

L'attività del Laboratorio di diagnostica molecolare forense del Centro di Referenza Nazionale per la Medicina Forense Veterinaria. Diagnosi e ricerca

Dalla progettazione alla realizzazione di un esperimento nel laboratorio di diagnostica molecolare forense

Luisa Garofalo
Biologa, Osservatorio Epidemiologico
IZS Lazio e Toscana di Roma



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

Animals can be the Victim

- Animal cruelty
- Identifying the remains of a lost pet
- Theft of an animal



Animals can be the Perpetrator

- Identification of an animal involved in an attack on a person or other animal
- Identification of an unrestrained animal causing an accident
- Identification of an animal responsible for property damage

Animals can be the Witness

- Animal DNA can link a suspect with a crime scene or victim. Transfer of DNA from hair, saliva, blood, urine, or feces can occur during the commission of a crime—from the victim's pet to the suspect or crime scene, and from the suspect's pet to the victim or crime scene.



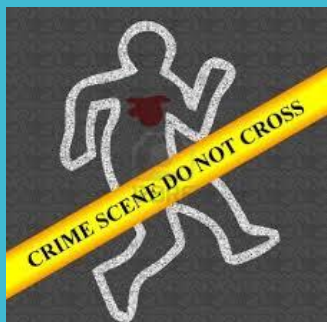
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

GENETICA FORENSE



**Vittima
umana**

UMANA

Una sola specie
⇒ **Protocolli standardizzati**



**Colpevole
umano**



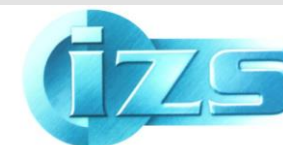
Vittima animale

ANIMALE

Più specie
⇒ **Protocolli da
standardizzare**



**Colpevole
umano**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

GENETICA FORENSE ANIMALE

Stato dell'arte

Pochi laboratori nel mondo (principalmente in Australia e USA), molto pochi in Europa (es. Scozia).

Tra loro, molte differenze per:

1. leggi nazionali
2. composizione in specie della fauna locale
3. metodologie adottate e grado di standardizzazione dei protocolli



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

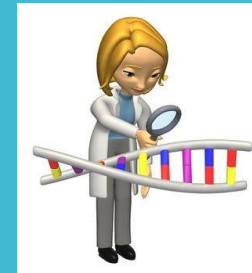
Test di routine

→ Protocolli standardizzati,
kit pronti all'uso, database condivisi

GlobalFiler



YFiler



Test sperimentali

→ Studio della letteratura esistente, messa
a punto e validazione di nuovi protocolli,
calcoli probabilità *ex novo*



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

Kit per specie domestiche e di interesse commerciale

Microsatellite assay for horse parentage testing and identification

Equine Genotypes™ Panel 1.1 is a reagent kit for horse parentage testing and identification using microsatellite (STR) DNA loci. The kit allows co-amplification of the microsatellites in a single multiplex PCR reaction.

The Equine Genotypes™ Panel 1.1 encompasses the following 17 loci: VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1 and CA425. These include the nine loci recommended by the Equine Genetics and Thoroughbred Parentage Testing Standardization Committee of the International Society for Animal Genetics (ISAG) and eight additional loci commonly used for horse parentage testing and identification.

Reagents and protocols of the Equine Genotypes™ Panel 1.1 kit have been optimized to deliver similar peak sizes (amplification yields) for each loci. The kit employs Phusion® Hot Start DNA Polymerase. Allele callings obtained with this kit represent the true alleles of an individual, instead of 'plus-A peaks' or 'split peaks' typically interpreted when using e.g. a conventional Taq DNA polymerase. This is due to the proofreading activity of the Phusion Hot Start Polymerase.

The Equine Genotypes™ Panel 1.1 allows co-amplification of the 17 microsatellites in a single multiplex PCR reaction. One primer from each primer pair is end-labeled with a fluorescent dye. After PCR, the fragments are separated and detected in a single electrophoresis injection, using an automated electrophoresis instrument (Figure 1).

The Equine Genotypes™ Panel 1.1 provides all the necessary reagents for amplification of the 17 microsatellite loci. In addition, the kit includes equine control DNA for verifying acceptable PCR and electrophoresis conditions.

Click pictures for a full-sized image

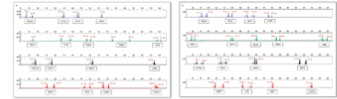


Figure 1. Representative results for the Equine Genotypes™ Panel 1.1 using control DNA and template DNA extracted from hair.

