

La genetica forense nelle indagini per bracconaggio: un caso

Rita Lorenzini (*)

() Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, 64100 Teramo, r.lorenzini@izs.it*

(n.d.r. : articolo in corso di pubblicazione anche sulla rivista "Habitat")



(Cinghiale illegalmente catturato in un laccio scorsoio metallico – Foto A. Atturo, Polizia Provinciale di Genova)

Secondo la legge italiana, tutte le specie di animali selvatici di parchi e riserve sono strettamente protette. Tuttavia, il bracconaggio è un'attività diffusa e rimane purtroppo un problema irrisolto anche nelle aree dove la fauna è legalmente tutelata. Quando le vittime appartengono a specie che hanno un forte impatto emotivo sull'opinione pubblica, come l'orso o il lupo, allora le notizie conquistano subito le prime pagine dei giornali, altrimenti, come avviene nella maggior parte dei casi, per i cinghiali o gli uccelli ad esempio, gli atti di bracconaggio passano del tutto inosservati. Perfino animali particolarmente protetti, in pericolo o anche altamente minacciati di estinzione rimangono regolarmente vittime dei lacci, dei bocconi avvelenati e delle doppiette dei bracconieri. Sebbene il fenomeno sia frequente, i trasgressori vengono incriminati solo raramente, e ancor più di rado vengono colti sul fatto. Attualmente, le investigazioni antibracconaggio, grazie al supporto delle moderne tecniche di genetica forense, ovvero di analisi del DNA, assumono una nuova dimensione e traggono rinnovati incentivi per una lotta sempre più efficace e capillare. Nei casi di bracconaggio in cui manchino altri tipi di indizi e prove biologiche possano essere raccolte sulla

scena dell'illecito, le analisi di genetica forense sono le uniche di cui le autorità competenti dispongono per la conclusione positiva delle indagini. Da non sottovalutare, inoltre, la funzione preventiva deterrente che svolge nei confronti dei potenziali bracconieri la consapevolezza del potere investigativo di queste tecniche molecolari. Oggi esiste la possibilità di identificare il singolo animale attraverso i profili genetici che si ottengono a partire da piccolissime quantità di DNA estratto dai materiali biologici più diversi, quali peli, escrementi e tracce di sangue [1]. Inoltre, è possibile risalire alle relazioni di parentela tra gli individui, nonché determinarne il sesso. In particolare, poter risalire al sesso dell'animale è estremamente utile, per esempio là dove sia consentita la caccia ai soli maschi, come avviene per i cervidi negli Stati Uniti in certi periodi dell'anno: l'abbattimento illegale di una femmina, anche se privata delle parti anatomiche che ne attribuirebbero il sesso, può facilmente essere svelato dall'analisi del DNA.

Tuttavia, le indagini forensi applicate alle specie selvatiche sono alquanto più complesse rispetto a quelle in uso in forense umana. In questo caso, infatti, tutte le investigazioni ruotano attorno ad una sola specie, quella umana appunto, mentre nel caso degli animali selvatici è necessario sapere di quale specie si tratti, prima di andare oltre nelle indagini. Difficilmente si ha a disposizione l'intero animale, nel qual caso diventa facile identificarne la specie: la maggior parte delle volte, invece, vengono rinvenute solo parti di esso, come ad esempio tranci di carne sequestrati nei congelatori di sospetti bracconieri. Spesso, sono disponibili solo tracce dell'animale, ad esempio gocce di sangue, peli, piume o aculei. Ma le difficoltà non finiscono qui: una volta identificata la specie oggetto dell'atto di bracconaggio, è infatti necessario adattare ad essa le metodiche delle analisi di laboratorio che eventualmente è necessario eseguire ancora, per esempio la caratterizzazione genetica dell'individuo. Una delle complessità di queste indagini è costituita dal fatto che le analisi forensi sulle specie selvatiche non possono avvalersi di protocolli di laboratorio collaudati e standardizzati per la determinazione del sesso e per l'identificazione individuale, come avviene invece per la forense umana. Per esempio, l'accertamento che attribuisce un campione biologico ad un determinato individuo può essere effettuato solo se sono disponibili dei marker di DNA nucleare, chiamati "microsatelliti", che sono specifici e caratteristici delle diverse specie. Ma il procedimento per isolare i microsatelliti dal genoma di una specie è lungo, articolato, nonché economicamente impegnativo, tanto che spesso si preferisce sperimentare sulla specie che è oggetto della nostra indagine dei protocolli messi a punto per specie diverse, magari domestiche e filogeneticamente affini. Anche questa strategia implica comunque un lungo lavoro di ricerca e sperimentazione. A questo punto, appare chiaro che l'esito positivo delle indagini antibracconaggio attraverso la genetica forense è fondamentalmente affidato all'esperienza e all'abilità dei singoli esperti.

