

La Microbiologia forense ed il pericolo del bioterrorismo* (I^a parte)

Maria Nasso, Francesco Saverio Romolo*

Dipartimento Malattie Infettive Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*Dipartimento di Medicina Legale, Roma

SINTESI

Gli attacchi bioterroristici del 2001 con le lettere contenenti antracite hanno dimostrato che gli agenti patogeni e le tossine possono essere concretamente utilizzati come armi per un attentato terroristico. Per affrontare tali situazioni è nata una nuova disciplina nell'ambito delle scienze forensi, definita microbial forensics (microbiologia forense), che contribuisce alle indagini su un crimine eseguito utilizzando un'arma biologica. L'indagine di microbiologia forense si pone l'obiettivo di identificare l'agente patogeno responsabile, come avviene nel caso di un'indagine epidemiologica, ma con un grado di caratterizzazione molto più elevato. In questo caso si procede con un'analisi genetica per cercare di individuare univocamente la fonte del patogeno utilizzato,

seguendo un approccio comune a tutta la criminalistica, volto a classificare ed eventualmente identificare "le tracce e le cose pertinenti al reato". In seguito agli attacchi del 2001 si è effettuata la genotipizzazione del B. anthracis su 8 loci polimorfici VNTR (variable number tandem repeat) con la MLVA (multilocus variable tandem repeat analysis). Recentemente, alcuni gruppi di ricerca hanno aumentato il numero dei loci a 25, mentre un altro gruppo ha individuato un altro tipo di polimorfismi (SNR, single nucleotide repeat) con un maggiore grado di mutazione. Il sistema basato sui markers SNRs permette di distinguere fra isolati batterici che hanno una bassissima variabilità genetica e che mostrano un identico genotipo MLVA.

Introduzione

Negli ultimi anni il tema delle scienze forensi è divenuto sempre più popolare. Da un lato, letteratura, cinema e televisione hanno diffuso un'immagine estremamente positiva degli esperti in scienze forensi. Dall'altro, gli organi di informazione hanno portato alla ribalta vicende che inducono a sminuire l'efficacia di tali discipline. In tempi recenti, il caso di Brandon Mayfield, che ha messo in dubbio la validità delle stesse impronte digitali¹, ha rianimato il dibattito sull'esistenza o meno di una materia qualificabile come scienze forensi. Per alcuni Autori, infatti, le scienze forensi sono costituite da un insieme eterogeneo di discipline che hanno come unico elemento in comu-

ne un generico riferimento al contesto giuridico di utilizzazione delle informazioni scientifiche. In realtà, la nascita di nuove materie definibili come "forensi" consente una riflessione più generale sulla natura delle scienze forensi nel loro complesso.

Lo scopo del presente lavoro è quello di illustrare la disciplina denominata in lingua inglese *microbial forensics*, di seguito indicata come "microbiologia forense", mostrando come in essa siano applicati i principi fondamentali e l'approccio operativo della criminalistica.

Le scienze forensi

Classificare le scienze forensi non è compito facile. Esistono diverse definizioni e il dibattito sulla natura

*L'impostazione del presente lavoro è frutto di una riflessione comune. Peraltro, i paragrafi primo, secondo, quinto e ottavo sono da attribuirsi a Francesco Saverio Romolo, mentre i paragrafi terzo, quarto, sesto e settimo sono da attribuirsi a Maria Nasso.

stessa delle scienze forensi è ancora aperto. In termini assai generali, possiamo definire le scienze forensi come lo studio di informazioni scientifiche che hanno conseguenze giuridiche. Secondo tale accezione, il contributo delle scienze forensi si riscontra a partire dalla redazione di una norma, come nel caso della CWC (*Chemical Weapons Convention*) e della BTWC (*Biological and Toxin Weapons Convention*). In termini più specifici, invece, il contributo delle scienze forensi si limita all'applicazione delle norme, siano esse penali, civili o amministrative².

In particolare, nel caso di indagini penali, si può parlare di "criminalistica", termine elaborato da Gross alla fine del XIX secolo. La criminalistica è basata su un fenomeno denominato "principio di Locard": il criminale trasferisce tracce sulla scena del crimine e sulla vittima, e dalla scena del crimine e dalla vittima le tracce si trasferiscono sul criminale³. Il lavoro dello specialista parte, dunque, dalla scena del crimine, dove si realizza la prima fase della formazione della prova scientifica. Le fasi successive sono quelle della raccolta, dell'analisi, dell'interpretazione e, finalmente, del dibattimento innanzi al giudice⁴. Bisogna attendere il 1963 per un primo tentativo di definizione di criminalistica da parte di Kirk, che la qualifica come "scienza dell'individuazione"⁵. Più recentemente, Inman e Rudin hanno approfondito il tema dell'origine della prova scientifica, illustrando come esistano due principi fondamentali sui quali si basa la formazione della prova scientifica: quello che postula la divisibilità della materia⁶ e il principio di Locard.

