

Roma  
2018



IV Incontro Nazionale  
di Entomologia  
Forense

**IV Incontro  
Nazionale di  
Entomologia  
Forense**

**GIEF  
2018**

---

**15 Dicembre 2018, Palazzo Falletti, Roma**



## Comitato Scientifico

Stefano Vanin  
Elisa Arena  
Giorgia Giordani  
Fabiola Tuccia  
Mirella Gherardi  
Luigi Mastrogiuseppe

## Comitato Organizzatore

Elisa Arena  
Stefano Vanin  
Giorgia Giordani  
Fabiola Tuccia

## Il GIEF

[www.giefitalia.org](http://www.giefitalia.org)

[www.facebook.com/groups/417075748407450](https://www.facebook.com/groups/417075748407450)

@Gief\_Italia

## Programma

|             |   |
|-------------|---|
| 9:00        | Registrazione   |
| 9.30-9.45   | Inizio dei Lavori e Saluti  |
| 9.45-10.15  | <b>S. Vanin</b><br>La ricerca a servizio della giustizia per la stima del PMI: campi da esplorare nell'entomologia forense, nell'antropologia forense e nella medicina legale |
| 10.15-10.45 | <b>S.G. Germinara</b><br>I semiochimici degli insetti: dalla percezione al comportamento  |
| 10.45-11.00 | Pausa Caffè   |
| 11.15-11.45 | <b>E. Ventura Spagnolo</b><br>Applicazioni dell'analisi del microbioma in contesto forense  |
| 11.45-12.00 | <b>G. Mastroianni</b><br>Comunità batterica epinecrotica e stima del PMI  |
| 12.00-12.15 | <b>F. Tuccia</b><br>Entomologia Forense e Necro-microbioma nel contesto Veterinario: una nuova applicazione   |
| 12.15-12.30 | <b>M. Azzoni</b><br>Insetti ed Ossa: analisi entomologica ed antropologica della collezione della Certosa di Bologna  |
| 12.30-12.45 | <b>J. Pradelli</b><br>Dalla scena del crimine al laboratorio: raccolta e preparazione dei pupari per analisi morfologiche e molecolari  |
| 12.45-13.00 | DISCUSSIONE   |
| 13.00-14.30 | Pranzo  |
| 14.30-15.30 | Workshop (teorico-pratico)  |
|             | <b>G. Giordani</b><br>Identificazione degli stadi di sviluppo degli insetti presenti sul cadavere   |
| 15.30-16.30 | Assemblea annuale GIEF "Le sfide del 2019 "   |





**PRESENTAZIONI ORALI**

## **LA RICERCA A SERVIZIO DELLA GIUSTIZIA PER LA STIMA DEL PMI: CAMPI DA ESPLORARE NELL'ENTOMOLOGIA FORENSE, NELL'ANTROPOLOGIA FORENSE E NELLA MEDICINA LEGALE**

**S. Vanin**

FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, UK; GIEF, Gruppo Italiano per l'Entomologia Forense

[stefano.vanin@gmail.com](mailto:stefano.vanin@gmail.com); [stefano.vanin@hud.ac.uk](mailto:stefano.vanin@hud.ac.uk);

Negli ultimi due anni stiamo assistendo ad una svolta epocale nell'approccio alle e delle discipline forense, soprattutto quelle legate ai crimini violenti. La grande novità, che forse non lo era per gli antichi, è quella dell'approccio multidisciplinare all'analisi della scena del crimine ma anche all'analisi del cadavere. Grazie al primo incontro intergruppi di Villasimius di Settembre 2017, a cui è fatto seguito il congresso SIMLA di Verona di Settembre 2018 risulta sempre più chiara la consapevolezza che serve la sinergia tra le diverse discipline che in qualche modo hanno a che fare con il cadavere e con la scena del crimine per arrivare ad una ricostruzione attendibile degli eventi peri e post mortali. Ed è così che patologi forensi, genetisti, antropologi, tossicologi ed entomologi hanno cominciato a tracciare un cammino comune di metodologie e protocolli di repertamento sul corpo ma anche di potenziali ricerche condotte insieme. Solo una rigorosa ricerca scientifica può infatti creare degli strumenti applicabili ad un contesto come quello forense che deve dimostrarsi in grado di affrontare sfide tecnologiche ed interpretative sempre più complicate.

Una delle tematiche che sembra, oltre a quella relativa ai problemi di identificazione della vittima e dell'autore del crimine, particolarmente bisognosa di nuovi o più accurati strumenti di indagine è quella relativa alla stima del tempo del decesso. Questo bisogno ha portato allo sviluppo, prima negli Stati Uniti d'America, poi in Australia e recentemente in Europa alla creazione di strutture per lo studio dei processi tanatologici direttamente su cadaveri umani. Negli ultimi anni, proprio in questi "laboratori" a cielo aperto, si sono sviluppati interessanti studi sul necro-microbioma e sulla sua applicabilità nella stima del tempo del decesso. Questa tematica rappresenta al momento affascinanti prospettive ma altrettanti insidiosi problemi prima di una sua applicabilità in casi giudiziari.