Bovine Genotypes™ Panel 1.2 (12 STR loci)

Bovine Genotypes™ Panel 1.2 encompasses all the 12 STR loci recommended by the International Society for Animal Genetics (ISAG) for routine use in bovine parentage testing and identification, including TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, BM1818, ETH3, ETH225 and BM1824. The primer sequences employed by the kit are identical to those recommended by the Cattle Molecular Markers and Parentage Testing standing committee of ISAG and they have been validated in extensive laboratory comparison tests.

The Bovine Genotypes™ Panel 1.2 allows co-amplification of the 12 microsatellites in a single multiplex PCR reaction. One primer from each primer pair is end-labeled with a fluorescent dye. After PCR, the fragments are separated and detected in a single electrophoresis injection, using an automated electrophoresis instrument (Figure 1).

The Bovine Genotypes™ Panel 1.2 provides all the necessary reagents for amplification of the 12 microsatellite loci. In addition, the kit includes bovine control DNA for verifying acceptable PCR and electrophoresis conditions.

Click pictures for a full-sized image

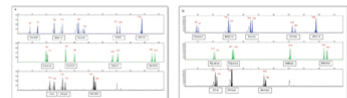


Figure 1. Representative results for the Bovine Genotypes™ Panel 1.2 using control DNA and template DNA extracted from hair.

RELATED PRODUCTS

- > Bovine Genotypes™ Panels 1.2, 2.2 and 3.1
- > Canine Genotypes™ Panel 1.1



Microsatellite assay for dog parentage testing and identification

Canine Genotypes™ Panel 1.1 is a reagent kit for dog parentage testing and identification using microsatellite (STR) DNA loci. The kit allows co-amplification of the microsatellites in a single multiplex PCR reaction.

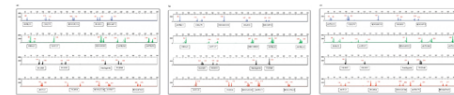
The Canine Genotypes™ Panel 1.1 kit encompasses the following 19 loci: AHTK211, COX279, REN169018, INU055, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169001, AHTH260, AHTK253, INU005, INU030, Amelogenin, FH2848, AHT121, FH2054, REN162C04, AHTH171 and REN247M23. These markers are included in the 'core panel' of loci recommended by the Applied Genetics Committee of Comparing Animals of the International Society for Animal Genetics (ISAG).

Reagents and protocols of the Canine Genotypes™ Panel 1.1 kit have been optimized to deliver similar peak sizes (amplification yields) for each loci. The kit employs Phusion Hot Start DNA Polymerase. Allele callings obtained with this kit represent the true alleles of an individual, instead of 'plus-A peaks' or 'split peaks' typically interpreted when using e.g. a conventional Taq DNA polymerase. This is due to the proofreading activity of the Phusion Hot Start Polymerase.

The Canine Genotypes™ Panel 1.1 kit allows co-amplification of the 19 markers in a single multiplex PCR reaction. One primer from each primer pair is end-labeled with a fluorescent dye. After PCR, the fragments are separated and detected in a single electrophoresis injection, using an automated electrophoresis instrument (Figure 1).

The Canine Genotypes™ Panel 1.1 kit provides all the necessary reagents for amplification of the 19 microsatellite loci. In addition, the kit includes canine control DNA originating from an ATCC cell line for verifying acceptable PCR and electrophoresis conditions.

Click pictures for a full-sized image



- > Bovine Genotypes™ Panels 1.2, 2.2 and 3.1
- > Equine Genotypes™ Panel 1.1



FORENSICS

- Forensics Home
- CANINE CODIS**
- Evidence
- Evidence Collection
- Evidence Submission
- Forms
- About Our Work
- Donate
- Contact Us



CANINE CODIS

Using a CODIS (Combined DNA Index System) to Fight Dog Fighting

The CANINE CODIS database is the first multi-agency forensic DNA database of dogs. To help stop dog fighting using tools of the 21st century, the Missouri Humane society, the ASPCA, the Louisiana SPCA, and the UC Davis Veterinary Genetics Laboratory have come together to establish the first ever database dedicated to combating the crime of dog fighting. This database is similar to the FBI's human CODIS database used in criminal and missing person investigations. The CANINE CODIS database contains individual DNA profiles from dogs that are seized during dog fighting investigations as well as profiles from unknown samples collected at suspected dog fighting venues. DNA will be used to identify relationships between dogs and thereby allow investigators to expand their investigations to those who breed and train dogs for fighting. (photo credit*)



Blood collected from dog fighting sites will be searched against the CANINE CODIS database to identify the source. This database provides the criminal justice system with a powerful tool for investigating and prosecuting these cases.

