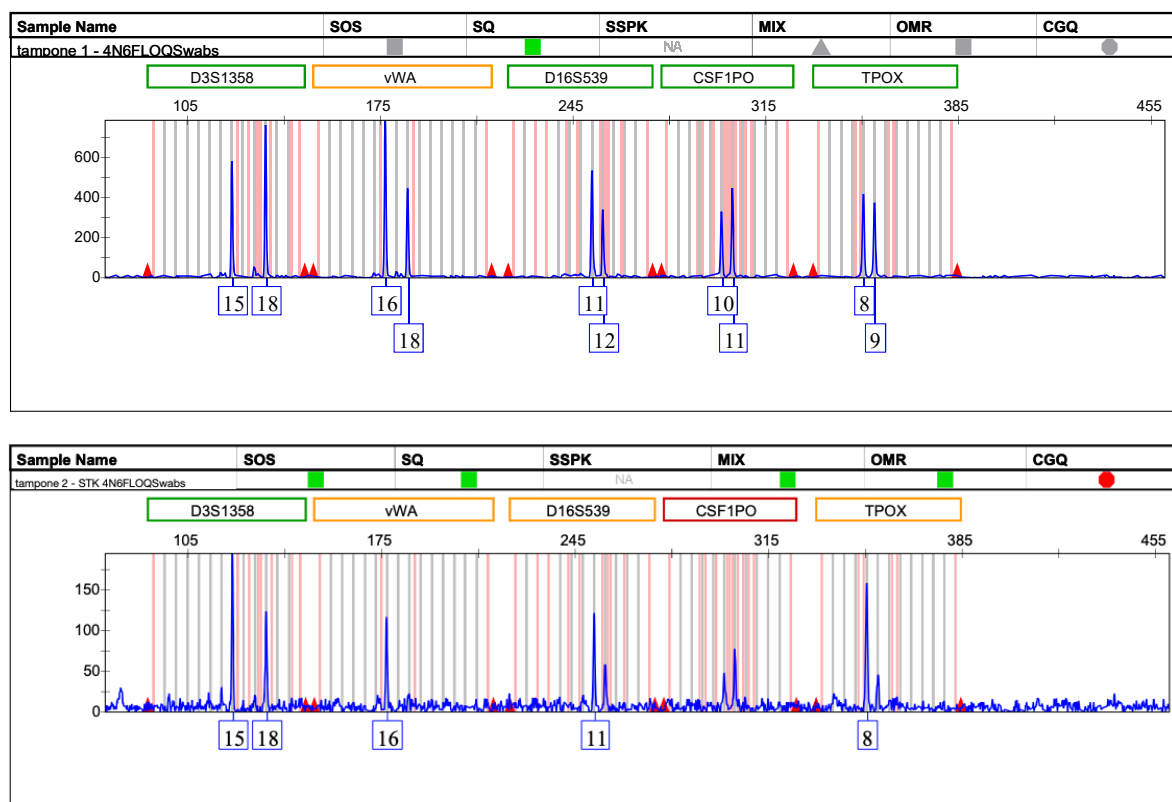


Figura 19: Analisi comparativa del canale di fluorescenza blu (marcatore 6-FAM) tra il tampone 4N6FLOQSwab (in alto) e il tampone STK4N6FLOQSwab (in basso)

