

Roma
2015



I Incontro Nazionale di
Entomologia Forense

**I Incontro
Nazionale di
Entomologia
Forense**

GIEF
2015

19 Dicembre 2015, Casa dell'Aviatore, Viale dell'Università 20
Roma

Roma
2015



I Incontro Nazionale di
Entomologia Forense



Comitato Scientifico

Stefano Vanin

Carlo Campobasso

Francesco Porcelli

Valentina Bugelli

Elisa Arena

Sara Bortolini

Luigi Mastrogiuseppe

Comitato Organizzatore

Elisa Arena

Stefano Vanin

Valentina Bugelli

Fabiola Tuccia

Giorgia Giordani

Programma

9:00	Registrazione
9.30-9.45	S. Vanin, V.L. Pascali Inizio dei Lavori e Saluti
9.45	Presentazioni Orali I
9.45-10.30	S. Vanin Lo stato dell'Entomologia Forense in Italia, in Europa e nel mondo: nuove sfide e vecchi problemi
10.30-10.45	S. Bortolini Approccio molecolare all'identificazione di specie di interesse forense per la stima del mPMI
10.45-11.00	E. Arena Estrazione e Caratterizzazione di DNA umano da reperti entomologici nella scena del crimine
11.00-11.20	Caffè e Poster Section I
11.25	Presentazioni Orali II
11.25-11.45	V. Bugelli Estrazione e identificazione di droghe e veleni da materiale entomologico per la definizione della causa di morte
11.45-12.00	L. Manelli Effetto di specie alloctone acquatiche sulla decomposizione e artefatti su carcasse animali e cadaveri umani
12.00-12.30	L. Mastrogiuseppe Applicazioni dell'approccio entomologico in casi di Veterinaria forense
12.30-13.15	C. Campobasso Advance in PMI estimation
13.15-14.45	Pranzo e Poster Section II
14.45-15.45	Assemblea annuale GIEF "L'associazione che vorrei"
15.45-16.15	S. Vanin Tecniche di repertamento e preparazione del materiale entomologico : casi attuali e old/cold cases
16.15-16.30	Chiusura dei lavori

Roma
2015



I Incontro Nazionale di
Entomologia Forense

PRESENTAZIONI ORALI E POSTER

LO STATO DELL'ENTOMOLOGIA FORENSE IN ITALIA, IN EUROPA E NEL MONDO. NUOVE SFIDE E VECCHI PROBLEMI.

S. Vanin

FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield, HD1 3DH,
UK; GIEF, Gruppo Italiano per l'Entomologia Forense
stefano.vanin@hud.ac.uk

Forense o Non Forense? Mi perdoni il buon Shakespeare se abuso dell'Amleto per porre l'attenzione su un concetto che sta sfuggendo di mano a chi si occupa, o dice di occuparsi, di Entomologia Forense. L'Entomologia Forense, come quasi tutte le altre discipline forensi è un'applicazione delle conoscenze specifiche della materia (l'Entomologia) a casi giudiziari, siano essi civili o penali. Purtroppo negli ultimi anni il termine forense è stato inflazionato e utilizzato senza motivo in studi di ecologia, filogenesi e di biologia generale delle specie. Riportare la materia dentro i giusti binari è fondamentale anche in vista di offrire un miglior servizio al sistema investigativo e giudiziario.

A livello internazionale la disciplina sta crescendo su molti aspetti e in particolare, su spinta di alcuni gruppi americani verso lo studio del microbioma. Molti aspetti chiave della disciplina devono ancora essere tuttavia risolti quali quelli relativi alla conservazione dei reperti, alla identificazione di specie sorelle e alla definizione di database di sviluppo su scala locale.

E in Italia? In Italia purtroppo l'Entomologia Forense è oggetto di seminari e lezioni, spesso condotte da persone con poche nozioni di entomologia e ancor più spesso con nessuna conoscenza del sistema forense. Per far fronte a questa situazione il GIEF sta cercando di aumentare la propria visibilità e diffusione nel territorio senza mancare agli standard di qualità e serietà che fin dalla fondazione hanno voluto caratterizzare l'associazione.

**APPROCCIO MOLECOLARE ALL'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE DI
INTERESSE FORENSE PER LA STIMA DEL mPMI****S. Bortolini^{1,3}, L.Maistrello¹, S.Vanin^{2,3}**

¹Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, via G. Amendola 2, Pad. Besta, 42122, Reggio Emilia; ²FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield, HD1 3DH, UK; ³GIEF, Gruppo Italiano per l'Entomologia Forense sarabortolini@gmail.com