In questo articolo viene descritto come si è arrivati a risolvere un caso di bracconaggio ai danni di una specie selvatica italiana attraverso l'impiego di tecniche di genetica forense.

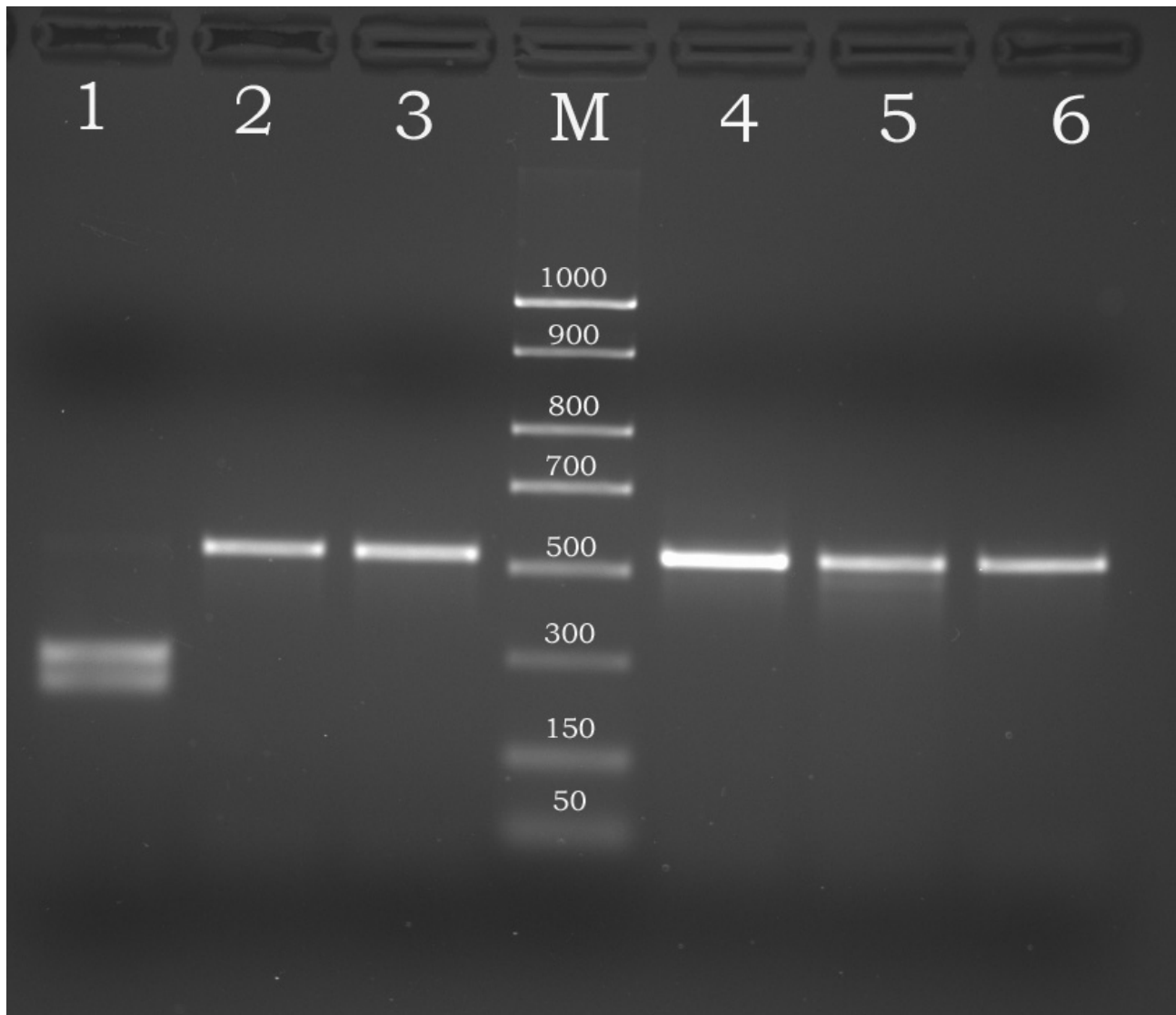


Figura 1. Amplificazione di un segmento di DNA mitocondriale, successivamente tagliato con un enzima di restrizione. Il campione 1 corrisponde al profilo genetico di un suino, utilizzato come riferimento da confrontare con i campioni ignoti. Il campione 2 corrisponde invece al profilo genetico di un cinghiale, anch'esso utilizzato come riferimento. Il campione 3 è il cinghiale braconato; i campioni 4, 5 e 6 sono i profili genetici delle tre tracce di sangue sul coltello. M è un marker per il peso molecolare. Come si può notare, i profili delle tre tracce di sangue sono uguali a quelli del cinghiale di riferimento e del cinghiale braconato, mentre sono totalmente diversi da quello del suino.

Il fatto

Un bracconiere, dopo aver catturato al laccio una femmina di cinghiale in uno dei parchi nazionali italiani, l'aveva poi ferita a morte infierendole un colpo al fianco con un coltello fissato all'estremità di un'asta. Aveva lasciato che l'animale morisse lentamente per dissanguamento senza rimuoverlo dal posto, intenzionato a tornare col favore delle tenebre per prelevarne la carcassa. Qualche ora dopo i guardiaparco, in seguito ad un avvertimento, si erano recati sulla