Al tempo stesso, lo studio delle molecole rilasciate durante la decomposizione rappresenta un terreno di ricerca che trova la sua applicabilità a vari livelli e per diverse funzioni: dalla stima del tempo del decesso alla ricerca dei cadaveri sia in ambiente terrestre che in quello acquatico. Questa tematica potrà però produrre dei risultati utili solo se verrà applicato un approccio multidisciplinare che va dalla chimica analitica alla microbiologia, dall'entomologia all'antropologia forense, senza dimenticare il ruolo fondamentale della patologia e andando oltre quello della tossicologia. Diverse molecole, ma anche diverse cause di morte possono infatti influenzare il microbioma, e di conseguenza la decomposizione, la liberazione di VOC e BVOC e quindi l'attrazione degli insetti necrofagi.

La comunità scientifica, e in particolare quella "forense" ha di fronte a sé delle sfide importanti, ma anche delle tecnologie e degli strumenti di indagine estremamente affilati, quale sarà il contributo del "fattore umano"? Quanto sapremo metterci in gioco lavorando insieme?

È una domanda, ma al tempo stesso un augurio per le nuove generazioni di scienziati forensi.

## I SEMIOCHIMICI DEGLI INSETTI: DALLA PERCEZIONE AL COMPORTAMENTO

**G. S. Germinara**

Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Università degli Studi di  
Foggia  
[giacinto.germinara@unifg.it](mailto:giacinto.germinara@unifg.it)

I semiochimici sono sostanze chimiche segnale, biologicamente attive a dosi molto basse e altamente specifiche, che regolano vari aspetti della vita di relazione degli insetti. Le diverse categorie di semiochimici sono presentate in relazione al ruolo biologico assunto dalle diverse molecole nell'ambito della comunicazione chimica intraspecifica (feromoni) e interspecifica (allomoni). Le specie di insetti che colonizzano i cadaveri in decomposizione, principalmente ditteri e coleotteri, si susseguono secondo una sequenza definita e prevedibile. In tale successione, un ruolo chiave è svolto dai composti organici volatili (VOCs) che si sviluppano nelle diverse fasi di decomposizione, per l'attività biologica che esercitano nei confronti delle diverse specie. Diversi studi hanno caratterizzato, mediante indagini chimiche (gascromatografia abbinata a spettrometria di massa, GC-MS), i VOCs che si sviluppano durante il processo di decomposizione; tuttavia, sebbene possa trovare applicazione nella pratica forense, poco studiata è ancora l'attività biologica di singoli VOCs e di loro miscele nei confronti delle diverse specie di insetti necrofagi. Sono illustrati i meccanismi fisiologici coinvolti nella percezione dei VOCs e le risposte comportamentali indotte negli insetti. Sono descritte, infine, le tecniche elettrofisiologiche (elettroantennografia, EAG; single sensillum recording, SSR), chimico-elettrofisiologiche (gascromatografia abbinata ad elettroantennografia, GC-EAD; gascromatografia abbinata a spettrometria di massa ed elettroantennografia, GC-MS-EAD) e comportamentali (olfattometria) attualmente disponibili per lo studio dell'ecologia chimica di specie di interesse forense.

## APPLICAZIONI DELL'ANALISI DEL MICROBIOMA IN CONTESTO FORENSE

**E. Ventura Spagnolo<sup>1</sup>, C. Mondello<sup>2</sup>, F. D'Aleo<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Sezione di Medicina Legale, Dipartimento ProSaMi "D'Alessandro"- Università degli Studi di Palermo <sup>2</sup> Dipartimento di BIOMORF, Università degli Studi di Messina; <sup>3</sup>Grande Ospedale Metropolitano "Bianchi Melacrino Morelli" UOC Microbiologia e Virologia Reggio Calabria  
[elvira.ventura@unipa.it](mailto:elvira.ventura@unipa.it)

Secondo l'Human Microbiome Project (HMP), un corpo umano sano contiene dieci volte più microbi rispetto alle cellule umane. Le comunità microbiche colonizzano diversi organi del corpo, giocando ruoli fondamentali per la fisiologia ed il metabolismo dell'organismo. Nonostante la vasta conoscenza scientifica del ruolo delle comunità microbiche in un corpo vivente, si sa poco sui cambiamenti microbici che si verificano dopo la morte e questo ha spinto - negli ultimi anni - molti autori a studiare la composizione del tanato-microbioma e le sue possibili applicazioni in campo forense. Sulla base di dette premesse abbiamo ritenuto utile condurre una revisione della letteratura al fine di fornire una panoramica generale dei progressi della microbiologia postmortem, concentrandoci principalmente sul ruolo delle indagini microbiologiche condotte su campioni di organi interni e su fluidi corporei.

In base a specifici criteri di inclusione/esclusione è stata condotta una revisione della letteratura (attraverso PubMed e Scopus) e sono stati selezionati e revisionati 19 articoli (tra il 1999 e il 2017) in cui viene preso in esame il contributo della contaminazione, della trasmigrazione postmortem e dello stato agonico sulla diffusione microbica da campioni di cadaveri.