Quindi, gli specialisti iniziano la propria attività che si realizza in fasi successive a partire dalla scena del crimine. La prima fase è quella della "classificazione", che consente di determinare la natura di una traccia⁷, la seconda è quella dell'"identificazione", che permette di risalire alla fonte di una traccia. L'identificazione si realizza attraverso il confronto fra una traccia di origine incerta e una di origine certa nel tentativo di determinare se i due elementi del confronto abbiano la stessa origine^{5,7,8}. L'identificazione può portare alla fase successiva di "associazione" di un sospetto alla scena del crimine, dove è stata rinvenuta la traccia⁹. La fase conclusiva è quella della ricostruzione della condotta dell'individuo sospettato dell'atto criminale⁷. Nel corso del presente lavoro illustriamo come anche la microbiologia forense sia fondata sul principio di Locard e su quello della divisibilità della materia e come l'attività degli specialisti in tale disciplina si svolga a partire dalla scena del crimine per fasi successive classificando e in seguito identificando elementi di prova, per tentare di associare un sospetto a un crimine e di ricostruirne la condotta.

Ricostruzione storica della guerra biologica e del bioterrorismo

Ricostruire la storia dell'uso delle armi biologiche, da un punto di vista scientifico, non è cosa facile, perché spesso mancano dati epidemiologici e microbiologici certi, oltre che conferme storiche sul fatto che aggressioni di questo tipo siano realmente accadute. Sicuramente, nella prospettiva di tale tentativo, non si può prescindere dal distinguere il concetto di guerra biologica da quello di bioterrorismo: la guerra biologica può essere definita come l'uso deliberato e intenzionale di agenti biologici o di loro vettori per danneggiare un nemico mentre il bioterrorismo rappresenta una forma di terrorismo che prevede l'utilizzo sistematico della violenza mediante l'uso o la minaccia dell'uso di agenti biologici, per condizionare società o governi nelle loro scelte politiche¹⁰.

Il termine bioterrorismo nasce negli anni Novanta ed è in questo periodo che si comincia a percepire il fenomeno come una minaccia per la salute pubblica. Infatti, è proprio in questi stessi anni che la letteratura scientifica comincia a dedicare al terrorismo biologico le prime pubblicazioni^{11,12}.

Conoscere la storia della guerra biologica è importante perché nella quasi totalità dei casi gli agenti biologici utilizzati o utilizzabili per atti bioterroristici furono sperimentati e allestiti nel passato proprio a scopo bellico^{13,14}. La guerra biologica trova le sue radici nell'antichità. Fra il quattordicesimo e il decimo secolo avanti Cristo, i cacciatori della Papuasias utilizzavano tossine vegetali per rendere velenosa la punta delle loro frecce¹⁵. L'intenzionale diffusione di malattie infettive fra le popolazioni sembra essere largamente responsabile anche di alcuni episodi che hanno caratterizzato il Medio Evo. La peste nera, che si diffuse attraverso il vicino oriente in Africa settentrionale e in Europa alla metà del quattordicesimo secolo, rappresentò probabilmente il più grande disastro sanitario della storia. Stime prudenti affermano che la sola Europa perse, durante la pandemia, circa trenta milioni di abitanti^{16,17}. Molti storici imputano la diffusione di tale pestilenza ad un episodio di guerra biologica avvenuto nel 1346, ben documentato in uno scritto di un notaio piacentino, Gabriele De Mussi, durante l'assedio di Caffa, antico nome della moderna città di Feodosija sul Mar Nero¹⁸. Caffa costituiva un'importantissima base commerciale per Genova ed era già da tempo contesa con i mongoli. Nel 1345 la città fu riconquistata dagli italiani, ma un'epidemia di peste, che intanto aveva cominciato a diffondersi fra i tartari, fornì a questi ultimi lo strumento per espugnare la città: i tartari, infatti, catapultarono i cadaveri dei loro compagni appestati all'interno delle mura, proprio nella speranza che l'epidemia devastasse la città, ormai in

mano al nemico^{19,20}. La successiva circolazione nei vari porti europei dei bastimenti occidentali e dei marinai, che vedevano nella fuga l'unica possibilità di scampare all'epidemia, causò il diffondersi rapido della pandemia nel Mediterraneo^{18,21,22}.

