

L'entomologia forense nel settore alimentare

Repertamento, Metodi d'Analisi
e Conservazione della prova entomologica



Dott. Francesco Defilippo
E-mail: fran.defilippo@gmail.com

Definizione

ENTOMOLOGIA CLASSICA

Studio delle basi biologiche ed ecologiche che riguardano la vita degli insetti

ENTOMOLOGIA FORENSE

Ricerca biologica di base + tecniche tipiche delle discipline forensi per indagare sulla presenza degli insetti sulla scena di un reato

- ❑ motiva la presenza degli insetti in un determinato substrato
- ❑ determina da quanto tempo gli insetti sono presenti sul substrato
- ❑ recupera, attraverso l'analisi degli insetti, le informazioni perse dal substrato col passare del tempo

Perché gli insetti ?

- Sono presenti praticamente in tutti gli ambienti
- L'uomo e gli insetti condividono spesso la stessa nicchia ecologica
- Difficilmente si può evitare la loro presenza
- Sono i primi a trovare e ad attaccare il substrato in decomposizione
- La loro presenza si modifica nel tempo secondo schemi prestabiliti ambiente-dipendente

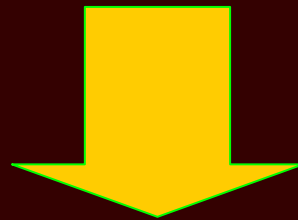
La presenza degli insetti non è mai occasionale:

l'Entomologia Forense diventa un importante **mezzo di indagine** che può **affiancare** l'attività delle **Forze dell'Ordine**

Repertamento e Metodi di analisi

Alla base di tutte le analisi che possono essere portate avanti dall'entomologo forense vi è un campionamento corretto in sede di

SOPRALLUOGO



un errato campionamento può determinare solo stime errate

Fasi del Sopralluogo

Fase1: Rilievo

Fase2: Repertamento dei dati e dei campioni in sede di sopralluogo

Fase3: Fissaggio e conservazione dei campioni

Fase1:

Il sopralluogo è un **evento irripetibile**

È fondamentale un'accurata **documentazione** del sito e dell'ambiente circostante

Il rilievo può essere:

- fotografico
- planimetrico
- dattiloscopico

Fase 2/3

**-Reperimento dati ambientali
(Temperatura, Umidità, Tipo di ambiente)**



Repertamento del substrato infestato

Il campione deve essere:

1. Rappresentativo
2. Selettivo

Imballaggio del campione

1. Confezionato in modo da garantire sufficiente aria all'interno per la respirazione degli insetti



2. ogni sacchetto deve essere etichettato con tutti i dati necessari all'identificazione
3. l'analisi deve essere eseguita entro 1-2g per gli acari e 4-5g per gli insetti

Conservazione del campione

Lontano da fonti di calore in ambienti con temperature di circa 10-15°C

Repertamento della prova entomologica

- ☑ campionamenti in grado di rilevare la presenza di insetti sulle merci in ingresso;
- ☑ osservazioni all'interno dei locali per rilevare tracce della loro presenza nelle strutture, negli impianti e sulle merci giacenti nei depositi;
- ☑ catture attraverso l'utilizzo di **trappole** di diversa fattura adescate con attrattivi di vario tipo (luminosi, alimentari, feromonici);
- ☑ prelievo di un campione rappresentativo per un'analisi entomologica.

.....le trappole

Monitoraggio degli insetti atti al volo

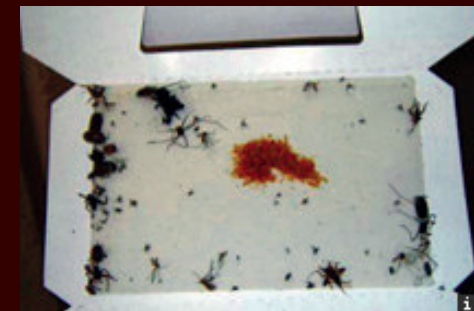
installate a circa 2-2,5 m di altezza all'interno dei locali

le trappole vengono adescate con diversi feromoni (di tipo sessuale e/o di aggregazione), esche alimentari o fonti luminose



Monitoraggio degli insetti striscianti

sono collocate a terra e preferibilmente in zone dove già si suppone la presenza degli insetti.