Upon seizure of the dogs, cheek swabs are collected and submitted to the laboratory for DNA testing. The DNA profile is then searched against the CANINE CODIS database. In the event that the query returns a "hit", the agency submitting the query sample and the agency that submitted the database sample are notified. This exchange of information will help prosecutors to expand and strengthen dog fighting investigations.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

SWGWILD Standards and Guidelines

(Version 2.0-Accepted by SWGWILD December 19, 2012)

1.0 Scope

This document provides minimum standards and additional guidelines for wildlife forensic analysts in the subdisciplines of DNA and morphology. This document covers good laboratory practices, evidence handling, and training which are central to all forensic laboratories. They also include critical considerations of phylogeny, taxonomy, and reference collections that are specific to wildlife forensic science.

2.0 Definitions

Note: These definitions apply to General, DNA and Morphology Standards and Guidelines. Definitions specific to DNA and Morphology are located in those respective sections.



SWGWILD

I processi di validazione sono
costosi e lunghi, ma necessari



per specie domestiche

APST –Proficiency test 2014 – molecular species identification



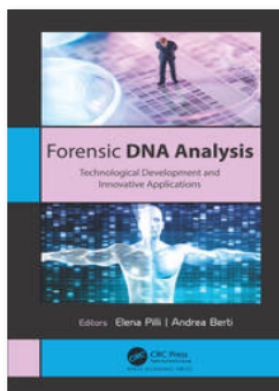
**Proficiency Test del Animal Plant and
Soil Traces (APST) working group -
European Network of Forensic Science
Institutes (ENFSI)**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Home > Bioscience > Forensic Science > Forensic DNA Analysis > Wildlife Forensics: DNA Analysis in Wildlife Forensic Investigations



Chapter

Wildlife Forensics: DNA Analysis in Wildlife Forensic Investigations

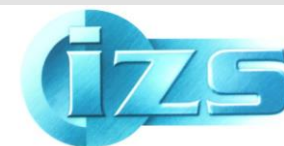
By Rita Lorenzini, Luisa Garofalo

Book [Forensic DNA Analysis](#)

Edition	1st Edition
First Published	2021
Imprint	Apple Academic Press
Pages	28
eBook ISBN	9781003043027



Share



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

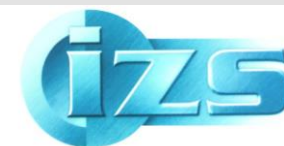


CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria



Importanza del sopralluogo, prelievo e conservazione campioni

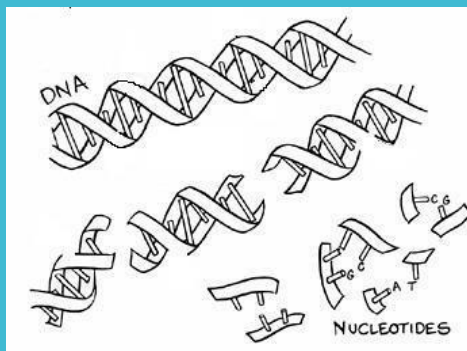
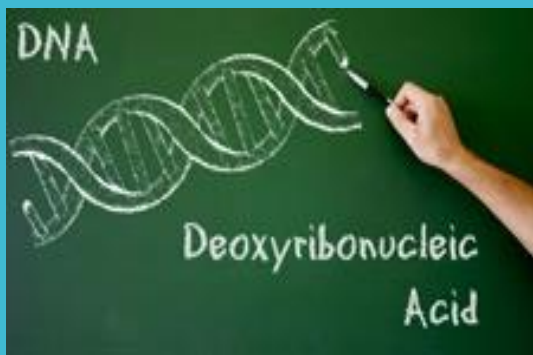


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria



Cause di degradazione del DNA: temperatura, umidità, esposizione al sole, tempo, sostanze chimiche, ecc.