Episodi di guerra biologica costellano anche l'epoca del colonialismo europeo in America: di particolare rilievo risulta essere un episodio avvenuto durante la guerra dei sette anni tra Francia e Inghilterra^{23,24}. Nel 1763, il comandante delle forze britanniche in Nord America, Sir Amherst, donò ai pellerossa, assoldati dai francesi per presidiare Fort Carillon, coperte e fazzoletti infetti che aveva prelevato nel vicino ospedale di Fort Pitt, dove era scoppiata un'epidemia di vaiolo, come falso suggello di pace. Fu così che si verificò un'epidemia fra i nativi nella vallata dell'Ohio River, che durò per circa duecento anni^{25,26}.

Lo scenario della guerra biologica, però, cambiò completamente a partire dalla seconda metà del diciannovesimo secolo, periodo che segnò la nascita della moderna microbiologia in seguito alla scoperta di numerosi agenti eziologici responsabili delle più importanti patologie infettive: Pasteur identificò gli agenti eziologici di carbonchio e rabbia, mentre Koch quelli di tubercolosi e colera. Nei decenni successivi vennero identificati con certezza i microbi responsabili di peste, difterite, tifo e di molte altre malattie infettive²⁷. Paradossalmente, proprio tale vertiginoso progresso in ambito biomedico determinò le basi della moderna guerra biologica. Infatti, parallelamente alla capacità di identificare agenti eziologici, la nascente microbiologia aveva fornito la capacità di isolare agenti patogeni, di moltiplicarli *in vitro* e di crearne scorte pressoché illimitate.

Tali effetti cominciarono a vedersi durante il primo conflitto mondiale^{16,28}. In particolare fu la Germania a sviluppare, per prima, un ambizioso programma di guerra biologica. Nel 1915 fu arrestato un medico tedesco, Anton Dilger, accusato di detenere nella sua casa americana colture cellulari di *Bacillus anthracis* e *Pseudomonas mallei*, e di averle consegnate a un portuale di Baltimora affinché le inoculasse in oltre 3000 capi di cavalli, muli e bovini, destinati al mercato europeo^{29,30}. Un caso analogo avvenne circa un anno dopo in Romania per mano di sabotatori tedeschi, che utilizzarono gli stessi patogeni per infettare greggi di pecore destinati all'esportazione verso l'Impero Russo³¹.

In seguito a questi e ad altri episodi, al termine della Prima Guerra Mondiale, la neonata Società delle Nazioni si trovò costretta a regolamentare l'uso delle armi non convenzionali, principalmente quelle chimiche, che avevano mostrato per la prima volta le loro potenzialità. L'atto conclusivo dell'opera diplomatica fu rappresentato dal Protocollo di Ginevra, redatto il 17 giugno 1925, che proibiva l'uso di armi chimiche.

Su iniziativa della Polonia furono aggiunte le armi biologiche, ma il trattato non proibiva né la ricerca di base né la produzione, il possesso e lo stoccaggio³².

Durante la Seconda Guerra Mondiale molte furono le nazioni belligeranti che svilupparono la ricerca e la produzione di armi biologiche, in particolare il Giappone¹⁹. Furono, infatti, proprio i giapponesi, sotto la guida dell'ufficiale medico dell'esercito imperiale giapponese, Shiro Ishii, a organizzare durante la guerra fra Cina e Giappone una speciale sezione dell'esercito, l'Unità 731, destinata a sperimentare le potenzialità delle armi biologiche. Ishii era un eccellente microbiologo e divenne, dopo qualche anno, il protagonista della guerra biologica giapponese. Il principale metodo di ricerca fu rappresentato dall'infezione di cavie umane (i prigionieri cinesi), utilizzando come patogeni infettanti *Bacillus anthracis*, *Neisseria meningitidis*, *Shigella spp*, *Vibrio cholerae* e *Yersinia pestis*^{17,33}. Migliaia di cittadini cinesi morirono in seguito a ripetute epidemie causate da tali agenti³⁴. Intanto gli Stati Uniti, avendo cominciato un programma di ricerca sulle armi biologiche solo più tardi, nel 1943, si impadronirono dei frutti delle ricerche dell'Unità 731, avviando il loro programma di ricerca biologica, che conobbe un grande sviluppo durante la Guerra Fredda, e determinando l'insabbiamento delle indagini sui crimini compiuti da Ishii³⁵. In particolare, alcune ricerche condotte da due professori dell'Università di Toronto, Stephen Endicott ed Edward Hagerman, riportano che nel 1950, quando le truppe cinesi entrarono in guerra a fianco della Corea del Nord, gli Stati Uniti avviarono, sotto la supervisione dell'aviazione, un programma urgente (*crash program*) su nuove armi anti-uomo³⁶. Sembra che, in base a un accordo con Gran Bretagna e Canada, stessero lavorando alla creazione di insetti-vettore e al metodo migliore per diffonderli; tutto questo sarebbe avvenuto a Fort Detrick, centro della ricerca sulle armi non convenzionali dal 1942 al 1969, anno in cui il presidente Nixon ne decretò la chiusura^{23,37,38}.