le trappole sono adescate con diverse sostanze: attrattivo alimentare; feromone sessuale o solo supporto collante (agiscono per casualità). Per aumentarne l'efficacia, al feromone sessuale e ancor più spesso a quello di aggregazione, vengono aggiunti attrattivi alimentari

In base al tipo di insetti o residui (avere sempre a disposizione alcool etilico 70% e contenitori)

Uova



Larve



Vivo

Pupe



Alcool 70%



Macro e Microanalisi della matrice

Il metodo

```
graph TD; A[Il metodo] --> B[Gravimetrico]; A --> C[X-Ray]; A --> D[Filth-test]; A --> E[Setacciatura];
```

Gravimetrico

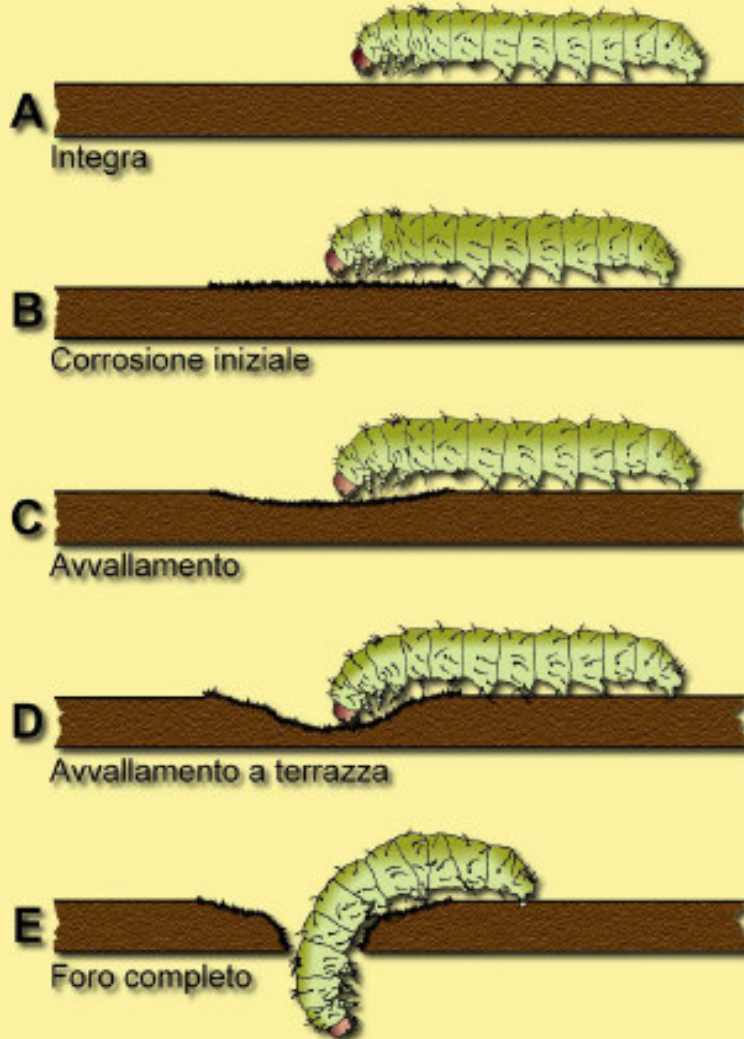
X-Ray

Filth-test

Setacciatura

Osservazione dell'imballaggio/confezione

Confezione di carta/cartone



A



Graffi e scanalature

B



Foglio di alluminio

C



Plastica di polietilene

D



Laminati

Insetti “Penetratori”: in grado di perforare in tempi brevi i materiali di imballaggio (es. *Lasioderma serricorne*, *Dermestes maculatus*, *Plodia interpunctella*)



