

ANALISI DEL DNA A SCOPO FORENSE IN AMBITO ANIMALE



Alberto Santini PhD

a.santini@ngbgenetics.com

www.ngbgenetics.com

Bologna, 22 novembre 2014

ANALISI DNA FORENSE ANIMALE: QUANDO?



BRACCONAGGIO

PREDAZIONE ANIMALI DOMESTICI



INCIDENTI STRADALI
CAUSATI DA FAUNA
SELVATICA

ANALISI PARENTALI IN SPECIE
E RAZZE DI INTERESSE
ECONOMICO O AFFETTIVO



ANALISI DNA FORENSE ANIMALE: QUANDO?



- DETENZIONE ANIMALI A RISCHIO ESTINZIONE (36000 specie negli allegati A, B e C della Convenzione)
- CONTROLLO PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE (PELLI, ETC.)



CONTROLLO ANTIFRODE ALIMENTARE DELLE SPECIE



a) SOSTITUZIONE CARNI CON ALTRE DI MINOR PREGIO



ANALISI QUALITATIVA DI SPECIE

b) UTILIZZO DI CARNI MISTE



ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA DI SPECIE



SO

LE INCHIESTE

10 febbraio 2014 - Aggiornato alle 13.35

R.it

NAPOLI

Home

Cronaca

Sport

Foto

Ristoranti

Annunci L

Consiglia Condividi 8,6mila

Escrementi dei cani, scatta il controllo del Dna

Esperimento-pilota al Vomero e all'Arenella: l'ordinanza ha come obiettivo di porre un freno al fenomeno degli escrementi dei cani che non rispettano affatto il decoro urbano

Predazione di un branco di pecore attribuita a lupo: **è stato il pastore maremmano di un altro allevatore di pecore**



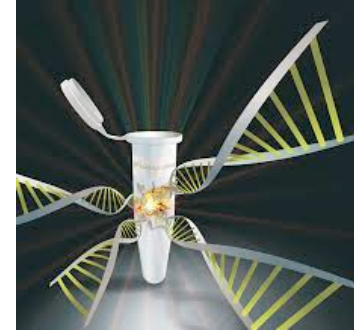
Carne sparsa rinvenuta nei freezer di sospetti bracconiere: **attribuita a cervo specie non cacciabile nella zona**



Sequestro giudiziario di presunto lupo selvatico a privato: **cane domestico**

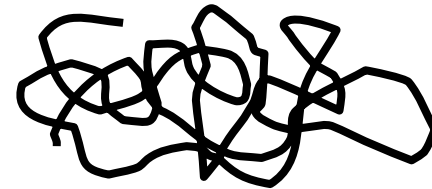


SANGUE
TESSUTO
PELI/PELLICCIA
PENNE/PIUME
FECI/URINA
OSSA
CARTILAGINI
CAMPIONI MUSEALI



DNA estratto da campioni di muscolo : >10 000 nucleotidi

Conc. = 10 $\mu\text{g/ml}$



DNA estratto da campioni fecali : < 300- 400 nucleotidi

Conc. = 0,001 $\mu\text{g/ml}$



MARCATORI MOLECOLARI: IDENTIFICAZIONE DELLA SPECIE

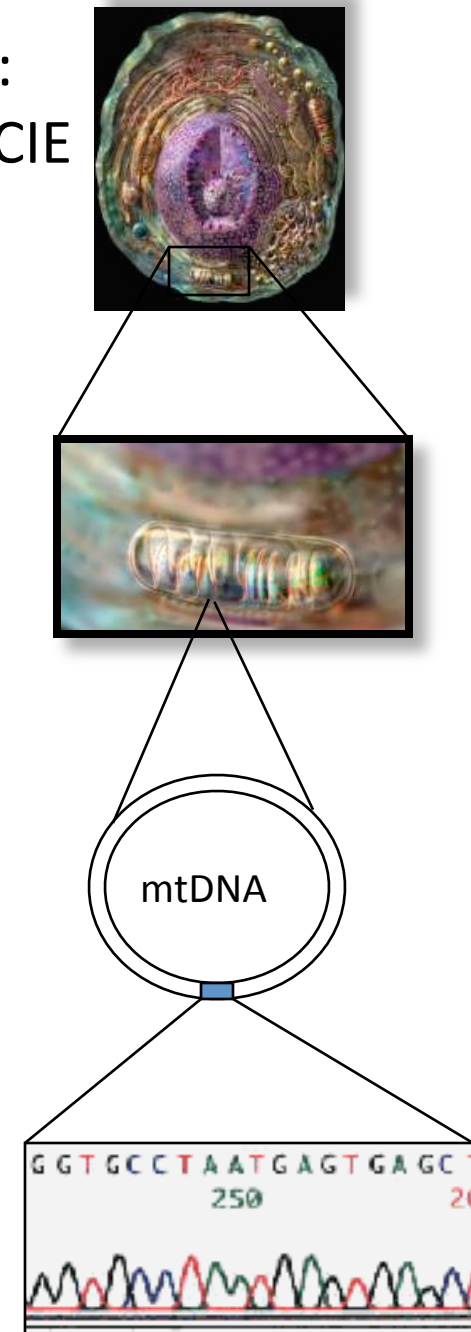
DNA MITOCONDRIALE (mtDNA)
Cytocrome B, Control Region