I militari cinesi pubblicarono alla fine del febbraio 1952 un rapporto dove dichiararono l'insorgenza di focolai di malattie insolite. Tra le più gravi, un'epidemia di encefalite tossica acuta durante tutto il marzo 1952 in tre città nel cuore della Cina industriale, nella provincia del Liaoning, al confine con la Corea. L'encefalite, propagata dalle zecche, non era sconosciuta, ma quel tipo di encefalite sembrò diversa da quelle già note e, probabilmente, non fu causata da punture di insetti³⁶.

Fu alla fine degli anni Sessanta che i Paesi occidentali decisero di interrompere la corsa allo sviluppo e alla produzione di armi biologiche, poiché si cominciò a percepire la forte imprevedibilità degli effetti di tali ar-

mi. Si decise inoltre di rompere il legame tra armi chimiche e armi biologiche che era esistito fino ad allora, proponendo un trattato per l'eliminazione delle sole armi biologiche³². Nel 1972 si firmò la Convenzione per il divieto della messa a punto, fabbricazione e stoccaggio delle armi biologiche e delle tossine, nota come *Biological and Toxin Weapons Convention*³⁹.

Tuttavia la BTWC si dimostrò nel tempo uno strumento poco efficace a causa della mancanza di una severa strategia di controllo e verifica³². Ad esempio, l'Unione Sovietica fu accusata di aver usato armi biologiche sul campo anche dopo la firma della Convenzione, fra il 1975 e il 1983, durante gli attacchi a Laos e Cambogia. Secondo fonti americane, furono sparsi da aeroplani ed elicotteri aerosols colorati (*yellow rain*) che determinarono molte vittime⁴⁰. Sembra che si stesse sperimentando un nuovo agente biologico estremamente potente del tipo delle micotossine T2⁴¹. Ma la prova inconfutabile del fatto che i sovietici stavano continuando la loro ricerca biologica arrivò in seguito all'incidente del 1979, in cui un'esplosione nello stabilimento di Sverdlovsk provocò il rilascio di una grande quantità di spore di antrace⁴². Nei giorni seguenti tra la popolazione scoppiò un'epidemia di carbonchio; le persone colpite furono circa 90, i morti più di 70. Solo nel 1992 il presidente Eltsin dichiarò la vera causa dell'epidemia, ossia l'accidentale rilascio di spore di antrace utilizzate in un programma di studio sulle armi biologiche⁴²⁻⁴⁴. Dopo questo episodio i ricercatori russi del laboratorio di Sverdlovsk ricevettero l'ordine di smaltire le scorte dei batteri di antrace accumulate fino a quel momento. Nella primavera del 1988 vennero sotterrate nell'isola di Vozrozhdeniye, nel Mare d'Aral, centinaia di tonnellate di polveri di antrace chiuse dentro contenitori d'acciaio inossidabile. L'isola è quindi divenuta il più grande luogo di sepoltura dell'antrace nel mondo. Gli scienziati sovietici, sfruttando l'isolamento del luogo, ne avevano fatto la base per lo studio e il perfezionamento di armi biologiche, studiando principalmente la resistenza agli antibiotici degli agenti eziologici di peste, tularemia e brucellosi. Il Lago d'Aral, che bagna le terre del Kazakistan e dell'Uzbekistan, negli anni Sessanta era considerato il quarto mare interno più grande del mondo. Oggi è ridotto a circa la metà delle sue originarie dimensioni, mentre l'isola di Vozrozhdeniye è divenuta un deserto che sta avvicinandosi sempre più alla terra circostante⁴⁵. C'è dunque un alto pericolo di riemersione degli agenti biologici seppelliti dai sovietici, poiché si potrebbe creare un passaggio per insetti, roditori e rettili e, quindi, una possibile via di infezione per la popolazione kazaka. Il 97% delle donne della regione soffre di anemia e molti bambini nascono con gravi malformazioni o deficit genetici. La mortalità infantile è

dell'80 per mille, dieci volte più di quella italiana, mentre sono in continua crescita la febbre tifoide, la tubercolosi, l'epatite virale e il cancro dell'esofago^{45,46}. Molte spore, infatti, nonostante i trattamenti subiti con la candeggina, sono ancora vive e quindi potenzialmente letali⁴⁷.

Fu negli anni Ottanta che l'utilizzo di agenti biologici a scopo offensivo passò dall'ambito prettamente militare a quello bioterroristico da parte di gruppi di persone appartenenti a varie sette politico-religiose, responsabili di episodi di contagio.