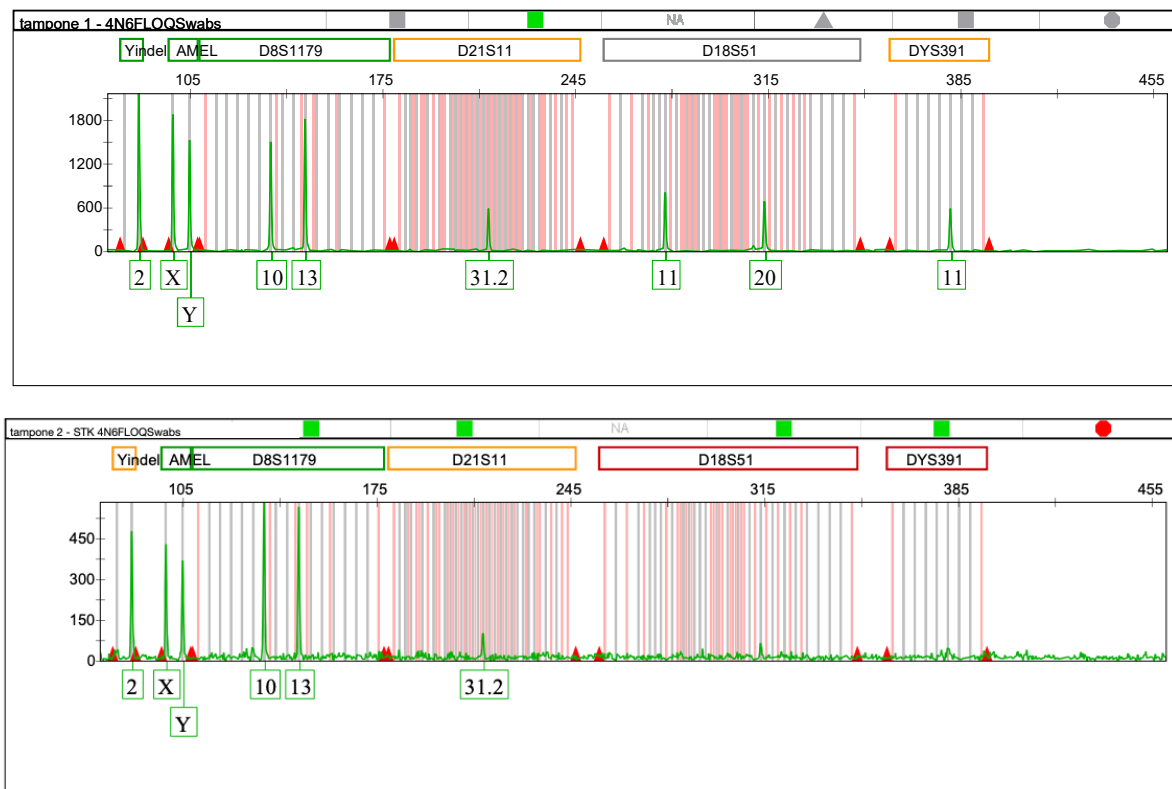


Figura 20: Analisi comparativa del canale di fluorescenza verde (marcatore VIC) tra il tampone 4N6FLOQSwab (in alto) e il tampone STK4N6FLOQSwab (in basso)

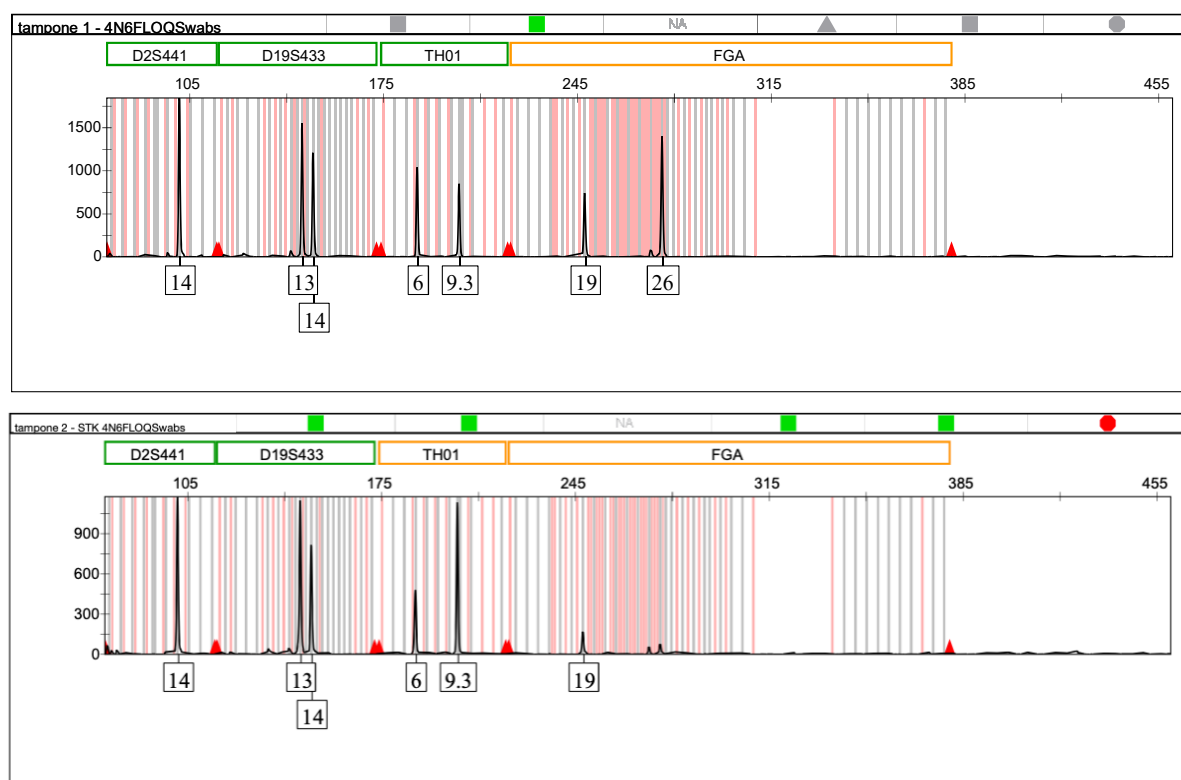


Figura 21: Analisi comparativa del canale di fluorescenza giallo (visualizzato in nero, marcatore NED) tra il tampone 4N6FLOQSwab (in alto) e il tampone STK4N6FLOQSwab (in basso)