L'analisi critica di uno studio pilota da noi condotto su un singolo campione di sangue cardiaco prelevato nel corso di 75 autopsie ha dimostrato che, sebbene una singola coltura di campione di sangue post-mortem possa fornire dati utili per valutare la presenza di crescita microbica (specialmente nei casi di infezioni associate all'assistenza sanitaria), l'interpretazione del dato non può prescindere dalla lettura integrata da risultati circostanziali, clinici, autoptici e istologici, entomologici, tenendo presente, altresì, la possibile contaminazione batterica in corso di prelievo. Proprio per questo - anche sulla base dei dati emersi dall'esame della letteratura lo studio - ancora in corso - è stato ampliato mediante l'esecuzione di analisi microbiologiche post-mortem su vari campioni di liquidi (sangue cardiaco e femorale, liquido pericardico, liquido pleurico, urina) e campioni di organi (polmone, fegato, milza).

In conclusione riteniamo che le indagini di microbiologia postmortem possano offrire potenziali e utili elementi al campo forense; è tuttavia fondamentale che si proceda attraverso un approccio multidisciplinare e che vengano risolte alcune problematiche, prima fra tutte la strutturazione di adeguati e standardizzati protocolli di raccolta dei campioni.

## COMUNITA' BATTERICA EPINECROTICA E STIMA DEL PMI

**C.P. Campobasso<sup>1</sup>, M. Galdiero<sup>2</sup>, P. Mascolo<sup>1</sup>, M.E. Della Pepa<sup>2</sup>, F. Martora<sup>2</sup>,  
G. Mastroianni<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Istituto di Medicina Legale, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli" di Napoli; <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Istituto di Virologia e Microbiologia, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli" di Napoli  
[rinomastroianni@gmail.com](mailto:rinomastroianni@gmail.com)

Il microbioma umano è uno dei principali fattori che contribuiscono al processo di decomposizione cadaverica. Data la potenziale utilità relativa alle modificazioni della flora microbica cadaverica nel determinismo dell'intervallo post-mortem, numerosi sono i recenti studi, che, basando l'identificazione dei microrganismi su tecniche di biologia molecolare, efficaci ma costose, si prefiggono l'obiettivo di dimostrare la correlazione fra l'evoluzione della flora microbica e l'avanzamento del PMI. Lo studio si è posto come scopo quello di valutare le potenzialità di una metodica alternativa di identificazione batterica basata sulla spettrometria di massa denominata MALDI TOF.

Il campione è rappresentato da 18 cadaveri (17 maschi, 1 femmina), con età media di 43.2aa e PMI compreso tra 24h e 15gg. Sono stati eseguiti per ciascun cadavere 5 tamponi in corrispondenza di 5 differenti siti anatomici (occhio, orecchio, naso, bocca e retto), successivamente strisciati in appositi terreni di coltura. Sulle colonie batteriche sviluppate è stato poi applicato il metodo MALDI-TOF.

Il presente studio ha rivelato la predominanza dei phyla Proteobacteria e Firmicutes nei cadaveri, sia a PMI breve che quelli a PMI prolungato. Tali dati sono unicamente relativi alle colture ottenute dai siti anatomici del cavo orale e del retto; risultati diametralmente sono stati osservati nelle colture ottenute dall'orecchio e dall'occhio. Fra i Firmicutes, gli Staphylococchi sono risultati il genere prevalente nella cavità nasale, nella bocca e nei meati acustici, seguiti dagli Enterococchi in occhio, bocca e retto. Fra i Proteobacteria, gli *Enterobacter* spp. rappresentano le specie prevalenti in orecchio, occhio e retto, seguiti dalle Pseudomonaceae, maggiormente rappresentati a livello orale e nasale.

I risultati ottenuti dallo studio forniscono dati in linea con quanto presente in letteratura relativamente alle risultanze dei campionamenti orali e rettali. Il metodo MALDI-TOF si è rivelato efficace oltre che più rapido e di certo più economico rispetto alle indagini molecolari sebbene meno sensibile. Tra gli ulteriori limiti dello studio: l'esiguità del campione, l'influenza dei fattori ambientali ed eventuali condizioni morbose pregresse nelle sedi anatomiche esaminate.

## ENTOMOLOGIA FORENSE E NECRO-MICROBIOMA NEL CONTESTO VETERINARIO: UNA NUOVA APPLICAZIONE

**F. Tuccia<sup>1,3</sup>, E. Zurgani<sup>1</sup>, S. Bortolini<sup>2,3</sup>, S. Vanin<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield HD1 3DH, UK; <sup>2</sup>Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Viale G. Amendola 2, 41122, Reggio Emilia, Italy; <sup>3</sup>Gruppo Italiano per l'Entomologia Forense  
[Fabiola.Tuccia2@hud.ac.uk](mailto:Fabiola.Tuccia2@hud.ac.uk)