scena del fatto, avevano trovato l'animale morto ancora legato al laccio e si erano appostati, in attesa che il bracconiere facesse ritorno per asportare la preda. Alla comparsa dell'uomo gli ufficiali ne avevano effettuato il fermo. Tuttavia, mancava la prova che legasse direttamente il sospettato all'atto di bracconaggio, ovvero non c'era nulla a testimoniare che fosse stato proprio lui ad uccidere l'animale, poiché l'uomo aveva ovviamente negato di essere il fautore dell'atto di bracconaggio, dichiarando di aver visto per caso il cinghiale morto e di aver poi deciso di recuperarlo. Inizialmente, gli ufficiali non furono quindi in grado di incriminarlo. La carcassa di cinghiale venne sequestrata e sottoposta alle indagini necroscopiche di rito presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Teramo. L'esame anatomo-patologico delle lesioni rivelò che la morte dell'animale era stata provocata da una ferita da taglio al fianco, inferta quando l'animale era ancora in vita. Durante la perquisizione domiciliare del sospettato fu rinvenuto e confiscato un coltello di fattura artigianale, dal manico di ferro, all'apparenza perfettamente pulito. In laboratorio, ad un più attento esame al microscopio, fu però rilevata una piccola macchia, presumibilmente di sangue, sul bordo seghettato della lama. Altre due minuscole tracce di sangue vennero trovate tra la lama e il manico. L'arma da taglio venne data in consegna al personale dell'Istituto Zooprofilattico, dove fu sottoposta alle indagini forensi presso il Laboratorio di Genetica e Biologia Molecolare.