Foro su involucro di cioccolatino infestato da larve di *Plodia interpunctella*

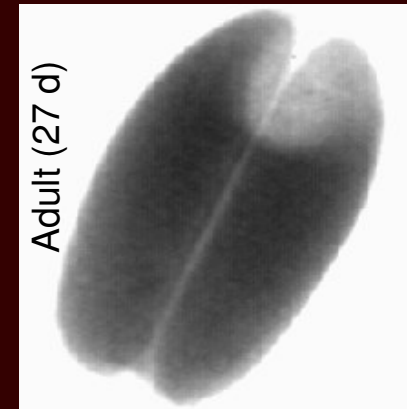
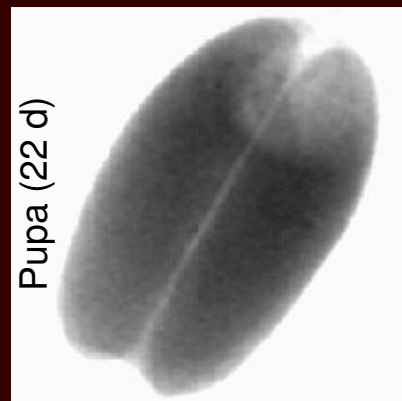
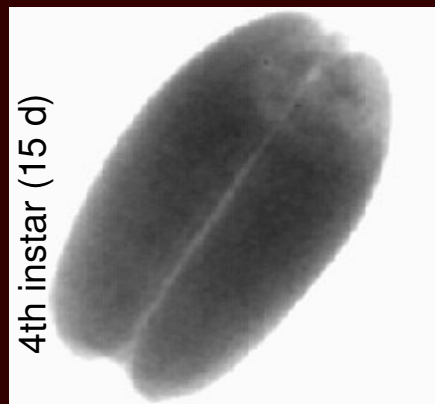
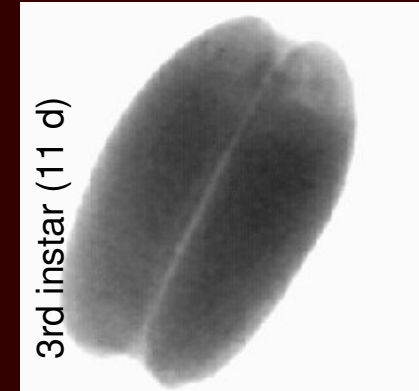
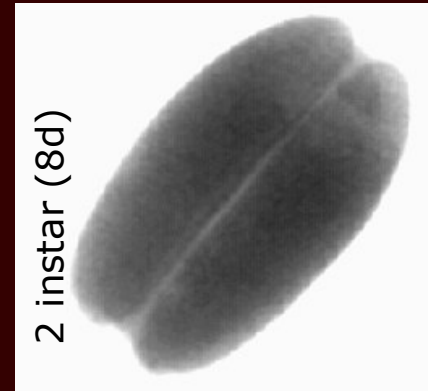
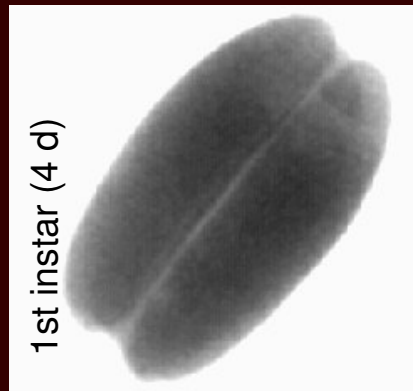
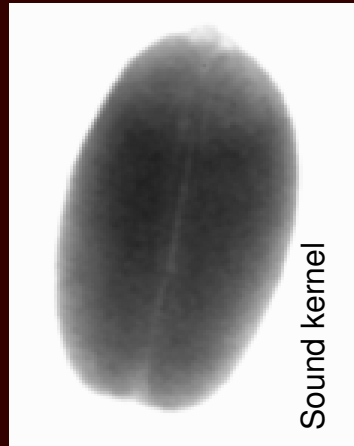
Insetti “Invasori”: di solito non penetrano la confezione a meno che esse non presentino già un'apertura (es. *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae*, *Cryptolestes pusillus*)

Foro su confezione di riso infestato da *Sitophilus oryzae*



X-Ray

- per prodotti imballati/confezionati
- per analisi di cariossidi con larve all'interno



X-ray images of a sound kernel and a kernel infested by different life stages of *Cryptolestes ferrugineus* (fonte: C. Karurakaran et al., 2004)

-l'infestazione parte dal germe con un piccolo punto bianco per poi propagarsi-

Setacciatura

Selettore di Berlese



• Plate Method: intersezione di un piatto di ceramica tra setaccio e prodotto (per farine)

• Chip Method: inserzione di polvere di porcellana o mica sull'imbuto prodotti di più alta "granulometria"

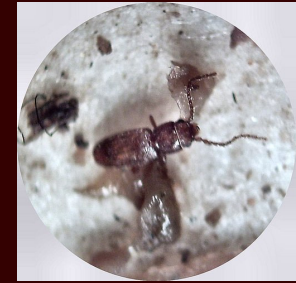
• Multiple-Plate Method: inserzione di un'elica al centro del piatto per favorire la separazione della matrice entomica