Caratteristiche:

- Genoma aploide
- Ereditato per via materna
- Non ricombinante
- Evolve più rapidamente del DNA nucleare

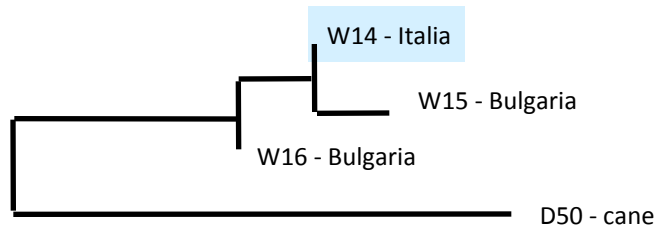
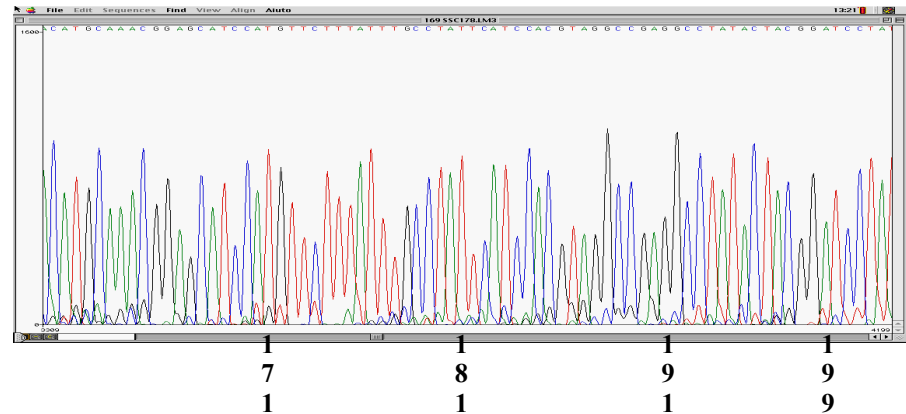
E' utilizzato per:

- Identificare unità tassonomiche
- Studi di filogeografia
- Studi sulla ibridazione (soltanto linea materna)



-

PCR



TAGCTCACTG **AT**CTATCAAC AGTAATC**AA**

- STR – Microsatelliti o SNPs più analisi di attribuzione

MARCATORI MOLECOLARI: IDENTIFICAZIONE DELL'INDIVIDUO

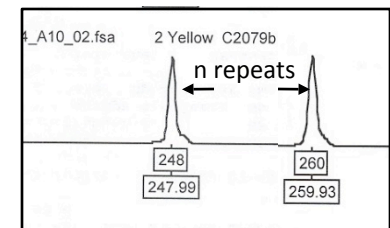
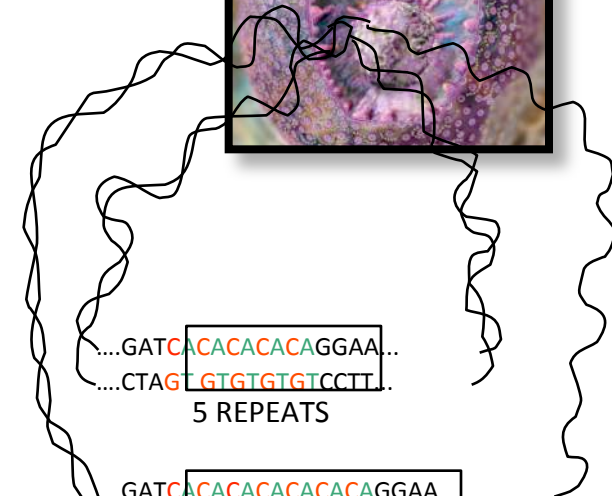
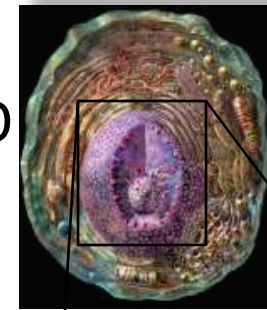
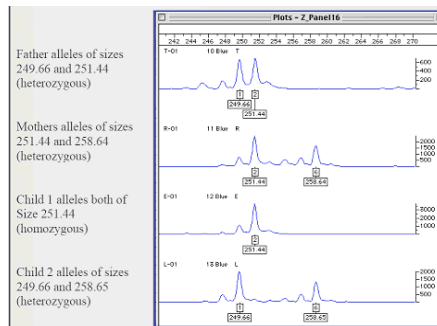
DNA MICROSATELLITE