La corretta identificazione di specie è un passaggio fondamentale in entomologia forense. Questa disciplina si occupa dello studio degli insetti associati ai cadaveri con lo scopo primario di stimare il tempo intercorso dal decesso, o meglio il tempo di colonizzazione, definito anche come mPMI. Per intervalli di tempo relativamente brevi (settimane/mesi), la stima del mPMI si basa sulla determinazione dello stadio di sviluppo delle mosche che per prime colonizzano il cadavere. Essendo il tasso di sviluppo dei ditteri specie-specifico, la corretta identificazione delle specie diventa *conditio sine qua non* per una corretta stima del mPMI. L'identificazione morfologica del campione non sempre risulta possibile o semplice, a causa della similarità delle caratteristiche distintive di alcune specie e della mancanza di chiavi identificative, soprattutto se si considerano gli stadi larvali. In parallelo, l'approccio molecolare può aiutare a superare questo limite dell'identificazione morfologica fornendo una precisa diagnosi di specie, sebbene le informazioni genetiche di alcuni insetti non siano complete. In questo studio, è stata valutata la capacità dei metodi molecolare e statistico (filogenesi) di identificare correttamente campioni di ditteri d'interesse forense. A tale scopo sono stati analizzati ottantaquattro esemplari campionati tra il 2011 e il 2014 in Italia (Emilia Romagna e Veneto), Inghilterra (West Yorkshire) e in Belgio. Inizialmente, i campioni sono stati identificati utilizzando l'approccio morfologico, in seguito sono stati processati per l'identificazione molecolare. Sono stati analizzati quattro diversi geni: due mitocondriali (COI e ND5) e due nucleari (EF-1 α e PER). Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle già presenti in banca dati (GenBank) utilizzando BLAST. Le stesse sequenze sono state utilizzate per costruire alberi filogenetici con il metodo del "Maximum likelihood" (ML). Degli ottantaquattro campioni analizzati, il 61,9% è stato campionato in Italia mentre il 34,5% in Inghilterra e i rimanenti in Belgio. I campioni analizzati appartengono a quattordici diverse specie, di cui *Calliphora vicina* e *Lucilia sericata* sono risultate le più rappresentate con, rispettivamente, il 29,8% e il 27,4% del totale. L'analisi delle sequenze ha evidenziato una corretta corrispondenza dell'identificazione morfologica con quella molecolare nel 87,5% dei casi per il gene COI, 72,5% per il gene ND5, 77,1% per il gene EF-1 α e 67,9%, per il gene PER. L'analisi filogenetica è risultata risolutiva per la maggior parte delle specie considerate ad eccezione delle specie appartenenti al genere *Lucilia*. L'analisi di "super geni" derivati dall'unione di queste quattro sequenze ha migliorato la capacità identificativa dell'approccio molecolare. In un articolo pubblicato recentemente da GilArriortua *et al* (2015), l'analisi di una porzione più ristretta del DNA mitocondriale, corrispondente al gene Cyt-b, mostra una buona capacità identificativa delle specie di calliforidi tipici della penisola iberica, in particolare delle specie appartenenti al genere *Lucilia*, dovuta all'elevata variabilità inter-specifica propria di questo gene. Alla luce di diversi risultati pubblicati in letteratura relativi a diversi geni (mitocondriali e nucleari), l'utilizzo dell'approccio molecolare come sostitutivo o coadiuvante del classico metodo morfologico, in particolare per quanto riguarda specie "sorelle", deve trovare ulteriori conferme, che possono avere esito in un ampliamento delle banche dati genetiche relative a specie d'interesse forense.

ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI DNA UMANO DA REPERTI ENTOMOLOGICI NELLA SCENA DEL CRIMINE

E. Arena^{1,3}, Daniela Marchetti¹, Ilaria Boschi¹, S. Vanin^{2,3}

¹Istituto di Sanità Pubblica, Sezione di Medicina Legale, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma;

²FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield, HD1

3DH, UK; ³GIEF, Gruppo Italiano per l'Entomologia Forense
elisarena@libero.it

Nell'ambito dell'entomologia forense l'uso della genetica e delle tecniche di biologia molecolare è stato riservato finora soprattutto alla identificazione delle specie dei ditteri cadaverici, attraverso l'estrazione del DNA mitocondriale degli insetti. Gli insetti di interesse forense possono rappresentare una fonte di materiale genetico, ovvero di DNA, utilizzabile a scopo identificativo, per la specie necrofaga, ma anche per il cadavere su cui questo insetto si è sviluppato. Tali applicazioni si basano essenzialmente sull'assunto che i ditteri, nutrendosi freneticamente dei tessuti organici in decomposizione, introducono nel loro apparato digerente materiale genetico del cadavere di cui si cibano e ne accumulano grandi quantità in un organo-deposito del loro sistema digerente chiamato crop dove la materia organica rimane relativamente indigerita e, quindi, meno degradata rispetto a quella presente nello stomaco e/o nel canale intestinale. Dal contenuto del crop larvale è stato possibile estrarre sia DNA mitocondriale che nucleare. L'uso delle larve di ditteri quale fonte alternativa di materiale genetico umano è in sostanza dato certo e validato e gli studi condotti finora in merito alla estrazione di DNA umano dai ditteri, hanno candidato quale migliore campione di profili genetici umani il canale alimentare delle larve al terzo stadio. Tuttavia accanto al ritrovamento di larve è possibile altresì rinvenire sul "luogo del crimine" pupari vuoti abbandonati dall'insetto adulto o frammenti di questi e, soprattutto nei casi in cui il cadavere è stato spostato da un luogo ad un altro oppure non viene affatto ritrovato, tali resti di insetti necrofagi (pupari vuoti) possono rappresentare l'unica "traccia" che testimonia la presenza o il passaggio di un corpo in un dato luogo. Nel lavoro sono stati analizzati quindi alcuni pupari prelevati da due casi autoptici giunti alla osservazione dell'Istituto di Medicina Legale nel periodo compreso tra giugno-agosto 2011. Previa decontaminazione dei campioni si è proceduto all'analisi molecolare sui pupari vuoti attraverso due metodiche di uso comune: CHELEX® 100 (Bio-Rad) e PrepFiler™ (AB). Quest'ultima metodica ha permesso di isolare dai pupari prelevati in entrambi i casi profili di ottima qualità ben interpretabili, identici tra loro ed identici al confronto analizzato (cadavere).