Metodo gravimetrico

- Su granaglie, semi di diversa natura
- Separazione per flottazione della componente alterata
- Soluzione con acqua e soluzione di sali o alcool e oli
(soluzioni acquose di silicato di sodio, nitrato di ammonio o glicerolo)



Filth-test



separazione delle impurità solide in base alla loro gravità specifica

Il campione deve essere disciolto:

- acqua calda
- solventi
- acidi diluiti



Dopo appropriati passaggi ad esempio "setacciamenti" le impurità solide possono essere "captate" da oli minerali o eptani



E' utilizzato per isolare, descrivere e quantificare le impurità solide nascoste, altrimenti non rilevabili.



Alla fine dell'analisi macro - microscopico si può definire il grado di infestazione del campione originale

Esso può essere espresso nel modo seguente (con eventuali correzioni a seconda della matrice che si va ad analizzare):

- Infestazione nulla (I.N.) Nessun artropode vivo**
- Infestazione lieve (I.L.) 1 artropode vivo ogni Kg di campione**
- Infestazione sensibile (I.S.) da 2-3 artropodi vivi ogni Kg**
- Infestazione rilevante (I.R.) da 4-10 artropodi vivi ogni Kg**
- Infestazione forte (I.F.) oltre 10 artropodi vivi ogni Kg**

[questa scala di valori è principalmente usata per i cereali immagazzinati vedi Gelosi & Suss 1991]

Analisi della prova entomologica

1. studio morfologico e identificazione di specie

Presupposto: L'identificazione dell'artropode infestante e la conoscenza della biologia è assolutamente indispensabile per poter risalire all'origine dell'infestazione

2. Stadio di sviluppo in cui l'insetto si trova al momento del ritrovamento (uovo, larva, pupa, adulto)

3. Stato di conservazione dell'insetto

4. correlazioni ambientali

5. risultati

Quali informazioni utili ai fini legali ?

1. accertare quale sia il grado di contaminazione entomologica della derrata (insetti morti o vivi, loro frammenti, escrementi larvali, tele sericee, esuvie larvali e pupali)



2. Tipologia e luogo dell'infestazione :

- **in campo aperto:** dovuta ad artropodi che attaccano l'alimento in natura;



Uova di Noctuidae su foglia di lattuga



Uova di Pentatomidae su foglia di rucola

- **endogena:** avvenuta durante le fasi di maturazione/preparazione del prodotto;

- **esogena:** avvenuta dopo il confezionamento

- **in atto:** al momento dell'analisi sono presenti forme vitali dell'artropode infestante



– **secondaria:** ambientale, dovuta ad artropodi non specifici dell'alimento, che lo contaminano con escrementi, esuvie, ecc...



Lasagne infestate da coleottero Carabidae, gen. *Calathus*

– **pregressa:** al momento dell'analisi sono presenti forme non vitali dell'artropode infestante;