In Italia e in Europa, in assenza di una politica regolamentata circa l'utilizzo di cadaveri umani a scopo di ricerca, la sperimentazione scientifica nell'ambito delle scienze forensi si avvale dell'utilizzo di modelli animali che tuttavia, in quanto modelli, solo di rado costituiscono l'oggetto di studio *per se*. Il presente lavoro é nato dalla necessita' di disporre di strumenti di indagine a fini veterinario-forensi in supporto alla risoluzione di casi in cui siano coinvolti animali domestici valutando la possibilita' di utilizzare l'approccio innovativo della "microbiologia forense". Scopo della ricerca é stata la valutazione dell' effetto della pelliccia animale nel modulare l'attivita' metabolica e lo sviluppo delle comunita' microbiche che colonizzano carcasse di coniglio utilizzando un protocollo di analisi multidisciplinare volto ad esplorare aspetti ecologici, entomologici e microbiologici del processo di decomposizione. L'esposizione di 6 carcasse di coniglio (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758) tra la primavera e l'estate del 2015 nella regione inglese dello Yorkshire e l'impiego di tecniche biochimiche e di biologia molecolare avanzate (NGS) unitamente ad analisi statistiche hanno rivelato che: 1) la struttura delle comunita' microbiche e la relativa attivita' funzionale cambiano significativamente durante il processo di decomposizione; 2) gli indici ecologici di diversita' e ricchezza delle comunita' batteriche non sono soggetti a differenze temporali statisticamente significative ma, cionnonostante, si osserva una variazione dei taxa; 3) la presenza o l'assenza della pelliccia sulle carcasse non influisce in nessun modo su nessuno dei sopracitati dati, al contrario di quanto osservato in funzione della regione anatomica soggetta ad analisi (cavita' orale, superficie laterale del tronco esposta, superficie laterale del tronco a contatto con il suolo).

L'evidenza di un "micro-necrobioma" che varia nel tempo e nello spazio e' in linea con i dati gia' divulgati dalla letteratura scientifica e pone le basi per la creazione di un modello statistico finalizzato alla stima del PMI a completamento dell' approccio dell' entomologia forense. Previa validazione, l'applicazione ultima e' rivolta alla patologia forense veterinaria qualora si presentino casi in cui animali domestici o selvatici costituiscano parte integrante della scena del crimine.

**INSETTI E OSSA: ANALISI ENTOMOLOGICA E  
ANTROPOLOGICA DELLA COLLEZIONE  
IDENTIFICATA DEL CIMITERO “LA CERTOSA” DI  
BOLOGNA**

**M. Azzoni<sup>1,2,3,4</sup>, M.G. Belcastro<sup>1,5,6</sup>, S. Vanin<sup>2,7</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio di Bioarcheologia e Osteologia Forense - Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali - Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Italia - Museo di Antropologia dell'Università di Bologna; <sup>2</sup>GIEF Gruppo Italiano per l'Entomologia Forense; <sup>3</sup>Accademia Italiana di Scienze Forensi; <sup>4</sup>Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”; <sup>5</sup>Centro di Studi e Ricerche “Enrico Fermi”, Roma; <sup>6</sup>Aix-Marseille Université - EFS-CNRS: Anthropologie bioculturelle Droit Ethique et Santé - Faculté de Médecine Secteur Nord - UMR 7268 - ADES - 51 Bd Pierre Dramard 13344 Marseille Cedex 15; <sup>7</sup>FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, UK.

[morgan.az@virgilio.it](mailto:morgan.az@virgilio.it)

Il seguente lavoro è il risultato dell'attività di tirocinio (laurea triennale) svolta presso il laboratorio di bioarcheologia e osteologia forense del Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali (BIGEA) dell'Università di Bologna avente come oggetto di studio un campione di 26 individui subadulti, di cui 18 maschi e 8 femmine, di età nota compresa fra gli 8 e i 20 anni, deceduti tra il 1898 e il 1937, appartenenti alla Collezione Osteologica, proveniente dal cimitero “La Certosa” di Bologna e custodita presso il Museo di Antropologia del medesimo ateneo. Lo scopo di tale attività, oltre che verificare l'applicabilità dei metodi antropologici comunemente utilizzati per la ricostruzione del profilo biologico (comparando la stima dell'età alla morte con il dato anagrafico), è stato quello di determinare lo stato di conservazione del suddetto campione, attraverso l'entomofauna associata ai resti scheletrici umani studiati, comparandola con quella reperita in altre collezioni osteologiche. L'indagine entomologica ha rivelato che nel campione di Bologna 9 individui su 26 presentavano entomofauna cadaverica; nei campioni di confronto, Parma e Cagli, gli individui colonizzati sono rispettivamente 9 su 10 e 6 su 6. La microfauna cadaverica rinvenuta si presenta ben conservata ed è composta complessivamente da 197 exuvie (15 nel campione della Certosa di Bologna, 10 nel campione di Cagli e 172 in quello di Parma), 97 pupari (17 nel campione della Certosa e 80 in quello di Parma) rinvenuti prevalentemente nelle cavità del cranio. Sono stati rinvenuti anche altri frammenti di coleotteri e un paio di acari. Le exuvie appartengono a *Attagenus pellio* e ad una specie del genere *Anthrenus* (Coleoptera, Dermestidae); i pupari a *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae), a *Hydrotaea capensis* e a *Muscina* sp. (Diptera, Muscidae). I frammenti appartengono alla famiglia Histeridae (Coleoptera) e gli Acari all'ordine Oribatida. La presenza di exuvie e di acari è indice di una contaminazione secondaria. Tale contaminazione è avvenuta, probabilmente, quando i resti sono stati trasportati presso il Museo di Antropologia dell'Università di Bologna. La presenza, invece, di numerosi pupari risale al primo periodo post-mortale o a una “cross contamination” da entomofauna presente su altri cadaveri disposti sullo stesso luogo di giacitura. Tuttavia, la posizione di ritrovamento dei pupari supporta più la prima ipotesi che la seconda. Questo studio rientra in un lavoro più ampio, relativo alla revisione delle collezioni scheletriche umane del museo di antropologia di Bologna. Esso si è rivelato importante sia per testare i metodi antropologici usati per la ricostruzione del profilo biologico sia per valutare lo stato di conservazione dei reperti. In quest'ultimo caso, l'utilizzo dell'entomofauna reperita sui resti analizzati si è rivelata un approccio inedito e innovativo.