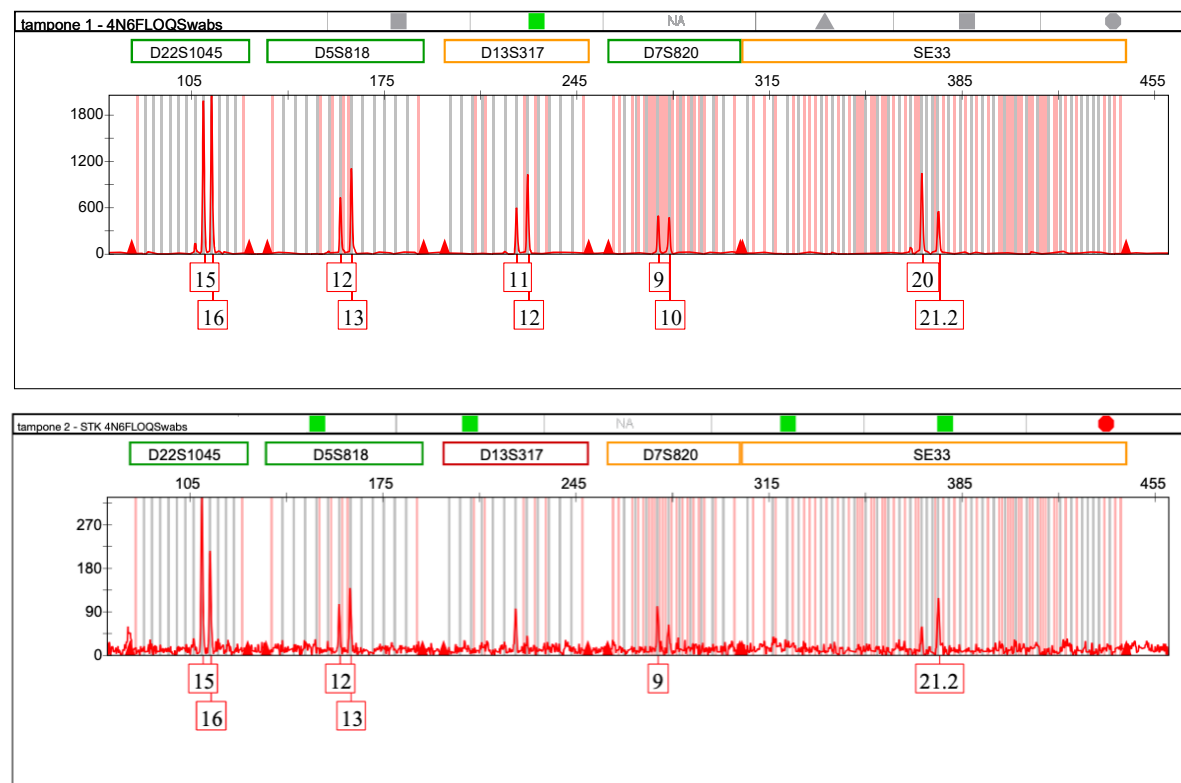


Figura 22: Analisi comparativa del canale di fluorescenza rosso (marcatore TAZ) tra il tampone 4N6FLOQSwab (in alto) e il tampone STK4N6FLOQSwab (in basso)