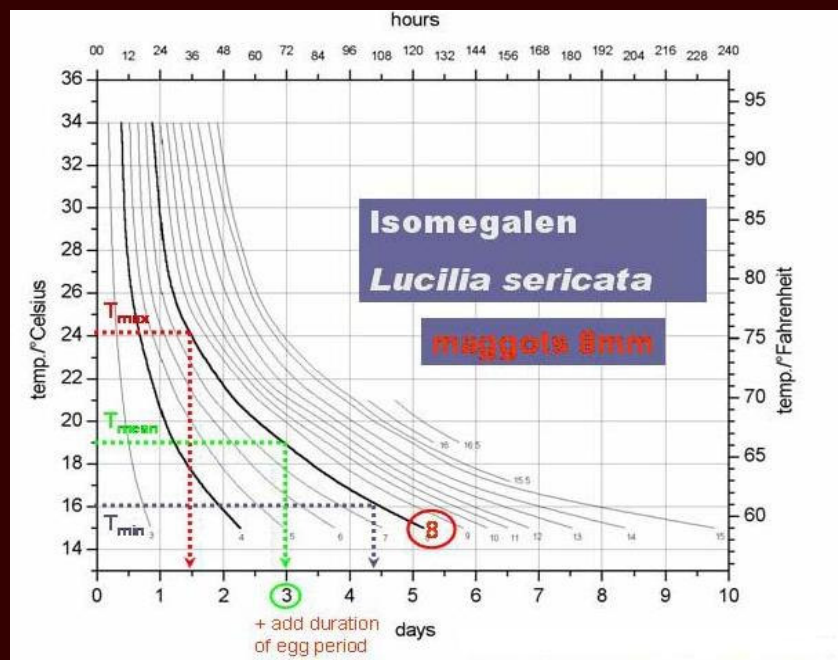


Larva di lepidottero in pizza pronta surgelata



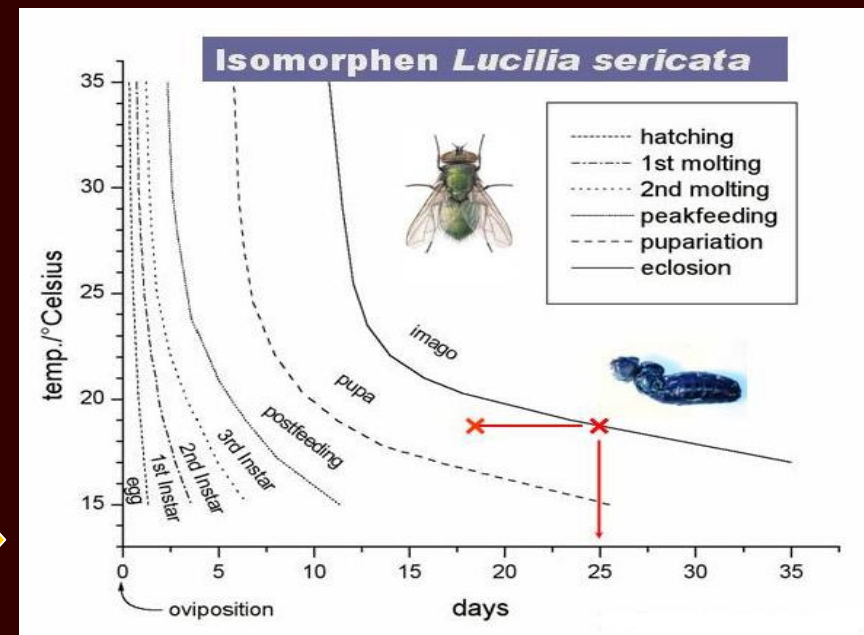
3. Datare l'infestazione e quindi assegnare le diverse responsabilità civili e penali a ogni operatore della filiera

-concetto di **Isomegalen/Isomorphen Diagram**



l'Isomegalen diagram
 Identifica la variazione di lunghezza delle larve (di dittero) ritrovate in relazione alla temperatura media giornaliera

l'Isomorphen diagram
 Identifica la variazione di stadio di ditteri ritrovate in relazione alla temperatura media giornaliera



-concetto di **Accumulated Degree Days** e **Accumulated Degree Hours**

$$\text{Total ADD o ADH} = \sum d(t - t_L)$$

d: tempo in giorni o ore

t: variazione della temperatura nel tempo (media giornaliera o oraria)

t_L: soglia più bassa di temperatura necessaria allo sviluppo (determinata sperimentalmente)

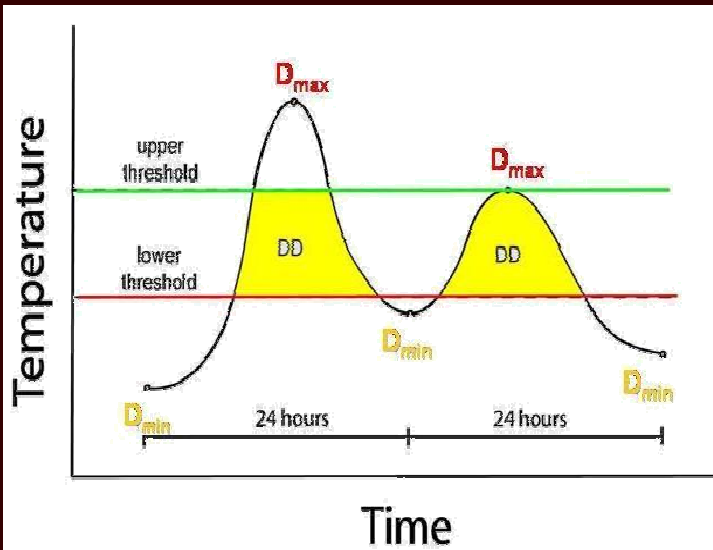
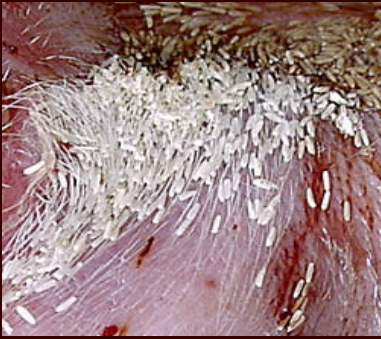