## DALLA SCENA DEL CRIMINE AL LABORATORIO: RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI PUPARI PER ANALISI MORFOLOGICHE E MOLECOLARI

**J. Pradelli, G. Giordani, F. Tuccia, S. Vanin**

FLEA, Forensic Laboratory of Entomology and Archaeology, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, UK; GIEF, Gruppo Italiano Entomologia Forense  
[Jennifer.Pradelli@hud.ac.uk](mailto:Jennifer.Pradelli@hud.ac.uk)

L'identificazione morfologica classica dei ditteri, e degli insetti più in generale, si basa sull'osservazione di caratteri unici, peculiari e quindi specie-specifici tramite tecniche di microscopia ottica ed elettronica. Negli ultimi decenni, grazie allo sviluppo di nuove tecnologie, un crescente numero di ricerche ha evidenziato l'utilità dell'approccio molecolare, basato sull'analisi del DNA, per l'identificazione di specie. Tuttavia, sebbene tale approccio sia estremamente utile, esistono ancora numerosi problemi legati alla mancanza di un database completo di confronto e a numerosi errori di corretta assegnazione delle sequenze depositate. È da sottolineare inoltre che non tutti i geni hanno capacità discriminante a livello specifico (si veda COI per le specie del genere *Lucilia*). Inoltre, il materiale genetico può essere altamente degradato o in quantità non sufficienti per le analisi molecolari, come ad esempio in esemplari raccolti da contesti forensi sottoposti a particolari condizioni di temperatura, umidità, etc o da contesti archeologici. Per queste ragioni, l'identificazione morfologica rimane attualmente la più utilizzata nei laboratori. L'identificazione morfologica di ditteri adulti è relativamente semplice grazie alla cospicua letteratura. Al contrario, gli stadi immaturi creano notevoli difficoltà e tra questi i pupari sono stati scarsamente analizzati e mancano totalmente di chiavi identificative specifiche.

I pupari, grazie alla loro natura chimica (chitina) particolarmente resistente alla degradazione, vengono spesso reperiti dalla scena del crimine anche a distanza di molti mesi e anni e in contesti archeologici rappresentano spesso gli unici resti analizzabili anche dopo secoli o millenni. La maggior parte dei caratteri diagnostici si concentrano sulla superficie esterna del pupario, in corrispondenza della regione posteriore (spiracoli posteriori e piastrone anale) e lungo il corpo (spicolazione del settimo segmento ventrale dell'addome).

La presenza di materiali come detriti, fibre, terriccio, liquidi putrefattivi sulla superficie dei pupari rendono la loro identificazione particolarmente difficile.

In questo lavoro sono state testate sei tecniche di pulitura di pupari di ditteri di interesse forense: acqua calda e sapone, sonicazione, acido acetico glaciale, soluzioni di idrossido di sodio, soluzioni di ipoclorito di sodio e la soluzione indicata da Pietro Zangheri nel volume il Naturalista (Hoepli) per la pulizia di coleotteri sporchi (sessione #208).

Le tecniche utilizzate permettono un'identificazione morfologica più accurata senza danneggiare o alterare la natura del campione. Inoltre, alcune tecniche (acqua e sapone, sonicazione e soluzione di idrossido di sodio) non interferiscono in alcun modo nella possibilità di estrarre DNA di buona qualità utile per l'identificazione molecolare.

## INTRODUZIONE AL WORKSHOP

### IDENTIFICAZIONE DEGLI STADI DI SVILUPPO DEGLI INSETTI PRESENTI SUL CADAVERE

**G. Giordani**

FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, UK; GIEF, Gruppo Italiano per l'Entomologia Forense

[Giorgia.Giordani@hud.ac.uk](mailto:Giorgia.Giordani@hud.ac.uk)

La corretta identificazione delle specie è il punto chiave per tutti i campi che si occupano di studi che coinvolgono gli insetti. Per questo motivo negli ultimi anni, accanto all'identificazione morfologica comune, l'approccio molecolare, basato sulla caratterizzazione e l'analisi di specifiche regioni mitocondriali o nucleari, sta diventando sempre più frequente. Nonostante i buoni risultati raggiungibili, la caratterizzazione molecolare è frequentemente nota come un processo invasivo che porta spesso alla distruzione del campione sebbene numerosi sforzi siano stati fatti per mettere a punto tecniche che non prevedano la perdita dei campioni. Una buona conservazione dell'integrità di un reperto entomologico è infatti fondamentale indipendentemente dal campo di lavoro.

Nonostante l'analisi molecolare sia promettente ha ancora delle limitazioni soprattutto legate all'incompletezza delle banche dati molecolari. L'analisi morfologica dei campioni di conseguenza gioca ancora un ruolo fondamentale nell'entomologia forense.