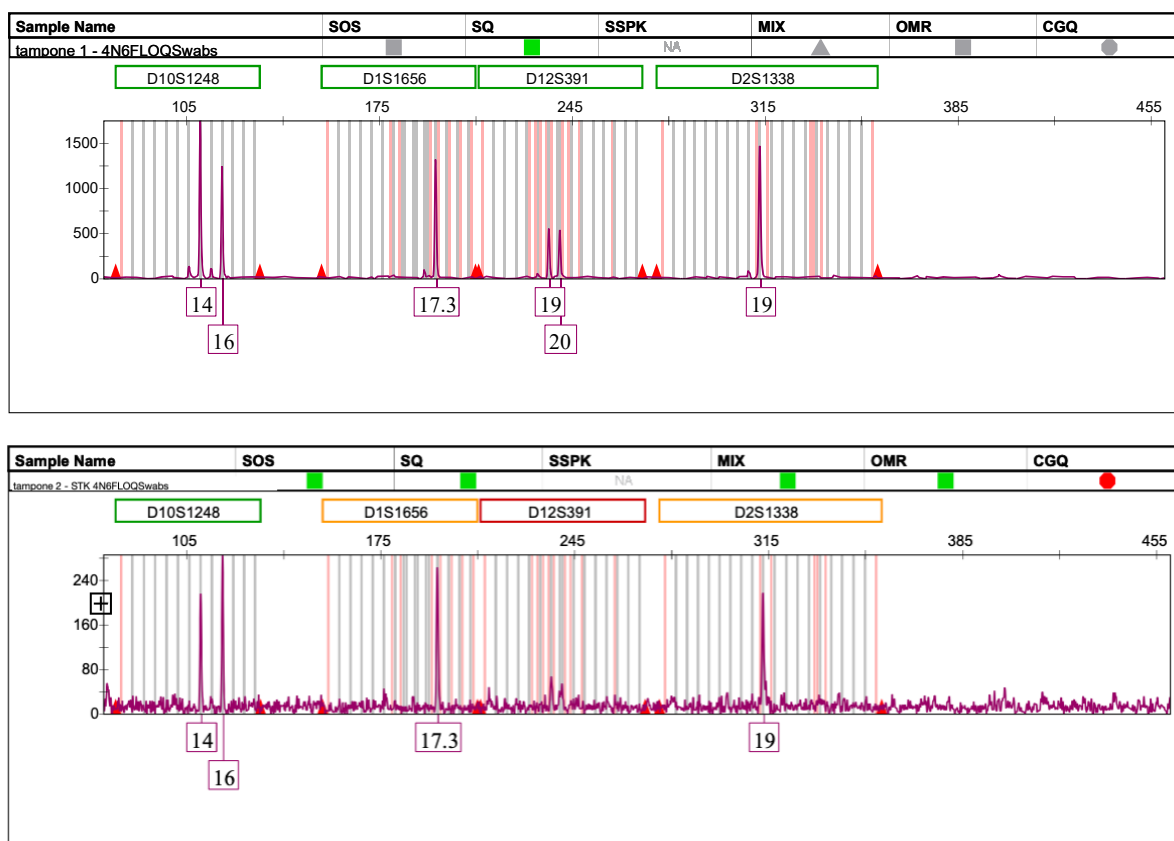


Figura 23: Analisi comparativa del canale di fluorescenza viola (marcatore SID) tra il tampone 4N6FLOQSwab (in alto) e il tampone STK4N6FLOQSwab (in basso)

4.4 Valutazione critica delle performance del dispositivo STK 4N6FLOQSwabs

Alla luce dei riscontri ottici, immunocromatografici e soprattutto molecolari dettagliati nei paragrafi precedenti, è possibile tracciare un bilancio complessivo sulle performance del sistema d'indagine. Allo stato attuale dello sviluppo sperimentale, il dispositivo pre-commerciale STK 4N6FLOQSwabs non ha pienamente confermato le aspettative operative per le quali è stato progettato, in quanto l'obiettivo principale dell'introduzione di questo tampone innovativo risiedeva nell'ottimizzazione e nella semplificazione del flusso di lavoro standard utilizzato nei laboratori di genetica forense.

Attualmente, il protocollo tradizionale per l'analisi di tracce spermatiche latenti su reperti d'indagine prevede una sequenza distruttiva:

1. Ispezione visiva diretta ad occhio nudo;
2. Screening ottico mediante luci forensi (UV/ALS);
3. Campionamento distruttivo tramite taglio fisico della porzione di tessuto d'interesse, da inserire direttamente in microprovetta (eppendorf) per la successiva estrazione;

4. Esecuzione in parallelo di un campionamento tramite tampone standard per l'effettuazione dei test immunocromatografici presuntivi (diagnosi generica).

L'introduzione dello STK 4N6FLOQSwab mirava a condensare queste fasi in un unico approccio non distruttivo e il sistema avrebbe dovuto permettere l'ispezione visiva, lo screening UV e il prelievo diretto dal reperto tramite un solo dispositivo; in caso di riscontrata fluorescenza sul corpo del tampone, si sarebbe dovuti passare direttamente alle fasi di biologia molecolare, bypassando sia il taglio del tessuto sia il test presuntivo. Tuttavia, i dati emersi nel presente studio, indicano che le performance attuali non consentono una transizione sicura verso questo nuovo modello operativo, evidenziando un netto divario tra l'efficienza teorica del metodo e i suoi limiti pratici.

Sotto il profilo dei punti di debolezza, la criticità più evidente a livello ottico è rappresentata dalla fluorescenza intrinseca di background mostrata dai dispositivi vergini. Questa luminescenza nativa riduce sensibilmente il rapporto segnale/rumore, ostacolando l'operatore nella discriminazione immediata tra la reale positività della traccia biologica e l'interferenza costitutiva dei materiali sintetici del nylon. Tale limite introduce un elevato rischio di falsi positivi in fase di screening visivo.