Nel 1984 alcuni adepti della setta dei devoti del culto indiano di Rajaneeshee diffusero la *Salmonella typhimurium* nei *salad bar* dell'Oregon, provocando un'epidemia con oltre 750 casi di tossinfezione, dei quali 45 così gravi da richiedere ospedalizzazione^{11,48}.

La setta religiosa giapponese degli Aum Shinrikyo, guidata da Soho Asahara, divenne tristemente nota per l'attentato con il gas nervino *Sarin* nella metropolitana di Tokyo nel 1995, nel quale morirono dodici persone e ne rimasero intossicate migliaia⁴⁹⁻⁵³. Lo stesso gruppo aveva realizzato un attacco con *Sarin* nella città di Matsumoto l'anno precedente, causando 7 decessi^{54,55}. Aveva, inoltre, programmato un altro attentato a Tokyo con la tossina botulinica contenuta all'interno di tre valigie abbandonate; l'attentato non ebbe effetto, poiché un membro della setta aveva sostituito la tossina con materiale non pericoloso⁵⁶. Nel 1993 alcuni membri della stessa setta avevano aerosolizzato spore di *B. anthracis* sulla città di Kameido. Il ceppo batterico utilizzato per l'attentato era lo stesso impiegato in Giappone per la profilassi animale contro il carbonchio⁵⁷.

Per quanto riguarda invece gli Stati Uniti, ricordiamo l'arresto, nel maggio del 1995, di Larry Harris, un tecnico di laboratorio dell'Ohio facente parte dell'organizzazione estremista *Aryan Nation*. Una settimana prima era riuscito ad acquistare per posta da una società di forniture biomediche, l'*American Type Culture Collection* di Rockville, tre fiale contenenti *Yersinia pestis*. Qualche mese dopo Harris, condannato a una blanda pena per frode postale, venne rimesso in libertà poiché il tribunale credette alla sua versione, secondo la quale stava effettuando ricerche per neutralizzare ratti iracheni, che, secondo lui, erano stati infettati con la peste dagli scienziati di Saddam Hussein e introdotti negli Stati Uniti⁵⁸.

Dopo questo episodio, l'acquisto e lo spostamento di agenti patogeni in America furono sottoposti a un rigido controllo affidato ai *Centers for Disease Control and Prevention* (CDCs)⁵⁹. Il principale dei provvedimenti adottati per controllare il mercato di agenti biologici fu rappresentato dall'*Antiterrorist and Effective Death Penalty Act* (AEDPA), proposto proprio dai

TAB. 1

Episodi significativi di guerra biologica e bioterrorismo dall'antichità ai giorni nostri. Il simbolo / indica dati mancanti dovuti alla scarsità di riscontri storici circa l'avvenimento.

Epoca, luogo, autori	Mezzi	Agente biologico	Vittime
1400-1000 a.C. Papuasia Cacciatori magdeliani	Frecce avvelenate	Tossine vegetali	/
1346 Città di Caffa Tartari	Cadaveri appestati	<i>Yersinia pestis</i>	30 milioni di vittime in Europa, Africa e Vicino Oriente
1763 Guerra dei sette anni Inglese	Coperte e fazzoletti infetti donati ai nativi d'America che presidiavano Fort Carillon per conto dei francesi	<i>Variola major</i>	Epidemia che colpì Ohio River e durò 200 anni
1915-1916 Prima Guerra Mondiale Tedeschi	Cavalli, muli, bovini e pecore destinati al mercato europeo e russo	<i>Bacillus anthracis</i> , <i>Pseudomonas mallei</i>	/
1930-1945 Guerra Cina-Giappone Giapponesi	Cavie umane (prigionieri cinesi) usati per la sperimentazione di nuovi agenti infettanti	<i>Bacillus anthracis</i> , <i>Neisseria mening.</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Yersinia pestis</i>	Alcune migliaia
1950-1953 Guerra di Corea Stati Uniti	Insetti-vettore	Encefalite tossica	Centinaia
1975-1983 Attacchi contro Laos e Cambogia Unione Sovietica	Aereosol (<i>yellow rain</i>)	Micotossina T2	Centinaia
1984 Oregon Setta di Rajaneeshee	Cibo contaminato nei <i>salad bar</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	750
1988 Isola di Vozrozhdeniye nel Mare d'Aral Unione Sovietica	Contenitori pieni di spore di <i>Bacillus anthracis</i> prodotti a Sverdlovsk fino al 1979 Manipolazione di diversi ceppi batterici per migliorare la resistenza agli antibiotici	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Yersinia pestis</i> , <i>Variola major</i> , <i>Francisella tular.</i>	66 /
1992 Zaire Aum Shinrikyo	Soccorso umanitario alle popolazioni colpite da un'epidemia del virus <i>Ebola</i> per procurarsi il virus a scopo bioterroristico	<i>Ebola</i>	/
1995 Tokyo Aum Shinrikyo	Valigie contenenti tossine	Tossina botulinica rimossa da un adepto "pentito"	Nessuna
1996 Saint Paul Hospital, Texas Diane Thompson	Focaccine contaminate con brodocoltura	<i>Shigella dysenteriae</i>	12
2001 Stati Uniti	Lettere inviate attraverso il servizio postale contenenti spore	<i>Bacillus anthracis</i>	22 (5 morti)