Le indagini forensi di laboratorio

L' estrazione del DNA. La prima tappa delle indagini è consistita nell'estrazione del DNA dalle tracce di sangue sul coltello. Nei campioni forensi, il DNA è presente in minime quantità ed è spesso degradato. E' quindi necessario adottare degli specifici protocolli di estrazione che impediscano, tra l'altro, la contaminazione con materiale genetico di altre fonti, come tessuti o sangue, nei quali il DNA è presente in quantità così abbondante da "mascherare" lo scarso DNA dei campioni forensi. Questa fase delle analisi viene normalmente condotta in una stanza esclusivamente dedicata all'estrazione di DNA da campioni forensi. Ognuna delle tre macchie di sangue è stata rimossa dalla lama del coltello con dei tamponi leggermente imbevuti di una soluzione salina. Successivamente il DNA è stato dapprima estratto mediante apposite soluzioni chimiche e poi purificato dalla ruggine che era vistosamente presente sul coltello.

Dalla carcassa del cinghiale sequestrato il DNA è stato estratto a partire da qualche milligrammo di muscolo scheletrico.

L' identificazione della specie. Il quantitativo di DNA che si riesce ad estrarre dai campioni forensi è spesso minimo ed è insufficiente per poter effettuare qualsiasi tipo di analisi. Allo scopo di aumentarne la quantità e avere quindi la possibilità di disporre di tutto il DNA che serve per le indagini da condurre, si utilizza un metodo di "amplificazione del DNA", che altro non è se non una clonazione in vitro. Il DNA viene amplificato attraverso la *reazione a catena della polimerasi* o PCR (Polymerase Chain Reaction). Si tratta di una serie di reazioni chimiche che avvengono

secondo uno schema ciclico di variazioni termiche e serve per produrre milioni di copie di un particolare segmento di DNA. Virtualmente, è sufficiente una sola copia del segmento di DNA che funge da “stampo”, per poterne sintetizzare milioni di altre copie. In queste indagini, la PCR è stata impiegata per amplificare un particolare segmento di DNA che, una volta prodotto in milioni di copie, sufficienti per eseguire le analisi, è stato trattato con degli enzimi di restrizione. Gli enzimi di restrizione sono proteine di origine batterica che fungono da “forbici”: tagliano la lunga molecola di DNA in corrispondenza di specifici punti, generando dei segmenti di varia lunghezza. Il numero e la lunghezza dei segmenti sono diversi a seconda della specie da cui proviene il DNA. Alla fine, si ottengono dei profili genetici specifici che permettono di distinguere una specie dall'altra.

In questo modo sono stati ottenuti i profili genetici corrispondenti alle tre macchie di sangue sul coltello. Questi profili sono poi stati messi a confronto con quelli delle seguenti specie di riferimento: bovino, cavallo, ovino, capra, pollo, capriolo, suino/cinghiale, cervo, daino, camoscio, orso, coniglio, asino, gatto, volpe, cane/lupo e istrice. Ognuna di queste specie ha dei propri profili genetici, risultanti dalla combinazione enzima di restrizione/segmento di DNA e vengono utilizzati di routine nel Laboratorio di Genetica e Biologia Molecolare dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Teramo per l'identificazione delle specie a partire da tessuti, sangue, porzioni di carne congelata o cotta, così come da campioni non invasivi, quali peli o tracce di materiale biologico [1, 2]. Poiché il segmento di DNA utilizzato per questa analisi è identico sia nel suino che nel cinghiale, questo metodo non permette la discriminazione delle due forme che, appartenendo alla stessa specie *Sus scrofa*, sono geneticamente assai simili. Pertanto, una volta accertato che il DNA proveniente dalle macchie di sangue apparteneva alla specie *Sus scrofa* e non ad altre, è stato però necessario analizzare anche un altro segmento di DNA, che, a differenza del primo, potesse distinguere il cinghiale dal suino. In particolare, la distinzione tra le due forme è possibile poiché questo segmento di DNA del suino può essere tagliato da un particolare enzima di restrizione, mentre quello del cinghiale non ha alcun punto della sequenza in corrispondenza del quale l'enzima possa tagliare. Di conseguenza, se il DNA appartiene ad un cinghiale, ciò che si ottiene è un profilo genetico costituito da una sola banda bianca (vedi la Figura 1), in quanto il segmento rimane integro, non tagliato dall'enzima di restrizione. Al contrario, nel DNA di suino, che l'enzima di restrizione taglia in due segmenti, si avrà un profilo costituito da due bande bianche, corrispondenti ai due segmenti. Questo metodo permette di distinguere i cinghiali dai suini in molti casi, ma non permette di riconoscere gli ibridi, né di discriminare i singoli individui. Non è possibile cioè sapere di quale cinghiale si tratti, o di quale suino.