A questo fattore si affianca una scarsa efficienza estrattiva nei campioni complessi o fortemente diluiti, che rappresenta un limite insostenibile in ambito forense, dove la certezza del dato genetico è prioritaria. Sebbene i tracciati ottenuti dal liquido seminale puro abbiano restituito profili parziali, le restanti condizioni sperimentali (relative alle diluizioni seriali) hanno mostrato profili genotipici del tutto insoddisfacenti. La drastica assenza di segnale o la presenza di picchi al di sotto della soglia di leggibilità (*analytical threshold*) hanno reso i tracciati non idonei all'identificazione personale, e di conseguenza, l'idea di saltare i test immunocromatografici standardizzati (come il saggio PSA o dell'alfa-amilasi) a favore di un protocollo così sensibile al carico biologico rischia di tradursi in gravi falsi negativi, invalidando l'intera catena analitica.

Nel complesso, il workflow proposto evidenzia una netta differenza tra i vantaggi teorici e le prestazioni effettivamente riscontrate. Dal punto di vista concettuale, il dispositivo potrebbe ridurre significativamente tempi di analisi, costi operativi e numero di manipolazioni del reperto, eliminando la necessità dei test immunocromatografici presuntivi grazie all'identificazione diretta della traccia mediante fluorescenza. Una simile semplificazione consentirebbe non solo di velocizzare le attività di laboratorio, ma anche di limitare il rischio di contaminazione crociata associato ai numerosi passaggi manuali previsti dal protocollo tradizionale.

Tuttavia, i risultati sperimentali dimostrano che tali potenziali vantaggi non trovano ancora un adeguato riscontro applicativo e l'ottenimento di profili genetici incompleti o non interpretabili rappresenta infatti un limite incompatibile con gli standard richiesti in ambito medico-legale, dove affidabilità, riproducibilità e robustezza del dato genetico costituiscono requisiti imprescindibili. A ciò si aggiunge il rischio derivante dall'eventuale sostituzione dei test presuntivi validati a livello internazionale, quali il dosaggio del PSA o dell'alfa-amilasi, con uno screening basato esclusivamente sulla fluorescenza del tampone. La presenza di una fluorescenza di fondo potrebbe infatti determinare falsi positivi durante l'ispezione preliminare, mentre la ridotta efficienza di recupero del DNA nei campioni più complessi potrebbe tradursi in falsi negativi o nell'impossibilità di ottenere un profilo genetico utile.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha avuto l'obiettivo di valutare in maniera comparativa le prestazioni analitiche, la praticità operativa e l'affidabilità del nuovo dispositivo pre-commerciale STK 4N6FLOQSwabs rispetto ai sistemi di campionamento e ai flussi di lavoro tradizionalmente impiegati in genetica forense per l'ispezione, la diagnosi generica e l'identificazione di tracce spermatiche latenti.

Dall'insieme delle prove effettuate lungo l'intera catena analitica, l'ipotesi di lavoro iniziale mirava a verificare la possibilità di identificare direttamente la traccia biologica mediante la fluorescenza indotta dalle luci forensi (UV/ALS) sul corpo stesso del tampone floccato, condensando la diagnosi presuntiva e la raccolta della traccia in un unico passaggio non distruttivo. Tuttavia, le prove effettuate lungo la catena analitica hanno evidenziato criticità sostanziali. In primo luogo, la marcata fluorescenza intrinseca di background emanata dalle fibre sintetiche in nylon del dispositivo vergine riduce drasticamente il rapporto segnale/rumore e questo fenomeno rende complessa e talvolta ambigua la discriminazione visiva tra la luminescenza del fluido biologico e l'interferenza del supporto, introducendo un concreto rischio di falsi positivi già durante l'ispezione preliminare del reperto. Sotto il profilo della sensibilità ottica, il dispositivo ha fornito buone capacità di rilevazione solo per le prime tre diluizioni della serie (SP1, SP2 e SP3), mentre per le ultime due (SP4 e SP5) i riscontri sono risultati del tutto scarsi.

Tali limitazioni si sono ripercosse direttamente sulla caratterizzazione molecolare dei campioni: l'analisi elettroforetica ha restituito un profilo genetico parziale esclusivamente per la traccia di liquido seminale puro (SP1), mentre per le quattro diluizioni successive i tracciati non hanno fornito alcun risultato interpretabile ai fini identificativi.

Anche il confronto diretto condotto sul copriesidile a parità di condizioni ha confermato che il dispositivo pre-commerciale non può, allo stato attuale, sostituire la metodologia di routine. A differenza del tampone di riferimento, che ha generato un profilo completo, equilibrato e pienamente informativo (con picchi ben definiti compresi tra 600 RFU e 1800 RFU), lo STK 4N6FLOQSwab ha mostrato performance inferiori sia nel recupero che nel rilascio della matrice biologica.