CDCs e approvato nel 1996 dal Congresso statunitense, che regolamentò il trasporto e la vendita di batteri, virus, funghi e tossine^{60,61}.

Un altro episodio si verificò in Texas nel 1996, all'ospedale Saint Paul, dove Diane Thompson, un tecnico di laboratorio, contaminò due scatole di focaccine con una brodocoltura di *Shigella dysenteriae*, invitando i colleghi ad assaggiarle; tutte le dodici persone che avevano accettato l'invito si ammalarono e quattro dovettero essere ospedalizzate^{62,63}. La colpevole fu processata e condannata a venti anni di reclusione^{15,62}.

L'emergenza bioterrorismo divenne, però, di portata mondiale e con un forte impatto sull'opinione pubblica a seguito degli attacchi all'antrace del 2001, pochi giorni dopo gli attentati alle Torri Gemelle di New York dell'11 settembre⁶⁴. Vennero inviate una serie di lettere contenenti spore del *Bacillus anthracis* e il 4 ottobre venne registrato il primo caso di contagio di un uomo nella contea di Palm Beach con la diagnosi di carbonchio polmonare, una malattia che negli Stati Uniti non si segnalava dal 1975⁶⁵⁻⁶⁸. Fino al 20 novembre successivo furono identificati 22 casi di infezione che compresero 11 casi di contaminazione per via inalatoria, di cui 5 mortali^{67,69,70}.

Scattò immediatamente la caccia all'untore che per mesi paralizzò l'opinione pubblica, senza che ancora oggi siano stati individuati i responsabili.

Nella Tabella 1 sono schematizzati gli episodi significativi di guerra biologica e bioterrorismo dall'antichità ai giorni nostri.