In conclusione è stato possibile per la prima volta identificare materiale umano da pupari vuoti, dimostrando di conseguenza come i "pupari vuoti", abbandonati dall'insetto adulto nel momento del c.d. sfarfallamento, possono essere un valido substrato per l'estrazione di DNA umano e l'analisi STR per la tipizzazione del DNA estratto mediante l'utilizzo delle tecniche di genetica forense.

ESTRAZIONE E IDENTIFICAZIONE DI DROGHE E VELENI DA MATERIALE ENTOMOLOGICO PER LA DEFINIZIONE DELLA CAUSA DI MORTE

V. Bugelli^{1,3}, D.Forni¹, C. Toni¹, L. Papi¹, S. Fornaro¹, S.Chericoni¹, F. Stefanelli¹, M. Giusiani¹, R. Domenici¹, S. Vanin^{2,3}

¹Istituto di Medicina Legale Università di Pisa; ²FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield, HD1 3DH, UK; ³GIEF, Gruppo Italiano per l'Entomologia Forense
vale.buge@gmail.com

L'entomotossicologia è l'applicazione delle procedure analitiche tossicologiche agli insetti. L'entomotossicologia forense si basa sul principio che gli insetti nutrendosi dei tessuti cadaverici, introducono nel loro metabolismo anche le sostanze venefiche o tossiche eventualmente assunte in vita dal soggetto. L'applicazione principale della metodologia si ha nei cadaveri in avanzato stato di decomposizione dove i substrati routinariamente utilizzati per le analisi tossicologiche convenzionali possono aver subito degradazione, contaminazione oppure risultare assenti. Nel presente lavoro sono stati esaminati i casi afferenti all'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Pisa, nel periodo intercorso tra il giugno-luglio 2009 ed il maggio 2012. Sono stati campionati gli insetti presenti sui cadaveri. Una parte di essi sono stati posti in allevamento a scopo di identificare la specie, una parte è stata fissata in etanolo 80% dopo uccisione in acqua calda (non bollente), secondo le linee guida EAFE (Amendt et al, 2007). La parte destinata allo studio tossicologico è stata conservata in congelatore a -20°C sino al compimento delle indagini tossicologiche, come da protocollo linee guida precedentemente citate. Le larve (500 mg) sono state inserite all'interno di una provetta contenente sfere di ceramica alla quale sono stati aggiunti 3ml di tampone fosfato a pH 5,2 e gli standard interni deuterati corrispondenti alle sostanze da ricercare. Mediante l'ausilio di un omogenizzatore modello Precellys (Bertin, France) si è proceduto alla completa omogenizzazione del campione che è stato successivamente centrifugato. Il surnatante è stato recuperato, sottoposto ad estrazione in fase solida (SPE) e l'estratto ottenuto è stato quindi portato a secco sotto flusso d'azoto. Si è proceduto quindi alla derivatizzazione con anidride pentafluoropropionica/pentafluoropropanolo (PFPA/PFPOH) ed infine alla analisi gascromatografica con detector di massa (GC-MS). Le analisi tossicologiche effettuate sul materiale entomologico (larve) hanno permesso di evidenziare la presenza di cocaina in un caso, di cocaina ed eroina in un secondo caso e di benzodiazepine in un terzo caso.

L'entomotossicologia permette di rilevare la presenza di sostanze venefiche o tossiche negli insetti colonizzatori dei cadaveri. Questo aspetto ha una duplice rilevanza: da una parte l'individuazione della sostanza permette una corretta determinazione del mPMI, data l'influenza che alcuni tipi di sostanze hanno nelle tempistiche di sviluppo degli insetti (in questo caso cocaina, eroina, benzodiazepine). Dall'altra parte la rilevazione di una determinata sostanza è possibile anche nei casi in cui i substrati routinariamente utilizzati o sono assenti (per l'avanzato stato di decomposizione del cadavere), oppure sono soggetti a forti contaminazioni. In generale non si può tralasciare di sottolineare la facilità di esecuzione di tali indagini dovuta al metodo impiegato, identico a quello utilizzato per l'analisi degli altri substrati. Da segnalare, però, ad oggi, l'impossibilità di una correlazione quantitativa tra la sostanza tossica riscontrata e la probabile quantità assunta in vita dal soggetto.