Nel protocollo forense tradizionale, la diagnosi di tracce spermatiche prevede una sequenza operativa distruttiva basata su screening UV, test presuntivi immunocromatografici (come i saggi per la ricerca di PSA e alfa-amilasi) e taglio fisico

della porzione di tessuto da destinare all'estrazione. Sebbene lo STK 4N6FLOQSwab sia stato ideato per unificare tali fasi preservando l'integrità del reperto per eventuali controperizie, i dati emersi evidenziano un netto divario tra la validità concettuale del metodo e le sue prestazioni pratiche. L'incapacità di ottenere profili completi sulle tracce diluite, unita all'inaffidabilità derivante dall'eventuale omissione dei test presuntivi validati, rende il flusso di lavoro proposto non conforme ai severi standard di robustezza, riproducibilità e certezza imposti dall'ambito medico-legale.

In prospettiva futura, il potenziale applicativo dello STK 4N6FLOQSwab nelle indagini forensi, in particolare nei casi di violenza sessuale e nella ricerca di tracce spermatiche latenti, rimane di notevole interesse ma è strettamente subordinato a una necessaria revisione e ottimizzazione da parte della casa produttrice.

Affinché l'impatto sul lavoro investigativo sia concretamente favorevole è indispensabile un intervento mirato sulla composizione chimico-fisica dei materiali costituenti il tampone, finalizzato ad azzerare o quantomeno ridurre drasticamente la fluorescenza di base del dispositivo vergine e a garantire, di conseguenza, che l'unica luminescenza rilevabile in sede di ispezione sia esclusivamente quella indotta dai fluidi biologici effettivamente raccolti.

Soltanto dopo aver risolto tale criticità di natura ottica e aver contestualmente ottimizzato l'efficienza di rilascio e di eluizione del DNA per le tracce diluite o deposte su tessuti assorbenti complessi, il tampone potrà essere sottoposto a una nuova e approfondita fase di validazione interna. Qualora questi parametri strutturali venissero pienamente soddisfatti, lo strumento si trasformerebbe in una risorsa di grande valore per i laboratori di genetica forense in quanto permetterebbe di accelerare in modo significativo i tempi della risposta investigativa, offrendo un'alternativa rapida, economica e soprattutto non distruttiva per i flussi analitici standardizzati di identificazione umana.

BIBLIOGRAFIA

- Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition: A review. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.006>
- Allery, J. P., Telmon, N., Mieusset, R., Blanc, A., & Rougé, D. (2001). Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *Journal of forensic sciences*, 46(2), 349–351.
- Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*, 7, Articolo e7314. <https://doi.org/10.7717/peerj.7314>
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*, 8(9), Articolo 227. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227>
- Ballantyne, K. N., Ralf, A., Aboukhalid, R., Achakzai, N. M., Anjos, M. J., Ayub, Q., Balažic, J., Ballantyne, J., Ballard, D. J., Berger, B., Bobillo, C., Bouabdellah, M., Burri, H., Capal, T., Caratti, S., Cárdenas, J., Cartault, F., Carvalho, E. F., Carvalho, M., ... Kayser, M. (2014). Toward male individualization with rapidly mutating Y-chromosomal short tandem repeats. *Human Mutation*, 35(8), 1021–1032. <https://doi.org/10.1002/humu.22599>
- Bessetti, J. (2007). An introduction to PCR inhibitors. *Profiles in DNA*, 10(1), 9–10.
- Bhoyar, L., Mehar, P. & Chavali, K. (2024). An overview of DNA degradation and its implications in forensic caseworks. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 14. <https://doi.org/10.1186/s41935-024-00389-y>
- Bruijns, B., van Asten, A., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2016). Microfluidic devices for forensic DNA analysis: A review. *Biosensors*, 6(3), Articolo 41. <https://doi.org/10.3390/bios6030041>
- Budowle, B., Eisenberg, A. J., & van Daal, A. (2009). Validity of low copy number typing and applications to forensic science. *Croatian Medical Journal*, 50(3), 207–217. <https://doi.org/10.3325/cmj.2009.50.207>
- Bukyya, J. L., Tejasvi, M. L. A., Avinash, A., P, C. H., Talwade, P., Afroz, M. M., Pokala, A., Neela, P. K., Shyamilee, T. K., & Srisha, V. (2021). DNA profiling in forensic science: A review. *Global Medical Genetics*, 8(4), 135–143. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1728689>
- Butler, J. M. (2012). *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04189-3>
- Costa, S., Correia-de-Sá, P., Porto, M. J., & Cainé, L. (2017). The use of laser microdissection in forensic sexual assault casework: Pros and cons compared to standard methods. *Journal of Forensic Sciences*, 62(4), 998–1006. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13348>
- Crow, J. F. (1999). Hardy, Weinberg and language impediments. *Genetics*, 152(3), 821–825. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.3.821>