L'identificazione dell'individuo. Una volta accertati che le macchie di sangue rimaste sul coltello appartenevano ad un cinghiale, era necessario stabilire di quale cinghiale si trattasse. In altre parole, bisognava verificare se il sangue di cinghiale sul coltello corrispondeva a quello del cinghiale bracconato. A questo scopo sono state analizzate altre porzioni della molecola di DNA, dei marker che vengono chiamati “microsatelliti”. I microsatelliti analizzati per risolvere questa indagine vengono impiegati in modo specifico per la caratterizzazione genetica degli individui del

genere *Sus*, ovvero, come nel nostro caso, per distinguere singolarmente un cinghiale dall'altro. La tecnica è la stessa che viene utilizzata dalla Polizia Scientifica nelle indagini forensi sugli umani, per esempio nei casi di omicidi e stupro, oppure per il riconoscimento degli individui nei disastri aerei, nelle catastrofi naturali, o semplicemente nei test di paternità e di ricostruzione delle parentele. L'unica differenza risiede nel tipo di marker, che sono diversi a seconda della specie che si va ad analizzare: nei casi appena descritti si usano infatti microsatelliti caratteristici della specie umana, mentre per gli animali devono essere utilizzati altri microsatelliti, diversi a seconda della specie.

La caratteristica comune di questi marker è quella di avere un tasso di mutazione genetica molto alto. In altre parole, esistono in un numero elevatissimo di forme differenti (che in linguaggio tecnico si chiamano "alleli") che si combinano fra loro in migliaia o anche miliardi di combinazioni diverse. Se si analizza un pannello di più microsatelliti, ad esempio 12, come nel nostro caso del cinghiale, allora nessun individuo possiede la stessa combinazione di varianti alleliche di un altro individuo e l'attribuzione dell'identità può essere effettuata con un margine di errore estremamente basso. Ogni profilo genetico è quindi caratteristico di un singolo animale. A differenza della forense umana, in cui questo accertamento viene condotto secondo protocolli standard impiegati in tutti i laboratori forensi certificati, per gli animali, domestici o selvatici che siano, tali procedure standard non sono disponibili. La scelta dei microsatelliti viene effettuata dai vari laboratori in base a criteri soggettivi basati sull'esperienza dei singoli specialisti. Tuttavia, al fine di operare nelle condizioni di minore soggettività, il pannello di marker utilizzato in queste indagini è quello consigliato dalle linee guida della Commissione Consultiva ISAG-FAO (International Society of Animal Genetics-Food and Agriculture Organization) per le analisi di paternità e di mappatura genica nel suino. Per chi fosse interessato, i dettagli tecnici si possono facilmente reperire nei database dei suini o nel sito <http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/panel/panel2004.htm>, oppure sono disponibili presso l'autore [3].

I risultati

Gli accorgimenti adottati in laboratorio hanno permesso di estrarre con successo il DNA da tutte e tre le tracce di sangue sul coltello. Il primo accertamento, quello eseguito per identificare a quale specie appartenesse il sangue, è stato effettuato mettendo a confronto i profili genetici dei campioni in esame con quelli dei campioni di riferimento di specie domestiche e selvatiche. I risultati hanno rivelato che il sangue sul coltello corrispondeva alla specie *Sus scrofa*. Non sono stati evidenziati profili genetici misti, ovvero appartenenti a specie diverse, come era ipotizzabile se il coltello fosse stato utilizzato per sezionare o sopprimere più animali di specie diverse. Una volta riconosciuta la specie, è stato però necessario distinguere se si trattasse della forma domestica di *Sus scrofa*, il suino, oppure di quella selvatica, il cinghiale. A questo scopo è stata effettuata l'analisi di una particolare porzione di DNA, specifica per questa specie. Il profilo genetico