Caratteristiche:

- Genoma diploide
- Ereditato per via biparentale
- Evolve molto rapidamente

E' utilizzato per:

- Studiare la struttura delle popolazioni
- Studiare l'ibridazione
- Identificare singoli individui
- Stabilire le relazioni parentali

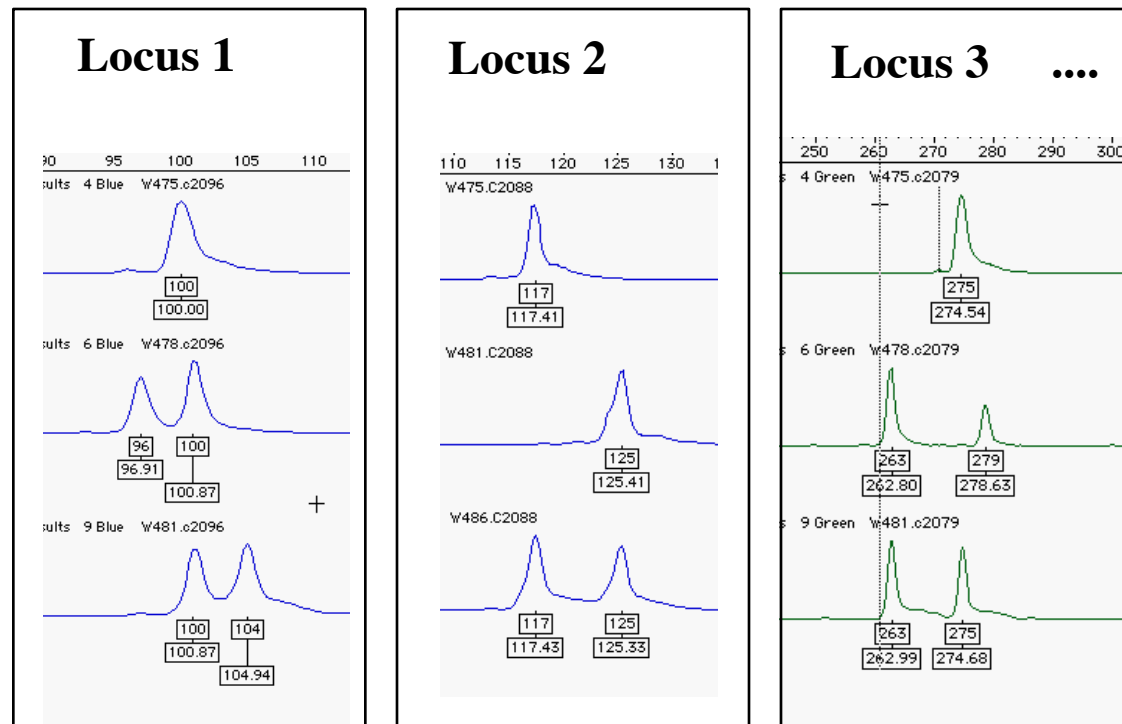


MARCATORI MOLECOLARI: IDENTIFICAZIONE DELL'INDIVIDUO

Campione A:

Campione B:

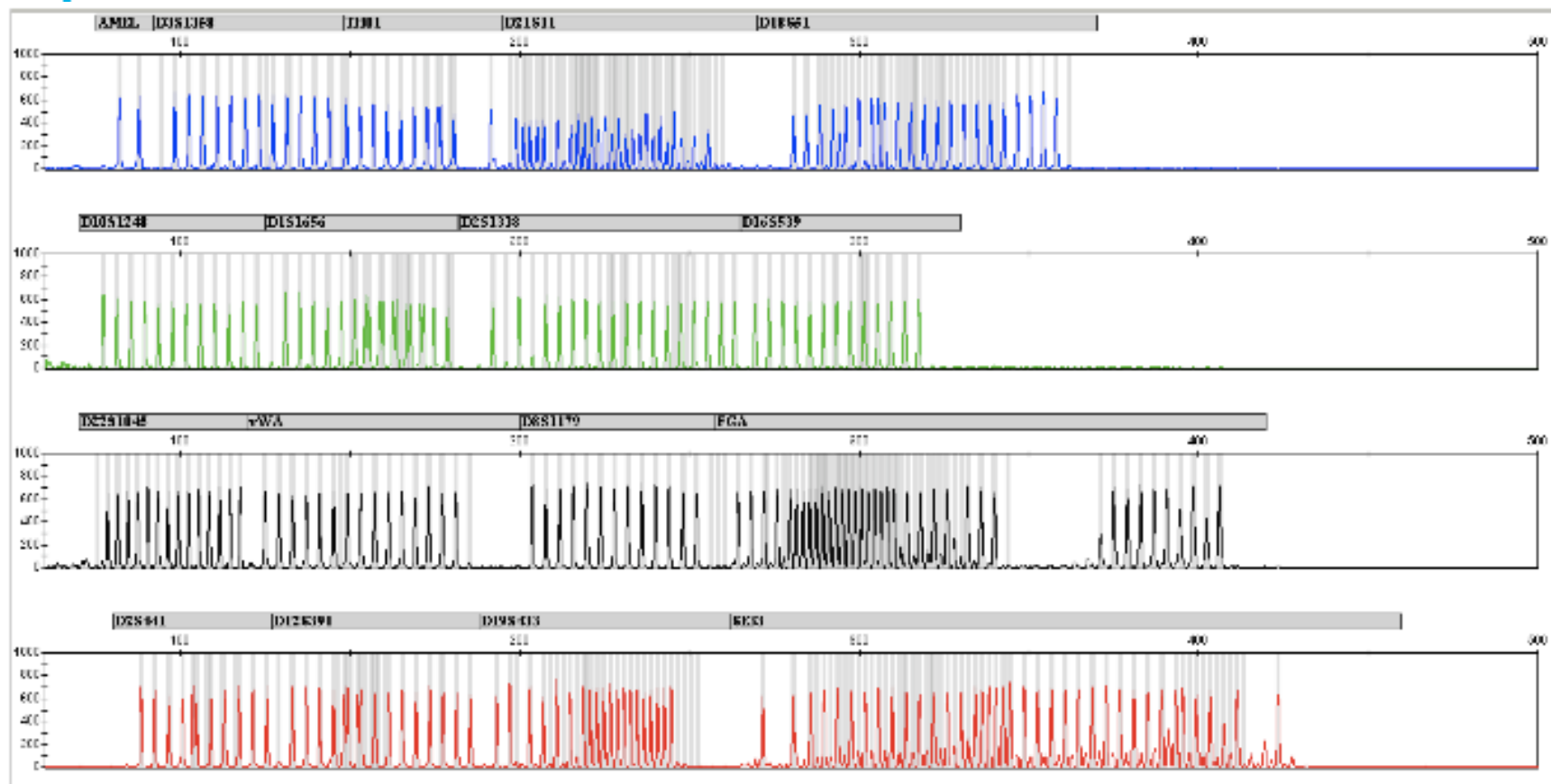
Campione C:



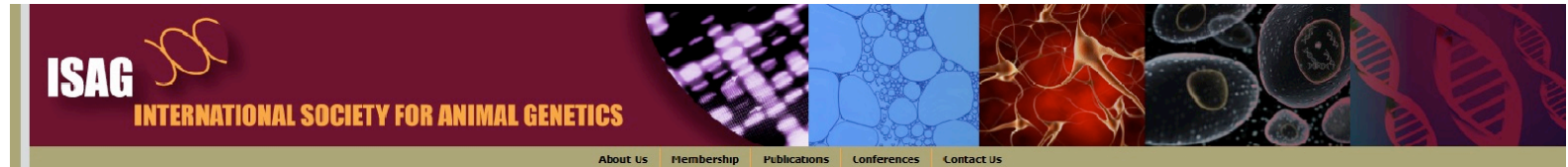


IN CAMPO ANIMALE NON CI SONO (O
QUASI!) **STANDARD GIA' DISPONIBILI**

LADDER ALLELICI SPECIE E MARCATORE SPECIFICO



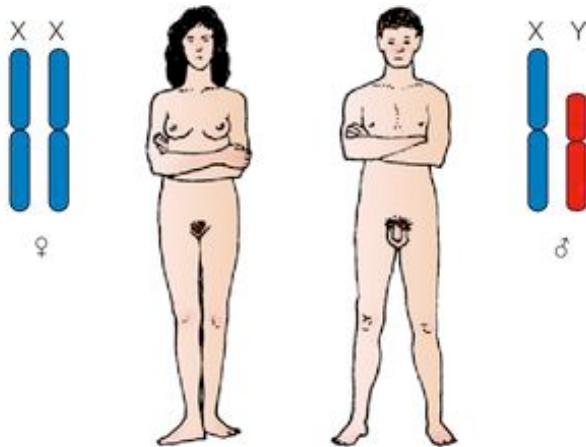
RIFERIMENTI SCIENTIFICI UFFICIALI



SPECIE: Cane Gatto Cavallo Vacca Maiale Pecora Capra Pollo etc.



DETERMINAZIONE GENETICA DEL SESSO



MAMMIFERI

Amelogenina
HAEIII
SRY



UCCELLI

CHD

LA PROBABILITA' DI IDENTITA'



= CAPACITA' DI DISTINGUERE UN INDIVIDUO DALL'ALTRO

= probabilità che due individui distinti abbiano lo stesso genotipo multilocus

GRANDEZZA DELLA POPOLAZIONE

NUMERO DI MARCATORI GENETICI UTILIZZATI

VARIABILITA' DEI MARCATORI GENETICI NELLA
POPOLAZIONE

SOGGETTI POTENZIALMENTE
IMPARENTATI

LA PROBABILITA' DI IDENTITA'



NUMERO DI MARCATORI GENETICI UTILIZZATI

+ MARCATORI GENETICI UTILIZZO = + INFORMAZIONE

ESEMPIO; STUDIO 1 VS STUDIO 2

STUDIO 1

10 MARCATORI GENETICI

STUDIO 2

4 MARCATORI GENETICI

LA PROBABILITA' DI IDENTITA'



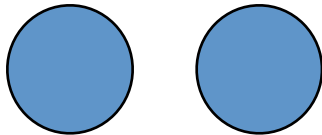
VARIABILITA' DEI MARCATORI GENETICI NELLA POPOLAZIONE

+ I MARCATORI GENETICI SONO VARIABILI = + INFORMAZIONE

ESEMPIO; DUE MARCATORI GENETICI CON NUMERO DI ALLELI
DIFFERENTE

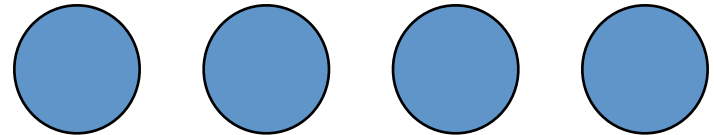
MARCATORE 1

2 ALLELI; A, B



MARCATORE 2

4 ALLELI; A, B, C, D



LA PROBABILITA' DI IDENTITA'



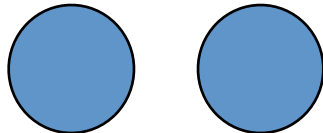
VARIABILITA' DEI MARCATORI GENETICI NELLA POPOLAZIONE

+ I MARCATORI GENETICI SONO VARIABILI = + INFORMAZIONE

ESEMPIO; DUE MARCATORI GENETICI CON LO STESSO NUMERO DI ALLELI MA DIFFERENTE FREQUENZA

MARCATORE 1

2 ALLELI; A, B



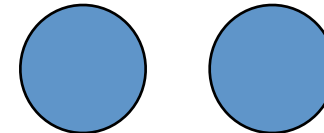
5%

95%

FREQUENZA

MARCATORE 2

2 ALLELI; A, B



50%

50%

LA PROBABILITA' DI IDENTITA'



SOGGETTI POTENZIALMENTE IMPARENTATI

ESEMPIO; AQUILA STUDIO 1 POPOLAZIONE VS STUDIO 2

STUDIO 1

STUDIO 2

POPOLAZIONE ITALIA

POPOLAZIONE PICCOLA

PROBABILE **ASSENZA** DI
SOGGETTI IMPARENTATI

SICURA **PRESENZA** DI
SOGGETTI IMPARENTATI

ESISTONO MARCATORI PER LA SPECIE CONSIDERATA?