- Davidson, G., & Jalowicki, T. B. (2012). Acid phosphatase screening — Wetting test paper or wetting fabric and test paper? *Science & Justice*, 52(2), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2011.08.001>
- Davies, A., & Wilson, E. (1974). The persistence of seminal constituents in the human vagina. *Forensic Science*, 3, 45–55. [https://doi.org/10.1016/0300-9432\(74\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0300-9432(74)90006-5)
- De Beijer, R. P., de Graaf, C., van Weert, A., van Leeuwen, T. G., Aalders, M. C. G., & van Dam, A. (2018). Identification and detection of protein markers to differentiate between forensically relevant body fluids. *Forensic Science International*, 290, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.07.013>
- Du Mont, J., White, D., & McGregor, M. J. (2009). Investigating the medical forensic examination from the perspectives of sexually assaulted women. *Social Science & Medicine*, 68(4), 774–780. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2008.11.010>
- European Network of Forensic Science Institutes. (2015). *ENFSI guideline for evaluative reporting in forensic science*. https://enfsi.eu/sites/default/files/documents/external_publications/m1_guideline.pdf
- Gruppo dei Genetisti Forensi Italiani. (2023). *Linee guida Ge.F.I. per l'analisi del DNA e la repertazione forense*. Società Italiana di Medicina Legale e delle Assicurazioni (SIMLA). <https://www.gefi.fi/>
- Gill, P., Jeffreys, A. J., & Werrett, D. J. (1985). Forensic application of DNA ‘fingerprints’. *Nature*, 318(6046), 577–579. <https://doi.org/10.1038/318577a0>
- Gopinath, S., Zhong, C., Nguyen, V., Ge, J., Lagacé, R. E., Short, M. L., & Mulero, J. J. (2016). Developmental validation of the Yfiler® Plus PCR Amplification Kit: An enhanced Y-STR multiplex for casework and database applications. *Forensic Science International: Genetics*, 24, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.07.006>
- Gymrek, M. (2017). A genomic view of short tandem repeats. *Current Opinion in Genetics & Development*, 44, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.01.012>
- Hares, D. R. (2015). Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 33–34. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.006>
- Hochmeister, M. N., Budowle, B., Rudin, O., Gehrig, C., Borer, U., Thali, M., & Dirnhofer, R. (1999). Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. *Journal of Forensic Sciences*, 44(5), 1057–1060.
- Hoofnagle, A. N., & Wener, M. H. (2009). The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *Journal of Immunological Methods*, 347(1–2), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.003>
- Hu, N., Cong, B., Li, S., Ma, C., Fu, L., & Zhang, X. (2014). Current developments in forensic interpretation of mixed DNA samples (Review). *Biomedical Reports*, 2(3), 309–316. <https://doi.org/10.3892/br.2014.232>

- Hudson, B. C., & Dawson Green, T. (2024). Modified differential lysis for sexual assault samples using a combined enzymatic and alkaline approach. *Forensic Sciences Research*, 9(2), Articolo owae022. <https://doi.org/10.1093/fsr/owae022>
- Inaba, K. (2011). Sperm flagella: Comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Molecular Human Reproduction*, 17(8), 524–538. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar034>
- Kamenov, Z., Todorova, M., & Khristov, V. (2001). Prostaten spetsifichen antigen (PSA) pri zheni [Prostate-specific antigen (PSA) in women]. *Vutreshni Bolesni*, 33(1), 40–47.
- Karg, T. J., & Golic, K. G. (2018). Photoconversion of DAPI and Hoechst dyes to green and red-emitting forms after exposure to UV excitation. *Chromosoma*, 127(2), 235–245. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0654-5>
- Kayser, M. (2015). Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Science International: Genetics*, 18, 33–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.003>
- Ladd, M., & Seda, J. (2023). *Sexual assault evidence collection*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554497/>
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (3^a ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Magalhães, T., Dinis-Oliveira, R. J., Silva, B., Corte-Real, F., & Nuno Vieira, D. (2015). Biological evidence management for DNA analysis in cases of sexual assault. *The Scientific World Journal*, 2015, Articolo 365674. <https://doi.org/10.1155/2015/365674>
- Moretti, T. R., Just, R. S., Kehl, S. C., Willis, L. E., Buckleton, J. S., Bright, J. A., Taylor, D. A., & Onorato, A. J. (2017). Internal validation of STRmix™ for the interpretation of single source and mixed DNA profiles. *Forensic Science International: Genetics*, 29, 126–144. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.004>
- Morton, N. E. (1991). Parameters of the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(17), 7474–7476. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7474>
- Old, J., Schweers, B. A., Boonlayangoor, P. W., Fischer, B., Miller, K. W., & Reich, K. (2012). Developmental validation of RSID™-Semen: A lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of human semen. *Journal of Forensic Sciences*, 57(2), 489–499. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01968.x>
- Opel, K. L., Chung, D., & McCord, B. R. (2010). A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of Forensic Sciences*, 55(1), 25–33. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x>
- Pajnič, I. Z. (2026). Autosomal STR markers for forensic genetics: Applications, challenges, and future directions. *Genes*, 17(3), Articolo 285. <https://doi.org/10.3390/genes17030285>