risultante da tutte e tre le tracce (Fig. 1) ha rivelato che l'animale da cui proveniva il sangue era un cinghiale, oppure un incrocio tra una femmina di cinghiale e un maschio di suino. Il DNA analizzato è infatti una molecola di acido nucleico particolare, il DNA mitocondriale, che viene ereditata lungo la linea materna e può rivelare solo l'identità specifica della madre, mentre nulla può dire sull'origine del padre. Sebbene l'aspetto morfologico dell'animale bracconato non avesse mostrato alcun carattere riferibile ad un incrocio tra suino e cinghiale, né di prima generazione, né di successive, tuttavia era necessario eseguire delle analisi più approfondite per escludere con ragionevole sicurezza che si trattasse di un incrocio. L'ultimo e definitivo accertamento ha avuto il duplice scopo di verificare l'ipotesi che le macchie di sangue lasciate sul coltello fossero di cinghiale (associando all'ipotesi una probabilità) e che appartenessero proprio al cinghiale bracconato. I risultati delle analisi dei 12 microsatteliti hanno evidenziato che i profili genetici delle tre macchie di sangue appartenevano ad un animale che aveva una probabilità superiore al 98% di essere un cinghiale. Inoltre, gli stessi profili genetici corrispondevano perfettamente a quelli del cinghiale bracconato, fornendo la prova inconfutabile che *quel* coltello era stato utilizzato per uccidere *quel* cinghiale.

I risultati delle indagini forensi svolte in laboratorio hanno reso il sospettato passibile di denuncia per bracconaggio, nonché di crudeltà verso gli animali.

Conclusioni

L'analisi del DNA nelle indagini forensi sta diventando uno campo emergente e uno strumento indispensabile anche nei casi in cui le vittime siano gli animali selvatici. In particolare, gli ultimi ritrovati delle tecniche di genetica molecolare offrono un sostegno scientifico fondamentale per la lotta al bracconaggio di specie non cacciabili, protette, o in pericolo di estinzione, nonché alla prevenzione e alla persecuzione degli atti di crudeltà nei confronti degli animali. Il controllo del bracconaggio, del commercio illegale di animali vivi o di parti di animali, adesso può avvalersi di strumenti analitici sempre più potenti e affidabili, che permettono di stabilire con altissimo livello di confidenza il legame tra la vittima, il sospettato e la scena dell'illecito. In questo modo, molti degli odiosi atti perpetrati ai danni degli animali potranno essere attribuiti con certezza. Tuttavia, per aumentare l'efficienza e la qualità degli accertamenti, è auspicabile che vengano prodotti dei protocolli standardizzati da utilizzare nei vari laboratori che si occupano di tecniche molecolari forensi applicate alle specie selvatiche. Ciò servirebbe a potenziare le capacità investigative delle autorità competenti al fine di proteggere e conservare efficacemente le specie in natura.

Bibliografia

- [1] R. Lorenzini, M. Posillico, S. Lovari, A. Petrella. 2004. Noninvasive genotyping of the endangered Apennine brown bear: a case study not to let one's hair down. *Animal Conservation*, 7: 199-209.

- [2] R. Fico e R. Lorenzini. 2001. Forensic identification of wild animal tissues through electrophoresis of proteins and mtDNA analyses: field cases, in: 2nd Congress SIDiLV Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria, Salsomaggiore, Parma, 10-12 Settembre.

- [3] Lorenzini, R. 2005. DNA forensics and the poaching of wildlife in Italy: a case study. *Forensic Science International*, in stampa, pubblicato online il 25 Maggio.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare sentitamente tutte le figure professionali, dal personale forestale, ai guardiaparco, agli agenti provinciali, e tanti altri che continuamente si adoperano sul campo per arginare il fenomeno del bracconaggio, raccogliendo le prove con perizia e determinazione, contribuendo sostanzialmente alla salvaguardia degli animali selvatici.