EFFETTO DI SPECIE ALLOCTONE ACQUATICHE SULLA DECOMPOSIZIONE ED ARTEFATTI SU CARCASSE ANIMALI E CADAVERI UMANI

L. Manelli¹, S. Vanin^{1,2}, P. Fais³, L. Maistrello^{1,4}

¹ GIEF (Gruppo Italiano Entomologia Forense); ² FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield, HD1 3DH, UK; ³ Department of Public Health and Community Medicine, Unit of Forensic Medicine, University of Verona; ⁴ Dipartimento di Science della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Reggio Emilia; luca.manelli.90@gmail.com

In entomologia forense, l'attenzione della letteratura scientifica si è sempre concentrata sulla colonizzazione in ambiente terreno, mentre pochi sono i dati relativi alle specie presenti in ambiente marino e soprattutto d'acqua dolce. Il frequente ritrovamento di corpi in specchi d'acqua dolce o fiumi, rende tuttavia lo studio della colonizzazione in tale ambiente di fondamentale importanza, specie per la definizione del mPMI, del PMSI (Post Mortem Submersion Interval) e della causa di morte. In precedenti esperimenti è stata verificata l'influenza della specie alloctona *Procambarus clarkii* (Girard, 1852), noto anche come gambero della Louisiana, nella colonizzazione di carcasse in acqua dolce. Dopo la sua introduzione in Europa, la specie ha attraversato una rapida espansione in tutti gli habitat colonizzati, diventando una delle specie cruciali negli equilibri ecologici.

Lo scopo della ricerca è definire il ruolo di *P. clarkii* nella decomposizione di corpi in acqua dolce tramite lo studio delle ferite inflitte dai gamberi sul corpo e delle dinamiche di popolazione della specie in relazione allo stato di decomposizione, al periodo dell'anno ed alla posizione del corpo nella colonna d'acqua.

Lo studio, condotto a Nonantola (MO), si è articolato in quattro cicli di esperimenti tra Luglio 2013 e Luglio 2014. Per ogni esperimento, cinque carcasse di suinetto (*Sus scrofa*, L) sono state posizionate in nasse all'interno di uno specchio d'acqua artificiale. Seguendo un protocollo predefinito, per ogni campionamento è stato rilevato il numero di esemplari di *P. clarkii* su ogni carcassa, oltre al tipo ed al profilo delle ferite causate dalla loro azione.

I risultati hanno messo in evidenza che in tutti gli esperimenti, eccetto quello invernale, i Crostacei hanno attaccato la carcassa dopo poche ore dopo il posizionamento, con lacerazioni di forma sferica fino 20-30mm. Un successivo incremento in numero e dimensione di queste ferite, con seguente lacerazione del derma ed attacco degli organi interni, ha portato alla completa scheletrizzazione dopo circa un mese. Per quanto riguarda la popolazione di *P. clarkii*, si sono generalmente potuti osservare due picchi nella popolazione: nel giorno del posizionamento delle carcasse ed alla fine dello stadio di galleggiamento, con la carcassa nuovamente sul fondale. L'esperimento invernale, invece, si è protratto per un periodo più lungo (7 mesi), a causa di una minore attività dei gamberi causata dalle basse temperature. Lo studio ha mostrato la crucialità in ambito forense di *P. clarkii* per due motivi: da una parte, comprendere l'andamento della colonizzazione in relazione a stadio decompositivo, periodo dell'anno e posizionamento del corpo nella colonna d'acqua è importante nella stima del mPMI e del PMSI, mentre dall'altra parte conoscere il tipo e la distribuzione delle ferite è importante per una corretta determinazione della causa di morte. Nella presente relazione viene presentato anche un caso di cadavere rinvenuto in un canale nel Nord Italia con evidenti lacerazioni causate da esemplari di *P. clarkii* rinvenuti all'interno del cadavere al momento del recupero del corpo.

**APPLICAZIONI DELL'APPROCCIO ENTOMOLOGICO IN CASI DI
VETERINARIA FORENSE**

L.Mastrogiuseppe

Servizio Veterinario ASRM, Campobasso
luigimastrogiuseppe@alice.it

L'entomologia forense trova interessanti ed importanti applicazioni nel campo veterinario, sebbene la letteratura sia povera di articoli centrati su questo tema. Esempi di stima dell'epoca del decesso utilizzando l'approccio entomologico sono quelli riferibili a carcasse di orsi morti in seguito a bracconaggio (Canada), avvelenamento e cause naturali (Italia). I risultati di questi casi si sono dimostrati di grande importanza e hanno fatto crescere l'interesse verso la materia tra gli operatori del settore.

Nella presente relazione sono illustrati e discussi alcuni casi in cui l'entomologia forense è stata applicata su animali al fine di smascherare frodi, maltrattamenti o al contrario per dimostrare la buona condotta dei proprietari degli animali.