L'analisi della letteratura entomologica evidenzia che il numero di lavori per il riconoscimento degli stadi adulti è estremamente elevato, ed in caso di mancanza di chiavi dicotomiche e comunque presente, nella maggior parte dei casi la descrizione degli esemplari. Non si può dire lo stesso per quanto riguarda gli stadi immaturi che spesso, se non quasi sempre mancano di una descrizione dettagliata. Ci sono poi casi particolari, soprattutto tra i ditteri, in cui per alcune specie le larve (di solito il terzo stadio) sono descritte, ma mancano completamente le descrizioni dei pupari, elementi che nel campo dell'entomologia cadaverica giocano spesso un ruolo chiave.

Il workshop affronterà, da un punto di vista pratico e teorico il riconoscimento di esemplari, a vari livelli tassonomici, così come si possono rinvenire in una scena del crimine.







## **Protocollo nazionale per il prelievo di campioni entomologici a fini forensi (Versione 3.0\_GIEF - Discusso ed approvato dall'Assemblea GIEF in data 17.12.2016)**

### **Premessa**

Lo studio degli insetti a fini forensi è l'oggetto dell'Entomologia Forense.

L'analisi degli insetti che colonizzano i cadaveri e le carcasse animali può infatti fornire utili informazioni circa l'epoca e la stagione della morte, la permanenza e lo spostamento del corpo, la presenza di droghe e veleni. Il rilievo di elementi dimostrativi di un processo di colonizzazione avvenuto in vita (miasi) può inoltre contribuire a delineare situazioni che configurano reati di maltrattamento o abbandono. Oltre a ciò, l'entomofauna cadaverica residua in caso di spostamento di un corpo può permettere di risalire all'identità della vittima. Tuttavia, la qualità del campionamento e della conservazione degli insetti condizionano l'accuratezza delle analisi e conseguentemente delle valutazioni ottenibili attraverso l'approccio entomologico. Analogamente anche la registrazione delle temperature del luogo di repertamento e del cadavere stesso è un requisito fondamentale per ogni tipo di valutazione circa l'epoca della morte.

Sebbene sia sempre auspicabile la presenza di un entomologo forense in sede di sopralluogo o durante l'autopsia, la raccolta e la preparazione iniziale dei campioni deve essere comunque svolta in maniera precisa e corretta da chiunque sia chiamato ad operare sul cadavere o sulla scena del crimine. In ogni caso è auspicabile la piena collaborazione tra i vari esperti in modo tale che l'attività di prelievo di uno non infici la qualità del prelievo degli altri. A tal fine vanno applicate le norme generali per l'accesso al luogo di rinvenimento del corpo/carcassa o scena del crimine ed alla sala autoptica (personale autorizzato, apposito abbigliamento, materiale di raccolta e conservazione monouso e sterile, corretta documentazione, non contaminazione dei luoghi, oggetti, corpi, etc.) e la definizione di una strategia di azione coordinata e condivisa.

Il presente protocollo costituisce una linea guida per la corretta raccolta e fissazione degli insetti associati ad un cadavere o ad una carcassa animale, sia in sede di sopralluogo che in sala autoptica. Il protocollo è inoltre applicabile nei casi di abbandono o maltrattamento per gli insetti associati a individui o animali in vita.

### **Protocollo di Raccolta**

#### **Materiali e strumenti necessari sul campo e in sala autoptica:**

- Materiale per la documentazione (schede di prelievo e matita) e per l'etichettatura dei campioni
- Dispositivi di protezione individuale
- termometro
- macchina fotografica ed eventuale cavalletto
- scala metrica
- contenitori a chiusura ermetica ma con fori di aereazione per esemplari vivi
- contenitori contenenti etanolo (EtOH) 80% (non etanolo/alcool denaturato, no formalina)
- pinzette
- pennellini
- cucchiari di plastica usa e getta
- bollitore o fornellino elettrico o a gas (acqua e pentolino)
- colino a maglia sottile
- sacchi di plastica
- paletta da giardinaggio o vanghetto

- torcia

## 1) Documentazione

Le seguenti informazioni devono essere raccolte dal personale ufficialmente incaricato alle operazioni di sopralluogo per quanto di competenza ovvero comunicate a chi analizzerà i campioni:

**Informazioni generali:** Luogo, data, ora, nome di chi interviene e raccoglie il materiale. Informazioni relative alla modalità e tempi di rinvenimento del cadavere. Se possibile segnalare l'ultima volta in cui il deceduto è stato visto o segnalato vivo, ovvero ogni altro dato anamnestico-circostanziale utile (es, abuso di sostanze stupefacenti, assunzione di terapia farmacologica in corso, etc)

**Caratteristiche del cadavere:** Sesso, età, presenza/assenza vestiti, posizione (esposto, sepolto, impiccato, in acqua, etc), stato di nutrizione (obeso, magro, normotipo, etc.), grado di decomposizione, presenza di ferite, presenza di segni di lesioni da animali. Ove possibile specificare la presenza o meno di caratteri di vitalità delle lesioni.