Table 10 : Thermal parameters (°C), regulating necrobiont fly development

N	FLY SPECIES	LOWER DEVELOPMENT THRESHOLD	HEAT CONSTANT OF SPECIES	SUM OF EFFECTIVE TEMPERATURES TO DEVELOP FROM EGG TO PUPARIUM
1	<i>Calliphora vicina</i> R.-D.	2.0	388.0	191.0
2	<i>Calliphora vomitoria</i> L.	3.0	472.0	213.0
3	<i>Protophormia terranova</i> R.-D.	7.8	251.0	191.0
4	<i>Lucilia sericata</i> Mg*	9.0	207.0	-
5	<i>Chrysomya albiceps</i> Wd.	10.2	186.0	123.0
6	<i>Phormia regina</i> Mg	11.4	148.0	101.0
7	<i>Muscina stabulans</i> Fil.	7.2	269.0	139.0
8	<i>Muscina assimilis</i> Fil.	7.9	240.0	102.0
9	<i>Boettcherisca septentrionalis</i> Rohd.	7.8	279.0	117.0
10	<i>Piophilina foveolata</i> Mg.	6.4	434.0	278.0

* according to I.V. Koshanchikov, 1961

Complete lifecycle: egg-adult



Unknown portion

Known portion

Total for the species

Giorno	T° media	- t _L		
22.03.12	9,75	7,75		
23.03.12	10,75	8,75	396,3	Deposizione uova di <i>Calliphora vicina</i>
24.03.12	10,03	8,3		
25.03.12	9,07	7,07		
26.03.12	11,02	9,02		
.....				
05.04.12	11	9		Allevamento in laboratorio
.....				
18.04.12	20	18		
19.04.12	20	18		
20.04.12	20	18		
21.04.12	20	18		
22.04.12	20	18		Primo adulto <i>Calliphora vicina</i>

FLY SPECIES	LOWER DEVELOPMENT THRESHOLD	HEAT CONSTANT OF SPECIES	SUM OF EFFECTIVE TEMPERATURES TO DEVELOP FROM EGG TO PUPARIUM
<i>Calliphora vicina</i>	2.0°C	388.0°C	191.0°C

Porchetta infestata da Calliphoridae *L.sericata* (uova e larve al II stadio)



Specie	LDT	ADD Eggs to Adult	Matrice alimentar e	Ref.
<i>Lasioderma serricorne</i>	12°C	~912.72	<i>Granaglie e farine</i>	Li and Li, (2010)
<i>Stegobium paniceum</i>	5°C	~1100	<i>Granaglie e farine</i>	Li and Li, (2007)
<i>Carpophilus hemipterus</i>	14.6°C	~260.40	<i>Frutta secca</i>	James, and Vogele (2000)
<i>Tribolium castaneum</i>	9.1°C	~1011,1	<i>Granaglie e farine</i>	Chon et al. (1991)



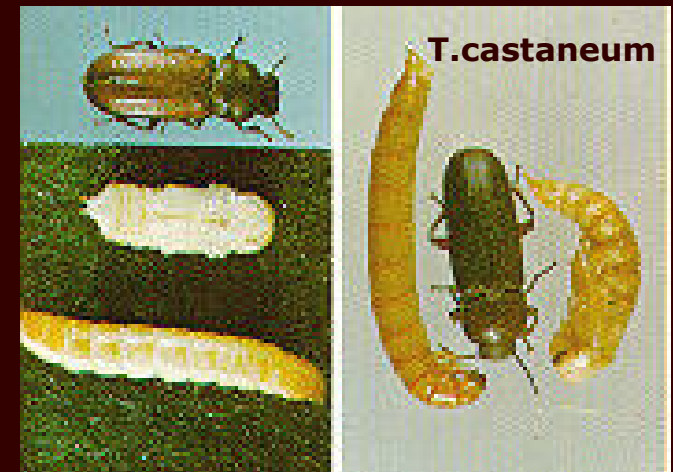
C. hemipterus



L. serricorne



Stegobium paniceum



T. castaneum

Specie	LDT	ADD Eggs-Adult	Matrice alimentare	Ref.
<i>Liposcelis entomophila</i> (psocoptera)	15.7°C	~460.70	Frutta secca	Wang et al. (1978)
<i>Tyrophagus putrescentiae</i> (Acaro)	5°C	~291.40	Alimenti ricchi di grassi e proteine	Sánchez- Ramos and Castañera (2001)