Bibliografia

- Cole SA. More than zero: accounting for error in latent fingerprint identification. *J Crim Law Criminol* 2005; 95: 3.
- Gialamas DM. *Criminalistics*. In: Siegel J, Knupfer G, Saukko P(eds). *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Academic Press, London, 2000, pp. 471-479.
- Locard E. *L'Enquête criminelle et les methodes scientifiques*. Flammarion, Paris, 1920.
- Gaudette BD. *Basic principles of forensic science*. In: Siegel J, Knupfer G, Saukko P(eds). *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Academic Press, London, 2000, p. 297.
- Kirk PL. The ontogeny of criminalistics. *J Crim Law Criminol Police Sci* 1963; 54: 235-238.
- Inman K, Rudin N. The origin of evidence. *Forensic Sci Int* 2002; 126: 11-16.
- DeForest P, Gaensslen R, Lee H. *Forensic Science. An Introduction to Criminalistics*. McGraw Hill, New York, 1983.
- Kirk PL. *Criminal Investigation*. 2nd ed., Wiley, New York, 1974.
- Osterburg JW. *The Crime Laboratory. Case Studies of Scientific Criminal Investigation*. Indiana University Press, Bloomington, 1968.
- Urbano F. *Bioterrorismo. Excursus storico*. In: *Lezioni del Corso di perfezionamento "Diagnostica microbiologica: attualità e prospettive"*. Università di Firenze, 29 novembre 2002.
- Torok TJ, Tauxe RV, Wise RP et al. A large community outbreak of salmonellosis caused by intentional contamination of restaurant salad bars. *JAMA* 1997; 278: 389-395.
- Henderson DA. Bioterrorism as a public health threat. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 488-492.
- Jean C. *Guerra, strategia e sicurezza*. Laterza, Bari, 1996.
- Greco P. *Bioterrorismo. Antrace, gas nervini e bombe atomiche. Quali rischi corriamo e come possiamo difenderci*. Editori Riuniti, Roma, 2001.
- Jacobs MK. The history of biologic warfare and bioterrorism. *Dermatol Clin* 2004; 22: 231-246.
- Geissler E, van Courtland Moon JE. *Biological and toxin weapons research. Development and use from the Middle Ages to 1945*. In: SIPRI (Stockholm International Peace Research Institute). *Chemical and Biological Warfare Studies* n. 18. Oxford University Press, Oxford, 1999.
- Riedel S. Plague: from natural disease to bioterrorism. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2005; 18: 116-124.
- Derbes VJ. De Mussis and the great plague of 1348. A forgotten episode of bacteriological warfare. *JAMA* 1996; 196: 59-62.
- Riedel S. Biological warfare and bioterrorism: a historical review. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2004; 17: 400-406.
- Eitzen EM Jr, Takafuji ET. *Historical overview of biological warfare*. In: Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Office of the Surgeon General, Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center, Washington DC, 1997, pp. 415-423.
- Roffey R, Lantorp K, Tegnell A, Elgh F. Biological weapons and bioterrorism preparedness: importance of public-health awareness and international cooperation. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 522-528.
- Wheelis M. Biological warfare at the 1346 siege of Caffa. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 971-975.
- Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM Jr. Biological warfare. A historical perspective. *JAMA* 1997; 278: 412-417.
- Henderson DA, Inglesby TV, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Jahrling PB, Hauer J et al. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *JAMA* 1999; 281: 2127-37.
- Robertson AG, Robertson LJ. From asps to allegations: biological warfare in history. *Mil Med* 1995; 160: 369-373.
- Sipe, CH. *The Indian Wars of Pennsylvania*. Telegraph Press, Harrisburg PA, 1929.
- La Placa M. *Principi di microbiologia medica*. VII ed. Società Editrice Esculapio, Bologna, 1995.
- Leitenberg M. Biological weapons in the twentieth century: a review and analysis. *Crit Rev Microbiol* 2001; 27: 267-320.
- Roffey R, Tegnell A, Elgh F. Biological warfare in a historical perspective. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 450-454.
- Hugh-Jones M. Wickham Steed and German biological warfare research. *Intelligence and National Security* 1992; 7: 379-402.
- SIPRI (Stockholm International Peace Research Institute). *The Problem of Chemical and Biological Warfare*. Vol. I. *The Rise of CB Weapons*. Humanities Press, New York, 1971.
- Freeman SE. Present state of control of chemical and biological weapons. *Med War* 1991; 7: 16-20.
- Harris, SH. *Factories of Death*. Routledge, New York, 1994.
- Chen YF. Japanese death factories and the American cover-up. *Camb Q Healthc Ethics* 1997; 6: 240-242.
- Nie JB. The United States cover-up of Japanese wartime medical atrocities: complicity committed in the national interest and two proposals for contemporary action. *Am J Bioeth* 2006; 6: 21-33.
- Endicott S, Hagerman E. Biological warfare in the 1940s and 1950s. *JAMA* 2000; 284: 561; *author reply* 562.
- Marty AM. History of the development and use of biological weapons. *Clin Lab Med* 2001; 21: 421-434.
- Noah DL, Huebner KD, Darling RG, Waeckerle JF. The history and threat of biological warfare and terrorism. *Emerg Med Clin North Am* 2002; 20: 255-271.
- BTWC. Convention on the prohibition of the development, production and stockpiling of bacteriological and toxin weapon and on their destruction. Disponibile sul sito internet www.opbw.org (ultimo accesso gennaio 2007).
- Ember LR. Yellow rain. *Chem Eng News* 1984; 9: 8-34.
- Spyker MS, Spyker DA. Yellow rain: chemical warfare in Southeast Asia and Afghanistan. *Vet Hum Toxicol* 1983; 25: 335-340.
- Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, Langmuir A, Popova I, Shelokov A, Yampolskaya O. The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science* 1994; 266: 1202-08.