**Caratteristiche dell'ambiente:** Tipologia dell'ambiente a) ambiente esterno (campo aperto, bosco, siepe, fiume, lago, canale, pozzo, etc), esposizione al sole o all'ombra, b) ambiente chiuso (casa abbandonata, casa abitata, garage, etc), finestre e porte aperte/chiusure, c) altre condizioni (autoveicolo, vagone del treno, container, etc).

Per cadaveri sepolti la profondità e la tipologia del terreno.

**Temperature:** ambiente ad altezza uomo, cadavere, interfaccia cadavere/suolo; temperatura interna ad eventuali masse larvali; presenza di sistemi di riscaldamento o di condizionamento funzionanti e loro distanza dal cadavere.

(vedi scheda allegata – come esempio vedi Amendt et al., 2007)

**Documentazione fotografica** della scena, del cadavere, di eventuali dettagli (masse larvali, raggruppamenti di pupe e/o pupari, segni del passaggio di insetti sulla scena, etc). Fotografie, ad eccezione delle panoramiche, fatte con e senza scala metrica e in posizione ortogonale rispetto all'elemento da fotografare.

**Lista del materiale raccolto** e sede dal quale il materiale è prelevato. Per quanto concerne il cadavere specificare, in particolare, il distretto anatomico dal quale è stato prelevato (da compilarli sia in fase di sopralluogo che dopo l'autopsia).

## 2) Raccolta

Procedere alla raccolta degli esemplari (insetti e altri artropodi) dal corpo e dall'ambiente tenendo separati i campioni provenienti da diversi distretti corporei e da diverse aree del luogo dell'evento. Non soffermarsi solo sulla raccolta delle larve ma prestare attenzione a tutti gli stadi di sviluppo ed in particolare a pupe e pupari. La taglia del campione da raccogliere va da tutti gli esemplari quando meno di cento al 10% dell'intero popolamento quando in numero di migliaia. Vale comunque la regola di raccogliere quanti più esemplari possibile.

### **Raccolta sul corpo**

Uova: si presentano come ammassi bianchi corpuscolati agli orifizi facciali, nelle ferite, nella regione pubica ed anale, nell'interfaccia corpo/terreno. Negli animali particolare attenzione deve essere posta agli spazi interdigitali, alla base della coda, al prepuzio e alle ghiandole perianali. Possono essere raccolte con pennellino o pinzette.

Larve: si presentano con diverse fatture e colorazioni e possono essere presenti, oltre che nelle aree citate per le uova, in tutti i distretti del corpo e tra i vestiti. Larve scure di solito sono predatrici di altre larve, si raccomanda di raccogliere e preservarle nei contenitori separatamente dalle altre tipologie larvali. Tutte le larve, indipendentemente dalle dimensioni vanno raccolte in gran numero tramite pinzette o meglio cucchiai usa e getta.

Pupe: si tratta dello stadio in cui avviene la metamorfosi ma l'insetto è immobile e non si nutre. La loro ricerca non deve essere limitata solo al cadavere ma anche a distanza da esso, nel suolo e in recessi o luoghi protetti (es.: sotto i tappeti, nei battiscopa, etc.). Si tratta di elementi entomologici che rivestono un ruolo chiave per le valutazioni forensi e, pertanto, andrebbero ricercati con cura. Spesso non sono riconosciute e talvolta scambiate per escrementi di roditori. Possono essere raccolte con pinzette, cucchiai di plastica, o isolando parti dei vestiti, capelli o terreno sottostante o intorno al cadavere.

Pupari: rappresentano l'involucro residuo allo sfarfallamento dell'adulto. Hanno la stessa distribuzione delle pupe e pertanto devono essere ricercate anche a distanza dal cadavere e nel suolo e in recessi o luoghi protetti (es.: sotto i tappeti, nei battiscopa, etc.). Come per le pupe anche i pupari sono estremamente importanti nell'ambito delle valutazioni entomologiche ed è indispensabile che vengano ricercati con molta attenzione. Spesso non sono riconosciuti e talvolta scambiate per escrementi di roditori. Possono essere raccolte tramite pinzette, cucchiai di plastica, o isolando parti dei vestiti, capelli o terreno sottostante o intorno al cadavere.

Adulti: spesso difficili da raccogliere perché tendono a scappare se il cadavere è disturbato, la loro raccolta fornisce comunque importanti informazioni. In questo caso può essere utile ricorrere all'impiego di retini entomologici. Utile la raccolta effettuata con pinzette, cucchiai di plastica e pennelli di esemplari adulti vivi e morti rinvenuti sul cadavere o nei pressi di questo.

Altri artropodi: tutti gli altri organismi sia terrestri che acquatici che possono essere presenti sul corpo devono essere campionati con pinzette, cucchiai usa e getta, colini, pennellini, etc.

### **Raccolta dal suolo**

Effettuare un prelievo di suolo o lettiera al di sotto del corpo e un campione dalle immediate vicinanze. I prelievi possono essere fatti con l'ausilio di una paletta da giardinaggio o altro strumento idoneo e conservati in contenitori di plastica di grandi dimensioni e sigillabili o in sacchi di plastica da mantenere aerati (perforare la superficie di copertura dei contenitori per favorire il passaggio d'aria). I campioni così raccolti devono poter essere vagliati per isolare gli insetti nel minor tempo possibile (24 ore), qualora non fosse possibile, mantenere i campioni a 4°C.