CRITICITA' NELL'ANALISI FORENSE ANIMALE

- A) MARCATORI MOLECOLARI (SINGLEPLEX/
MULTIPLEX)
- B) PROTOCOLLI NON STARDIZZATI
- C) DATABASE RIFERIMENTO (STATISTICHE ETC.)
- D) LADDER ALLELICI
- E) STANDARD POSITIVI



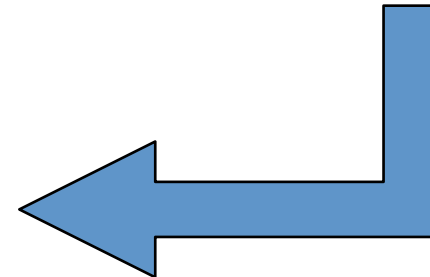
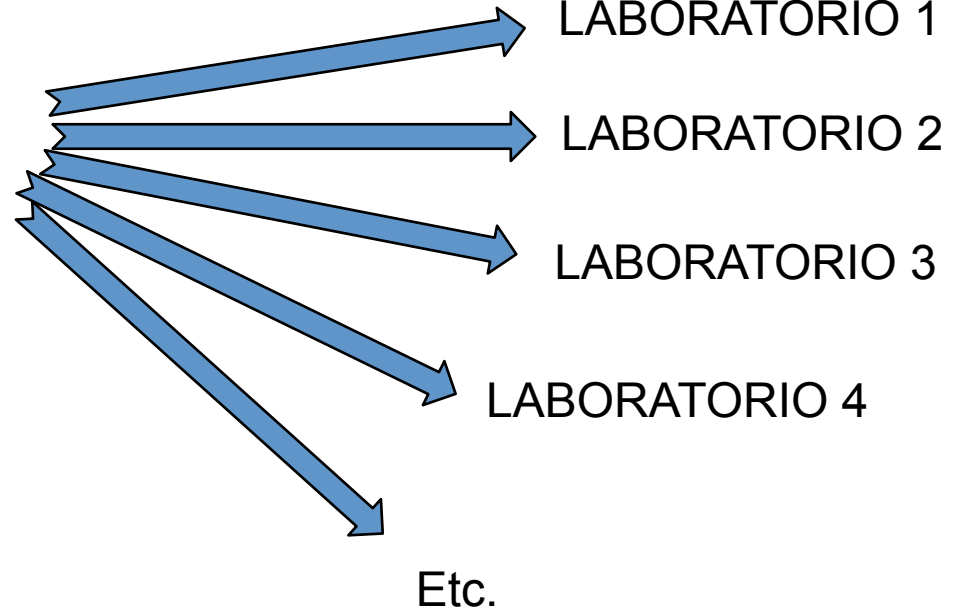
MI DEVO FARE
TUTTO DA
SOLO???????



COMPARISON TEST O RING TEST

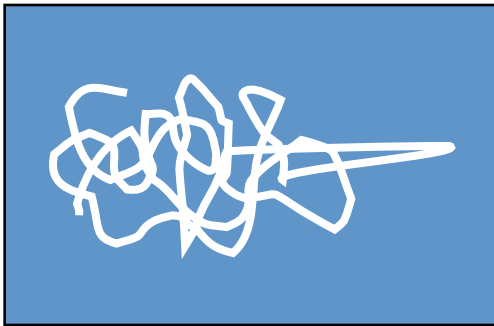


Stessi campioni



PROBLEMI DI ANALISI NELLE TRACCE FORENSI ANIMALE

DNA estratto da campioni di muscolo : > 10 000 bp



Concentrazione = 10 µg/ml



Concentrazione = 0,001 µg/ml



DNA

**Scarso
Degradato
Contaminato
Presenza di inibitori**

TAKE HOME MESSAGE

- 1) Lavorare in condizioni di massima sterilità**
- 2) Metodi di estrazione DNA estremamente accurati**
- 3) Scelta marcatori genetici opportuna**
- 4) Repliche di analisi**
- 5) Stima dell'affidabilità dei dati e dell'errore**
- 6) Continui controlli POSITIVI e NEGATIVI**



GRAZIE