Ove noti, applicare
al calcolo i relativi
fattori correttivi

**ADD per *P.interpunctella*
su differenti matrici
alimentari LDT 17.50°C.
Fonte Johnson et al. 1995**

DIET	Mean degree day \pm SEM	
	Laboratory	Wild -type
WHEAT BRAN AND NUT DIET		
Wheat bran	345 \pm 2.32	844 \pm 2.25
Pistachios	574 \pm 2.05	1036 \pm 1.39
Walnuts	613 \pm 2.91	1092 \pm 1.32
Almonds	536 \pm 6.53	1082 \pm 1.06
DRIED FRUIT DIET		
Raisins	1241 \pm 112.43	1382 \pm 32.35
Prunes	1616 \pm 224.55	1383 \pm 13.66

Variazione dei tempi di sviluppo in relazione a T°C e R.H.%



EPHESTIA KUEHNIELLA

112.

T. A. JACOB and P. D. COX

TABLE 4. THE TOTAL DEVELOPMENTAL PERIOD FROM OVIPOSITION TO ADULT EMERGENCE OF *Ephestia kuehniella* ON WHITE FLOUR (72% EXTRACTED) AT VARIOUS TEMPERATURES AND HUMIDITIES

Temp. (°C)	r.h. (%)	No. of adults emerging	Survival from egg hatch to adult (%)	Total developmental period (days) from oviposition to adult		
				Mean	Range	S.D.
12	40	0	0	—	—	—
	60	0	0	—	—	—
	70	0	0	—	—	—
	75	4	8	374.8	349-420	33.1
15	40	25	50	239.6	213-281	26.5
	60	41	82	199.2	167-250	22.7
	70	38	76	195.0	171-264	15.3
18	40	30	60	149.6	131-174	12.1
	60	40	80	135.4	124-168	9.5
	70	44	88	125.1	115-133	6.3
	75	39	78	159.6	133-198	13.4
20	15	45	90	146.3	110-166	11.8
22	40	39	78	107.2	94-129	8.4
	60	46	92	95.9	87-113	6.4
	70	45	90	95.5	84-122	7.1
25	0	18	36	177.9	161-193	10.8
	15	41	82	107.4	91-127	10.5
	30	36	72	102.1	78-134	11.8
	40	39	59	104.3	86-123	10.5
	60	43	57	86.4	75-113	8.1
	70	38	51	80.2	65-106	10.2
	75	44	88	74.3	63-100	7.4
28	40	31	59	104.9	78-132	12.8
	60	39	77	85.8	76-111	8.1
	70	36	57	84.9	70-102	8.4
31	40	0	0	—	—	—
	60	0	0	—	—	—
	70	0	0	—	—	—
	75	0	0	—	—	—

T. A. JACOB and P. D. COX;
J. stored Prod. Res. 1977, Vol. 13, 107-118.

Quali altri fattori possono influire su una corretta datazione ?

***Presenza /assenza di una Massa larvale?**

***Quale temperatura registrata in sede di sopralluogo?**



***Trasporto del campione:
(Modalità e Tempistica)**

***Identificazione**



Il laboratorio di Entomologia IZSLER

- Negli ultimi due anni oltre 200 analisi su conferimenti di alimenti infestati da artropodi (o parti di essi)



- In più del 20% dei casi si è datato l'inizio della contaminazione con l'ausilio dell' **Isomegalem-diagram** e ove possibile, data la disponibilità di due camere climatiche, con il calcolo degli **ADD**

Messa a punto di apposite metodiche per l'estrazione dell'insetto contaminante dalla matrice alimentare

- ❑ **Filth-test**: su farine, paste e miele
- ❑ **Flottazione**: su cariossidi e legumi secchi
- ❑ **Selettore Berlese -Tullgren**: su farine