### **Fissazione degli esemplari**

Gli esemplari adulti possono essere fissati in etanolo direttamente in loco.

Uova, larve, pupe e pupari possono essere fissati in loco o in laboratorio se in tempi brevi (1-2 ore) e meglio se nel trasporto conservati a basse temperature (borsa termica).

Tutti i campioni devono essere opportunamente etichettati in loco. Per l'etichettatura si consiglia di utilizzare una matita poiché la fuoriuscita di etanolo e di liquami putrefattivi può rendere non più intellegibile le scritte tracciate con penna o pennarelli indelebili.

Ad eccezione dei pupari che si possono mantenere a secco, suddividere i campioni di uova, larve e pupe in due. Un campione va fissato in etanolo dopo passaggio in acqua bollente, l'altro verrà mantenuto in allevamento. Qualora si debba procedere ad analisi tossicologiche parte dei campioni deve essere conservata a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

In caso vi sia la necessità di dover differire le procedure precedenti, conservare i campioni non fissati in congelatore a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Congelare i campioni a  $-20^{\circ}\text{C}$ .** Questa metodica è considerata ideale per le analisi tossicologiche, ma, avendo carattere conservativo, non preclude l'utilizzo di altre metodiche di conservazione e di altri metodi di analisi.

Inserire i campioni entomologici all'interno di una provetta, adeguatamente etichettati e trasferirli in congelatore a  $-20^{\circ}\text{C}$  mantenendo tutti i campioni prelevati dallo stesso caso insieme (contenitore di cartone, scatola di plastica, sacchetto di plastica resistente, etc).

**Fissazione del campione in etanolo.** Questa metodica è indicata per le analisi di natura genetica, per le analisi morfologiche e di identificazione di specie ma non per le analisi tossicologiche. Strumenti necessari: bollitore, acqua, etanolo 80%, colino, provette con tappo ermetico. È una procedura indicata per: uova, larve e pupe.

Portare ad ebollizione l'acqua e attendere che la temperatura scenda di qualche grado (ottimale  $80^{\circ}\text{C}$ ). Mettere gli esemplari in un apposito contenitore (becher) quindi aggiungere l'acqua bollente. Dopo 30-60 secondi rimuovere l'acqua utilizzando un colino, raffreddare gli esemplari con acqua fredda e trasferirli in un contenitore/provetta a chiusura ermetica con etanolo 80%.

**Allevamento del campione.** Questa procedura si riferisce al campione prelevato vivo nel luogo di ritrovamento del cadavere, dal cadavere stesso o nel vivente (es.: casi di miasi). Strumentazione necessaria: contenitori a chiusura ermetica (sono ottimi i contenitori utilizzati per il trasporto di larve per la pesca), carta assorbente, paté per gatti o simile. Inserire all'interno del contenitore il cibo per gatti trasferendo quindi le uova o le larve vive chiudendo il contenitore con della carta da laboratorio fissata con un elastico. Evitare di mettere troppi esemplari nel contenitore di allevamento.

Trasferire i contenitori all'interno dell'incubatore a temperatura costante ( $25^{\circ}\text{C}$ , LD 12:12), altrimenti lasciare a temperatura ambiente registrando la temperatura ogni 24 ore. Verificare che il cibo sia sempre disponibile e controllare che gli esemplari non fuoriescano dai contenitori.

Le pupe non necessitano di cibo, quindi possono essere mantenute in contenitori chiusi con carta da laboratorio trattenuta da un elastico fino allo sfarfallamento degli adulti. A sfarfallamento avvenuto gli adulti possono essere uccisi per congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  e conservati a secco o in etanolo. I pupari possono essere conservati a secco.

Le temperature di allevamento e le date di schiusa delle uova, impupamento e sfarfallamento devono essere puntualmente annotate in apposito registro.

### **Raccolta in sala autoptica**

Se possibile, effettuare un secondo prelievo di materiale seguendo le indicazioni precedenti.

Particolare attenzione va posta all'interno delle cavità, degli organi e di eventuali ferite del corpo e tra i vestiti e le scarpe. Non deve essere tralasciata una raccolta dalla body bag o da altro contenitore

utilizzato per il trasporto del corpo. Mantenere un registro con le temperature alle quali il cadavere è stato mantenuto dal suo ritrovamento fino all'autopsia, verificando le temperature delle celle.

### 3) Casi Particolari

In caso di cadavere in acqua registrare la temperatura del cadavere, dell'aria e dell'acqua. Prestare attenzione a esemplari che possono allontanarsi dal corpo una volta che questo viene trasferito sulla terra.

In caso di cadaveri impiccati o sospesi campionare il terreno sotto il punto di impiccamento e nelle immediate vicinanze. Indicare l'altezza del corpo e il suo eventuale contatto con il terreno o con altre strutture.

In caso di cadaveri sepolti, è auspicabile che il recupero del corpo avvenga secondo le modalità dell'archeologia forense. Gli insetti devono essere prelevati non solo dal corpo ma anche dal materiale di scavo tramite setacciatura. I campioni devono essere suddivisi per unità stratigrafiche e per posizione rispetto al corpo o in base ad altri elementi caratterizzanti lo scavo.