L'approccio entomologico in veterinaria richiede, come nella patologia forense, grande cura nella raccolta e documentazione dei dati nonché un corretto prelievo e preparazione degli esemplari. Visti i luoghi dove i prelievi vengono effettuati, particolare cura deve essere prestata alla preparazione del materiale da portare sul luogo di giacitura delle carcasse che talvolta si può raggiungere solo dopo ore di cammino.

ADVANCE IN PMI ESTIMATION

C.Campobasso

Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute, Università degli Studi del Molise, Via Francesco De Sanctis,
1, 86100 Campobasso; GIEF (Gruppo Italiano Entomologia Forense);
carlo.campobasso@unimol.it

Nessun problema in medicina legale è stato oggetto di indagini sperimentali e studi quanto quello sulla stima dell'epoca della morte ovvero dell'intervallo post-mortale (PMI). Nonostante gli innumerevoli sforzi, i risultati ottenuti non sono stati mai così soddisfacenti e non hanno ottenuto quella naturale ricaduta nella pratica forense mondiale quanto quelli realizzati nel campo della entomologia cadaverica. Prova evidente di ciò è l'esplosione bibliografica che ha caratterizzato questa disciplina a partire dagli anni '80 con oltre 1.000 contributi scientifici su riviste indicizzate, pubblicate da ricercatori provenienti da oltre 50 Paesi e innumerevoli testi di riferimento. Da questo punto di vista la stima del PMI attraverso il metodo entomologico consente una affidabilità nettamente superiore a quella che utilizza le classiche modificazioni cadaveriche (specie nel tardo periodo post-mortale), in quanto ne supera il carattere empirico e la forte soggettività attraverso l'uso di parametri oggetti e facilmente riproducibili quali, ad esempio, la replicazione dei tempi di crescita di alcune specie (Ditteri e Coleotteri in particolare) di maggiore interesse forense. Attualmente gli entomologi forensi usano stimare i tempi di sviluppo dei Ditteri cadaverici attraverso diversi modelli di calcolo, integrati poi dalle innumerevoli variabili in grado di interferire su questi. Nonostante tali premesse e la redazione di protocolli e linee guida da parte di autorevoli Società Scientifiche, persistono alcune criticità di metodo. La relazione avrà modo di riassumere, in particolare, le criticità provenienti da alcuni modelli di calcolo (tra cui in particolare quello che utilizza gli ADD (Accumulated Degree Days) e/o gli ADH (Accumulated Degree Hours)) alla luce anche di alcune recenti discussioni sorte nella comunità scientifica relativamente alla definizione stessa di PMI (Post-Mortem Interval) e alle potenzialità della entomologia forense nelle indagini cadaveriche.

**ENTOMOFAUNA CADAVERICA: STUDIO ENTOMOLOGICO CONDOTTO
SU RESTI SCHELETRICI UMANI DELLA COLLEZIONE IDENTIFICATA MODERNA
(XIX-XX sec.) DEL MUSEO DI ANTROPOLOGIA DELL'UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

M. Azzoni¹, M.G. Belcastro^{1,2}, S. Vanin^{3,4}

¹Laboratorio di Bioarcheologia e Osteologia Forense, Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Alma Mater Studiorum Università di Bologna; Museo di Antropologia dell'Università di Bologna; ²Centro di Studi e Ricerche "Enrico Fermi", Roma; ³FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield, HD1 3DH, UK; ⁴GIEF, Gruppo Italiano per l'Entomologia forense
morgan.az@virgilio.it

Il seguente lavoro è basato sullo studio dell'entomofauna cadaverica rinvenuta durante l'analisi antropologica di resti scheletrici umani provenienti dalle collezioni scheletriche identificate (per età, sesso e causa di morte) del Museo di Antropologia dell'Università di Bologna. In particolare sono stati esaminati 30 individui su 439 scheletri provenienti dalla Certosa di Bologna, 10 su 10 e 6 su 6 provenienti rispettivamente dai cimiteri di Parma e Cagli (PU).

L'obiettivo è di verificare se la medesima entomofauna cadaverica, era presente in individui inumati in luoghi e anni diversi, contribuendo così ad aggiungere informazioni circa lo stato di conservazione dei reperti scheletrici.

L'analisi entomologica si è concentrata principalmente nelle cavità del cranio (forame e fossa giugulare, canale carotideo, cavità orbitali, fossa lacrimale e fossa nasale), sui resti di capigliatura e su resti di tessuti molli secchi presenti in alcuni distretti scheletrici.

L'entomofauna cadaverica, rinvenuta, documentata e classificata attraverso l'osservazione microscopica (Nikon SMZ745T- Nikon digital sight DS-VI1), è ben conservata ed è composta complessivamente da 192 exuvie, 97 pupe e altri piccoli insetti riconducibili all'entomofauna di interesse forense. Le exuvie sono state attribuite alla famiglia Dermestidae (*Attagenus* sp., *Attagenus pellio* e *Anthrenus* sp.), mentre le pupe, alla famiglia Muscidae (*Ophyra* sp., *Ophyra capensis* e *Muscina* sp.) e Calliphoridae (*Calliphorasp.*, *Calliphora vicina*).