43. Caudle, LC. *The biological warfare threat*. In: Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR. eds. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*.: Office of the Surgeon General, Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC, 1997, 451-466.
44. Sternbach G. The history of anthrax. *J Emerg Med* 2003; 24: 463-467.
45. Alibek K. *Biohazard: the chilling true story of the largest covert biological weapons program in the world, told from inside by the man who ran it*. Random House, New York, 1999.
46. Fauci AS. Smallpox vaccination policy. The need for dialogue. *N Engl J Med* 2002; 346: 1319-20.
47. Szinicz L. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* 2005; 214: 167-181.
48. Cohen HW, Gould RM, Sidel VW. Bioterrorism initiatives: public health in reverse? *Am J Public Health* 1999; 89: 1629-31.
49. Masuda N, Takatsu M, Morinari H, Ozawa T. Sarin poisoning in Tokyo subway. *Lancet* 1995; 345: 1446.
50. Okumura T, Takasu N, Ishimatsu S et al. Report on 640 victims of the Tokyo subway sarin attack. *Ann Emerg Med* 1996; 28: 129-135.
51. Hui DM, Minami M. Monitoring of fluorine in urine samples of patients involved in the Tokyo sarin disaster, in connection with the detection of other decomposition products of sarin and the by-products generated during sarin synthesis. *Clin Chim Acta* 2000; 302: 171-188.
52. Bowler RM, Murai K, True RH. Update and long-term sequelae of the sarin attack in the Tokyo, Japan subway. *Chemical Health and Safety* (8,1) 1: 2001; 53-55.
53. Tokuda Y, Kikuchi M, Takahashi O, Stein GH. Prehospital management of sarin nerve gas terrorism in urban settings: 10 years of progress after the Tokyo subway sarin attack. *Resuscitation* 2006; 68: 193-202.
54. Morita H, Yanagisawa N, Nakajima T et al. Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. *Lancet* 1995; 346: 290-293.
55. Okudera H, Morita H, Iwashita T et al. Unexpected nerve gas exposure in the city of Matsumoto: report of rescue activity in the first sarin gas terrorism. *Am J Emerg Med* 1997; 15: 527-528.
56. Sugishima M. Aum Shinrikyo and the Japanese law on bioterrorism. *Prehospital Disaster Med* 2003; 18: 179-183.
57. Keim P, Smith KL, Keys C, Takahashi H, Kurata T, Kaufmann A. Molecular investigation of the Aum Shinrikyo anthrax release in Kameido, Japan. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4566-67.
58. Warheit DB. Biological agents with potential for misuse: a historical perspective and defensive measures. *Toxicology and Appl Pharmacol* 2004; 199: 71-84.
59. Gostin LO, Sapsin JW, Teret SP et al. The Model State Emergency Health Powers Act: planning for and response to bioterrorism and naturally occurring infectious diseases. *JAMA* 2002; 288: 622-628.
60. Hoffman RE. Preparing for a bioterrorist attack: legal and administrative strategies. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 241-245.
61. Martin W. Legal and public policy responses of states to bioterrorism. *Am J Public Health* 2004; 94: 1093-96.
62. Katzman S. Preparing for the worst. The USA and Japan's preparations for a terrorist attack with chemical or biological weapons. *EMBO Rep* 2000; 1: 387-389.
63. Barnaby W. *Guerra e terrorismo biologico, gli arsenali segreti nel mondo*. Fazi, Roma, 2001.
64. Brannen DE, Stanley SA. Critical issues in bioterrorism preparedness: before and after September 2001. *J Public Health Manag Pract* 2004; 10: 290-298.
65. Bush LM, Abrams BH, Beall A, Johnson CC. Index case of fatal inhalational anthrax due to bioterrorism in the United States. *N Engl J Med* 2001; 345: 1607-10.
66. Traeger MS, Wiersma ST, Rosenstein NE et al. First case of bioterrorism-related inhalational anthrax in the United States, Palm Beach County, Florida, 2001. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1029-34.
67. Jernigan DB, Raghunathan PL, Bell BP et al. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1019-28.
68. Maillard JM, Fischer M, McKee KT Jr., Turner LF, Cline JS. First case of bioterrorism-related inhalational anthrax, Florida, 2001: North Carolina investigation. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1035-38.
69. Valiante DJ, Schill DP, Bresnitz EA, Burr GA, Mead KR. Responding to a bioterrorist attack: environmental investigation of anthrax in New Jersey. *Appl Occup Environ Hyg* 2003; 18: 780-785.
70. Riedel S. Anthrax: a continuing concern in the era of bioterrorism. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2005; 18: 234-243.

ABSTRACT

The letters containing anthrax, sent in 2001 in USA, showed that pathogens and toxins can be effectively used for terrorist purposes. A new subfield of forensic science, called "microbial forensics", has been developed. It is a new scientific discipline dedicated to collect and analyze microbiological evidence from a scene of crime. In addition to collecting and analyzing traditional forensic evidences, the microbial forensic investigation will attempt to determine the identity of the causal agent, as so as epidemiologic investigation, but with higher-resolution characterization. The tools for a successful attribution include genetically based-assays to determine the exact strain of isolate, aiming

the individualization of the source of the pathogen used in a biological weapon. Following the 2001 anthrax attacks, genotyping of *B. anthracis* was done on 8 variable number tandem repeats loci (VNTR polymorphisms), with multilocus variable number tandem repeats (MLVA) method. In recent years some research groups have increased the VNTR markers number to 25 loci, while other groups have identified single nucleotide repeat (SNR) polymorphisms, which display very high mutation rates. SNR marker system allows the distinguishing of isolates with extremely low levels of genetic diversity within the same MLVA genotype.