- Pang, B. C., & Cheung, B. K. (2007). Identification of human semenogelin in membrane strip test as an alternative method for the detection of semen. *Forensic Science International*, 169(1), 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.07.021>
- Pollitt, E. N., Anderson, J. C., Scafide, K. N., Holbrook, D., D'Silva, G., & Sheridan, D. J. (2016). Alternate light source findings of common topical products. *Journal of Forensic Nursing*, 12(3), 97–103. <https://doi.org/10.1097/JFN.0000000000000116>
- Presidenza del Consiglio dei Ministri. (2018, 30 gennaio). *Decreto 24 novembre 2017: Linee guida nazionali per le Aziende sanitarie e le Aziende ospedaliere in tema di soccorso e assistenza socio-sanitaria alle donne vittime di violenza*. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 24.
- Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., & van Amerongen, A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2), 569–582. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2287-2>
- Qiagen. (2020). *QIAamp® DNA investigator handbook* (hb-0464-004). Qiagen Group.
- Quintana-Murci, L., Krausz, C., & McElreavey, K. (2001). The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Science International*, 118(2–3), 169–181. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00387-5](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00387-5)
- Rappold, G. A. (1993). The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Human Genetics*, 92(4), 315–324. <https://doi.org/10.1007/BF01247327>
- Ribas-Maynou, J., Nguyen, H., Wu, H., & Ward, W. S. (2022). Functional aspects of sperm chromatin organization. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 70, 295–311. https://doi.org/10.1007/978-3-031-06573-6_10
- SERATEC® Gesellschaft für Biotechnologie mbH. (2025). *SERATEC® PAM test for the simultaneous detection of PSA and amylase: Instructions for use* (Rev. 02/2025) [Ref: PAM, PAM/8, PAM/40]. Göttingen, Germany.
- Sensabaugh, G. F. (1978). Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: A potential new marker for semen identification. *Journal of Forensic Sciences*, 23(1), 106–115. <https://doi.org/10.1520/JFS10659J>
- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S. F., ... Page, D. C. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 423(6942), 825–837. <https://doi.org/10.1038/nature01722>
- Stoilovic, M. (1991). Detection of semen and blood stains using polilight as a light source. *Forensic Science International*, 51(2), 289–296. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(91\)90194-n](https://doi.org/10.1016/0379-0738(91)90194-n)
- Toragall, M. M., Satapathy, S. K., Kadadevaru, G. G., & Hiremath, M. B. (2019). Evaluation of seminal fructose and citric acid levels in men with fertility problem. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 12(3), 199–203. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_155_18

- Tuite, E. M., & Kelly, J. M. (1993). Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 21(2–3), 103–124. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)80173-7](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)80173-7)
- van Oorschot, R. A. H., Szkuta, B., Meakin, G. E., Kokshoorn, B., & Goray, M. (2019). DNA transfer in forensic science: A review. *Forensic Science International: Genetics*, 38, 140–166. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.10.014>
- Vandewoestyne, M., & Deforce, D. (2010). Laser capture microdissection in forensic research: A review. *International Journal of Legal Medicine*, 124(6), 513–521. <https://doi.org/10.1007/s00414-010-0499-4>
- Vernarecci, S., Ottaviani, E., Agostino, A., Mei, E., Calandro, L., & Montagna, P. (2015). Quantifiler® Trio Kit and forensic samples management: A matter of degradation. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.12.005>
- Virkler, K., & Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188(1–3), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013>
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 171(4361), 964–967. <https://doi.org/10.1038/171964b0>
- Willuweit, S., & Roewer, L. (2015). The new Y Chromosome Haplotype Reference Database. *Forensic Science International: Genetics*, 15, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.11.024>
- Woollacott, C., Goray, M., van Oorschot, R. A. H., & Taylor, D. (2025). The transfer, prevalence, persistence, and recovery of DNA from body areas in forensic science: A review. *Forensic Sciences*, 5(1), Articolo 9. <https://doi.org/10.3390/forensicsci5010009>
- Zubakov, D., Boersma, A. W., Choi, Y., van Kuijk, P. F., Wiemer, E. A., & Kayser, M. (2010). MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *International Journal of Legal Medicine*, 124(3), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s00414-009-0402-3>