Sono stati rinvenuti altri insetti, principalmente coleotteri, appartenenti alla famiglia Histeridae.

Molto spesso, la presenza di exuvie di *Attagenus* e *Anthrenus* (Dermestidae) sono sinonimo di una contaminazione secondaria, come potrebbe essere nei casi in esame. La contaminazione, probabilmente, è avvenuta quando i resti degli inumati sono stati trasportati presso il Museo di Antropologia dell'Università di Bologna. La presenza, invece, di numerosi pupari, la maggior parte rinvenuti nelle cavità del cranio, sono da imputarsi al primo periodo post-mortale.

**STIMA DEL TEMPO DEL DECESSO E DELLA CAUSA DI MORTE DI UN CADAVERE
RITROVATO NELL'ENTROTERRA VIBONESE (ITALIA, CALABRIA)**

K. Bisogni^{1,3}, S. Vanin^{2,3}

¹Vibo Valentia; ²FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield, HD1 3DH, UK; ³GIEF, Gruppo Italiano per l'Entomologia forense
katiusha.bisogni@libero.it

Nel mese di agosto del 2013, veniva rinvenuto in aperta campagna in provincia di Vibo Valentia, un cadavere di uomo di 61 anni in stato di trasformazione speciale con tessuti di aspetto e consistenza coriacei e parzialmente scheletrizzato, denunciato come scomparso da circa due mesi. Il cadavere era in posizione semi seduta parzialmente ricoperto da vegetazione, in un'intercapedine tra un casolare e un muro in cemento. Dal casolare pendeva una corda utilizzata per impiccarsi. Il cadavere era diminuito di volume e di peso, "ridotto a pelle e ossa" con le parti molli che avevano assunto colore bruno nerastro di consistenza pergamenacea e anelastica; i tegumenti erano molto sottili e aderivano allo scheletro. L'integrità del cadavere era stata modificata anche dall'azione di muffe e dalla attività degli insetti. L'esame necroscopico ha consentito di escludere lesioni dei tegumenti esplorati e del tessuto osseo, e in particolare la scansione Tac del cranio non ha rilevato corpi estranei di densità metallica da riferire a piombo balistico e lesioni fratturative. Anche le analisi tossicologiche sono risultate negative a tutte le molecole ricercate oppiacei, cocaina, metadone, anfetamine e cannabinoidi. Non è stato possibile individuare la causa della morte in quanto gli organi e i visceri erano completamente distrutti dai processi di trasformazione cadaverica. Purtroppo gli esami istopatologici del frammento cutaneo della regione cervicale prelevato in sede di autopsia hanno evidenziato epidermide escoriata e modesto infiltrato emorragico del derma superficiale. Al momento del sopralluogo e durante l'autopsia sono state raccolte numerose specie di insetti (Tab.1) che hanno permesso una stima del tempo di colonizzazione (mPMI) fra i 1-2 mesi dal ritrovamento del corpo. Tale stima è stata resa possibile grazie alla collocazione in loco di un data-logger che ha permesso di correggere i dati della stazione meteorologica più vicina. Alla luce dei dati emersi dal sopralluogo (corda legata alla trave e i relativi rilievi metrici), nonché dei dati istopatologici (segnatamente del reperto relativo all'infiltrazione emorragica dei tessuti della regione del collo), è stato possibile ipotizzare, come possibile causa del decesso, una morte secondaria da impiccamento con colonizzazione avvenuta 1-2 mesi prima del ritrovamento, dato in accordo con la denuncia di scomparsa formalizzata dai familiari.

Tab. 1 - Esemplari presenti sul cadavere prelevati durante l'autopsia ed il sopralluogo (A: adulto; E.: exuvia; L: larva; P: pupa; Pu: Pupario; ? impossibile distinguere tra le due specie dello stesso genere).

Taxon	Stadio di sviluppo
Diptera, Calliphoridae	
<i>Lucilia sericata</i>	A
<i>Chrysomya albiceps</i>	P, Pu, A
Diptera, Muscidae	
<i>Hydrotaea dentipes</i>	L, P, A
Diptera, Fanniidae	
<i>Fannia scalaris</i>	L
Diptera, Piophilidae	
Gen. sp.	L, P, A
Diptera, Phoridae	
<i>Megaselia scalaris</i>	A
Diptera, Stratiomyidae	
<i>Hermetia illucens</i>	L, P, Pu
Coleoptera, Cleridae	
<i>Necrobia ruficollis</i>	A
<i>Necrobia rufipes</i>	A
<i>Necrobia violacea</i>	A
Coleoptera, Dermestidae	
<i>Dermestes frishii</i>	L?, A
<i>Dermestes undulatus</i>	L?, A
Coleoptera, Silphidae	
<i>Necrodes littoralis</i>	A
Coleoptera, Histeridae	
<i>Carcinops pumilio</i>	A
<i>Saprinus</i> sp.	A
Coleoptera, Staphylinidae	
<i>Aleochara</i> sp.	A
<i>Philonthus</i> spp.	A
Hymenoptera, Pteromalidae	
<i>Nasonia vitripennis</i>	A
Hymenoptera, Formicidae	
<i>Crematogaster scutellaris</i>	A