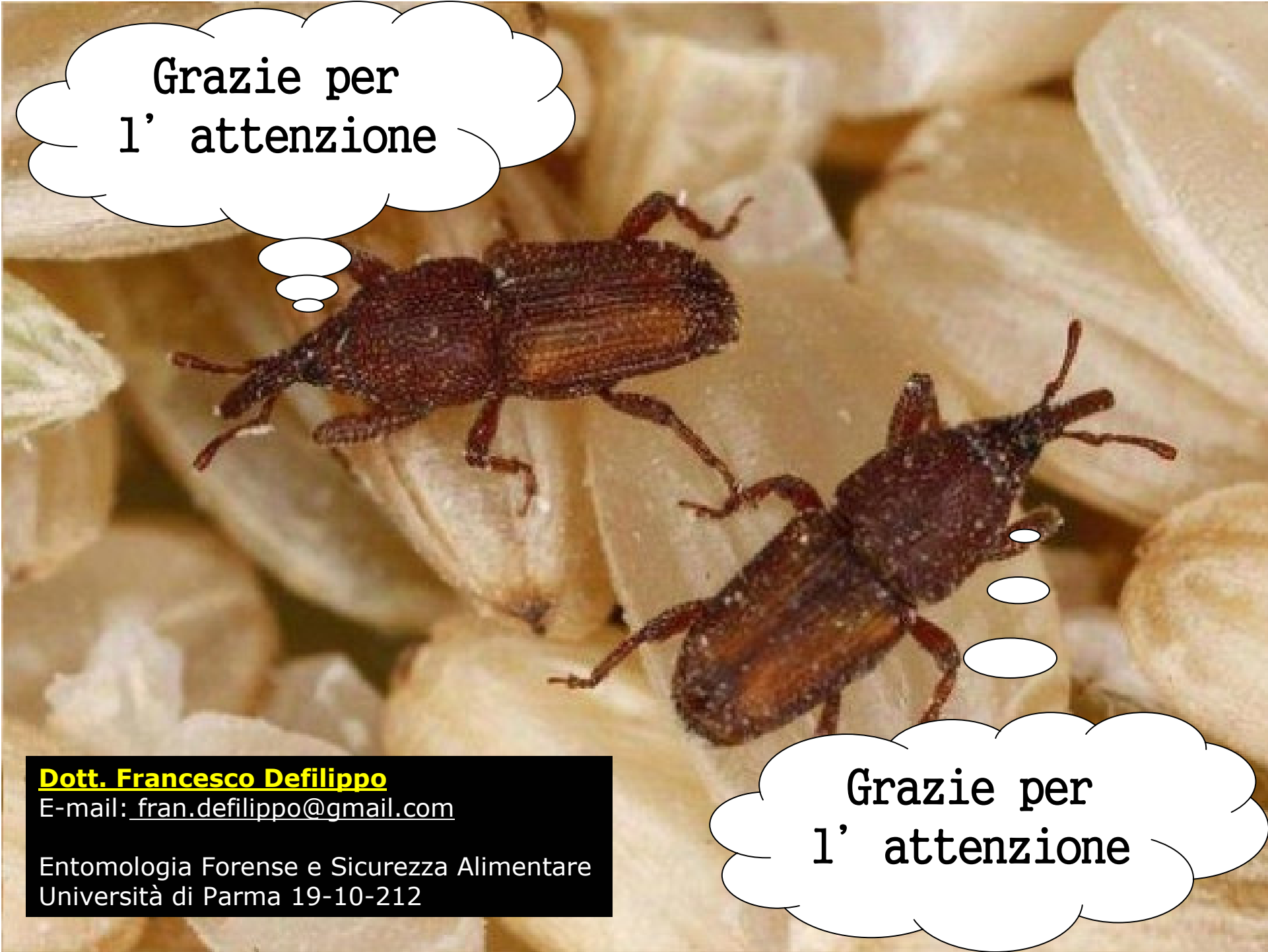
Tematiche da seguire The Quality control

Perché?

- ❑ Per scegliere e spiegare le procedure
- ❑ Per incrementare la tracciabilità del campione
- ❑ Per identificare e minimizzare gli errori e quindi poter migliorare la qualità della risposta

In sintesi

"Scrivere quello che facciamo e fare ciò che si scrive "



Grazie per
l' attenzione

Grazie per
l' attenzione

Dott. Francesco Defilippo

E-mail: fran.defilippo@gmail.com

Entomologia Forense e Sicurezza Alimentare
Università di Parma 19-10-212