EFFETTI DEL CONGELAMENTO SULLE DIMENSIONI DI LARVE DI DITTERI DI INTERESSE FORENSE

S. Lo Pinto¹, S.J. King², S. Vanin^{2,3}

¹Dipartimento di Medicina Legale, Università degli Studi di Genova; ²FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield, HD1 3DH, UK; ³GIEF, Gruppo Italiano per l'Entomologia forense
zialopy@gmail.com

La conservazione dei campioni entomologici dopo il prelievo in sopralluogo o in autopsia costituisce il primo passo per una corretta stima del tempo della colonizzazione, specialmente quando si considerano le dimensioni delle larve di dittero.

In molti casi i campioni vengono immediatamente congelati e poi, quando indicato dall'autorità competente, vengono scongelati e fissati secondo i protocolli standard (Amendt et al., 2007).

In questo lavoro è stato valutato l'effetto del congelamento sulle dimensioni (lunghezza) di larve di *Calliphora vomitoria* (Diptera: Calliphoridae) al terzo stadio di sviluppo. Le larve sono state acquistate presso un negozio locale di esche da pesca e l'identificazione è stata confermata per via morfologica e molecolare. Tre campioni di 30 larve ciascuno ($N_{\text{finale}}=90$) sono stati congelati per 24 ore a -20°C e quindi dopo essere stati scongelati per tempi diversi (5, 15, 30, 60, 120 minuti) sono stati fissati in acqua bollente ($>80^{\circ}\text{C}$, $>1\text{min}$) e quindi misurati. I campioni sono stati poi conservati in etanolo e periodicamente rianalizzati. I risultati dimostrano un effetto statisticamente significativo sulle dimensioni delle larve dopo scongelamento in tutti i tempi considerati ($p<0.00$) con una media delle differenze di 2mm su 18mm, la lunghezza totale media degli esemplari. E' stato inoltre valutato l'effetto del numero di larve congelate insieme (5, 15, 30, 50, 100, 200, 500) in due condizioni diverse: asciutte e umide. I risultati indicano che al di sopra delle 30 larve si ha un effetto statisticamente significativo sulle dimensioni ($p=0.00$), anche la condizione umido/asciutto ha un effetto significativo ($p=0.00$) così come l'interazione tra le due condizioni: numero di esemplari >30 e condizione ($p=0.00$).

Lo scopo del lavoro è di ottimizzare le condizioni di conservazione prima e di scongelamento poi per ottenere delle misure accurate e precise utilizzabili per la stima del mPMI. Ulteriori esperimenti sono in corso con esemplari appartenenti a diverse specie.

MOLECULAR BIOLOGIST, PLEASE, DO NOT DESTROY THE EVIDENCE!

F. Tuccia^{1,2}, G. Giordani ², S. Vanin ^{2,3}

¹ Università Milano Bicocca, Milano; ²FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield, HD1 3DH, UK; ³GIEF, Gruppo Italiano per l'Entomologia forense
stefano.vanin@hud.ac.uk

Nell'entomologia forense la corretta identificazione di specie è di cruciale importanza ai fini di un'accurata stima del mPMI (*minimum Post Mortem Interval*).

Fino ad ora l'identificazione degli esemplari si è basata su un approccio morfologico con l'analisi dei caratteri fenotipici diagnostici per la specie. Negli ultimi anni, specialmente per l'identificazione di esemplari immaturi, per i quali non esistono chiavi identificative, si è ricorso con sempre maggior frequenza all'analisi molecolare. Tale indagine si basa sull'amplificazione ed il sequenziamento di regioni geniche specie-identificative quali ad esempio il gene mitocondriale COI (Citocromo Ossidasi complesso I), comunemente utilizzato negli studi di filogenesi molecolare degli invertebrati.

Nella pratica comune al fine di ottenere il DNA gli esemplari vengono omogeneizzati con la conseguente perdita dei caratteri morfologici. Rispetto a questa metodologia di estrazione del DNA, che prevede la distruzione del campione in esame, in questo lavoro si dimostra che è possibile ripetere l'identificazione molecolare nonché preservare i caratteri morfologici dell'esoscheletro di larve di mosche.

La tecnica è stata testata su larve di *Calliphora vomitoria*, *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) e *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae). Da ciascuna larva è stata rimossa la cuticola, preparata mediante diafanizzazione e conservata in etanolo; i tessuti molli sono quindi stati progressivamente frazionati sino ad ottenere frazioni di larva corrispondenti a 1/1024 (*C.vomitoria*), 1/512 (*L.sericata*), 1/128 (*M.domestica*) e 1/64 (*M.scalaris*).

La quantità di DNA estratta da tutte le frazioni di ciascun campione è stata sufficiente per l'identificazione molecolare di specie tramite amplificazione e sequenziamento di una porzione di circa 650pb del gene COI. L'identificazione molecolare è risultata in accordo con la precedente identificazione morfologica.

Il protocollo qui suggerito garantisce la possibilità di rianalizzare il campione sia da un punto di vista morfologico che da un punto di vista molecolare, almeno per gli stadi immaturi delle specie dell'ordine Diptera. L'applicabilità di tale metodo è volta a evitare la perdita totale della fonte di prova garantendo un riesame della stessa qualora venga richiesto dalle autorità competenti in sede di processo legale.

Revisione di 200 casi del Nord Italia

J. Pradelli¹, S. Vanin^{2,3}

¹ Università di Modena Reggio Emilia; ²FLEA, School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield, HD1 3DH, UK; ³GIEF, Gruppo Italiano per l'Entomologia forense
stefano.vanin@hud.ac.uk

L'Entomologia Forense è una branca della zoologia in cui morfologia, etologia e ecologia di insetti e altri artropodi sono utilizzati a fini legali. Questa disciplina è suddivisa in 3 aree: l'Entomologia Urbana, l'Entomologia dei prodotti immagazzinati e l'Entomologia Medico-Legale. Quest'ultima consiste nello studio della entomofauna necrobionte coinvolta in omicidi, morti sospette o in altri reati come abusi fisici, abbandoni e negligenze professionali. Dato il ruolo ecologico di degradatori di materia organica e la non casualità dell'ordine con cui si presentano, gli insetti possono diventare uno strumento utile nelle indagini relative ad azioni criminali, fornendo informazioni essenziali per la ricostruzione dei fatti accaduti dopo la morte della vittima. L'entomologo infatti attraverso il riconoscimento delle specie presenti sulla vittima o nel terreno sottostante il corpo può stimare l'intervallo minimo di morte (mPMI), rilevare l'occultamento o lo spostamento del corpo, stimare i tempi di emersione dall'acqua, trovare sostanze tossiche o droghe forse causa del decesso e stabilire se vi è stata negligenza o mancata assistenza in ambienti ospedalieri o famigliari.

Le segnalazioni casistiche hanno rappresentato la bibliografia di riferimento dell'Entomologia Forense sin dai tempi passati. Senza uno studio adeguato di casi reali non si sarebbero scoperte le molteplici applicazioni della disciplina e le numerose varianti che possono cambiare notevolmente le conclusioni nel lavoro di un entomologo. In Italia articoli scientifici riguardanti la materia sono relativamente pochi a causa del recente interesse da parte degli studiosi e degli organi della Giustizia.

Verra' presentato il lavoro di tesi che ha avuto come scopo l'incremento delle conoscenze sulla casistica italiana al fine di trovare dei pattern costanti e ripetibili per trarre conclusioni in ambito forense.

127 casi sono stati raccolti dal medico Dr Mirella Gherardi tra il 1998 e il 2004 nel Nord Italia. Il materiale entomologico è stato prelevato da cadaveri umani durante l'autopsia o durante il sopralluogo. In un secondo momento i campioni sono inviati al Professor Stefano Vanin al fine di essere studiati.

I dati raccolti mostrano che nel Nord Italia i ditteri e i coleotteri, con rispettivamente il 100% e il 14,2%, sono i maggior colonizzatori di resti umani in decomposizione. Tra i ditteri, i calliforidi e i sarcofagidi sono risultati essere i più numerosi: *Lucilia sericata* è risultata presente nel 40,2% dei casi, *Calliphora vicina* nel 31,5% e *Sarcophaga* spp. nel 49,6%. Tra i coleotteri, i dermestidi e gli isteridi sono stati i più frequenti, rispettivamente il 9,4% e il 3,9%. Questi insetti sono stati prelevati da corpi in avanzato stato di decomposizione. Le osservazioni fatte in questa analisi, a questo proposito, confermano la successione faunistica descritta da Mégnin nel 1894. Indici di copresenza sono stati analizzati e confrontati con i dati bibliografici: l'associazione tra le specie dei generi *Sarcophaga* e *Lucilia* è stata confermata dal 42,5% dei casi. Studi sulle abitudini e le preferenze ecologiche stagionali delle specie condotti sui dati affermano che alle nostre latitudini si possono suddividere i calliforidi in 2 gruppi principali: "le mosche blu", come *C. vicina* e *C. vomitoria*, che preferiscono temperature più fresche e perciò sono frequenti durante la primavera e l'autunno (e talvolta in inverno) e "le mosche verdi", come *L. sericata* e *Chrysomya albiceps*, che preferiscono

temperature più calde e quindi sono molto numerose in estate e tarda primavera. L'indice di copresenza tra questi due gruppi è ragionevolmente basso, solo del 7,2%. In conclusione, i risultati ottenuti da questo studio sono coerenti con i pattern descritti nella bibliografia italiana e rafforzano le conoscenze acquisite sulle specie di maggior interesse forense.

Roma
2015



I Incontro Nazionale di
Entomologia Forense