Come nei laboratori di Forense Umana anche nel CeMedForVet Lab si seguono protocolli e flussi di lavoro per evitare la contaminazione

**(NON UMANA, MA CROSS-CAMPIONE)
e per maneggiare un DNA altamente degradato e presente in poche copie
(Low Copy Number DNA)**

FLUSSO DI LAVORO

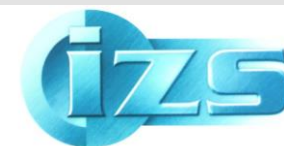
STANZA PULITA



STANZA ESTRAZIONE



STANZA PCR



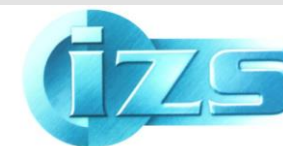
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



STANZA PULITA

NON VI ENTRA IL DNA

**Viene preparata lì la mix di
reazione PCR, senza
aggiungere il DNA**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

ESTRAZIONE DEL DNA

3 step: lisi, legame del DNA ed eluizione.

In genere vengono impiegati i seguenti principi:

1. SILICA-BASED KITS (es. QIAGEN)
2. ORGANIC METHODS (es. con fenolocloroformio)
3. MAGNETIC BEADS (es. Chelex)
4. STRUMENTI AUTOMATICI (es. Maxwell Automatic Extractor)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

TIPI DI CAMPIONI

Possono essere suddivisi in:

1. **HARD tissues** (meno DNA, ma meglio conservato. Es. ossa, denti, carapace, aculei, ecc.);
2. **SOFT tissues** (più DNA, ma si degrada più rapidamente. Es. muscoli, organi interni);
3. **THREATED tissues** (trattati con sostanze chimiche. Es. pellicce, souvenir, medicina tradizionale cinese);
4. **MIXED samples** (possono essere presenti più specie e/o più individui diversi nello stesso campione. Es. Alimenti)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

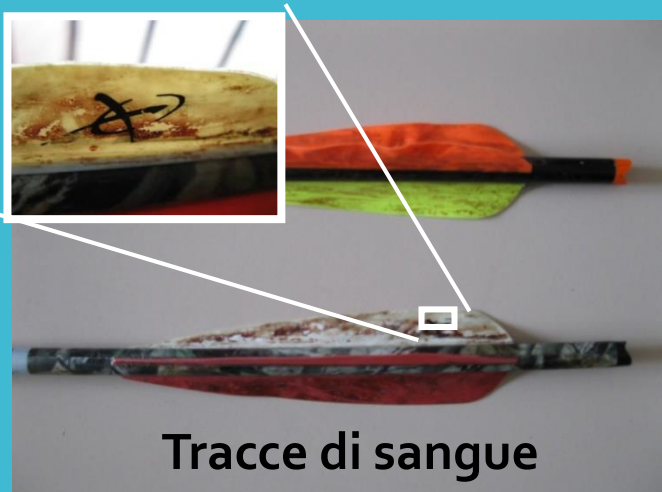


CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria



Tamponi di predazione



Tracce di sangue



Carne cotta

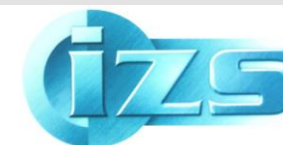


Peli

**Contenuti gastrici
e feci**



**Denti
ed ossa**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

QUANTIFICAZIONE DEL DNA

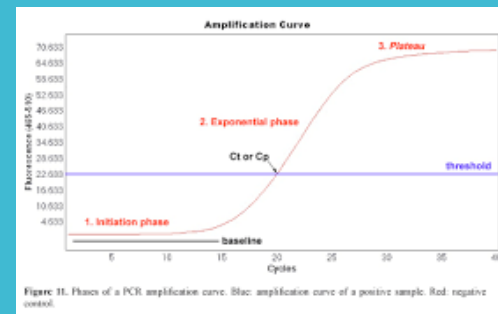
Viene in genere condotta con:

SPETTROFOTOMETRO - Misura concentrazione e purezza dell'acido nucleico tramite il valore di assorbanza e il rapporto 260/280.

FLUORIMETRO – Misura la concentrazione dell'acido nucleico tramite l'intensità della radiazione emessa per fluorescenza



RealTime PCR (o PCR quantitativa): permette di amplificare una determinata regione genomica monitorando in tempo reale ogni singola fase della reazione di amplificazione



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

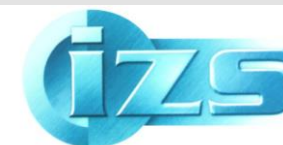
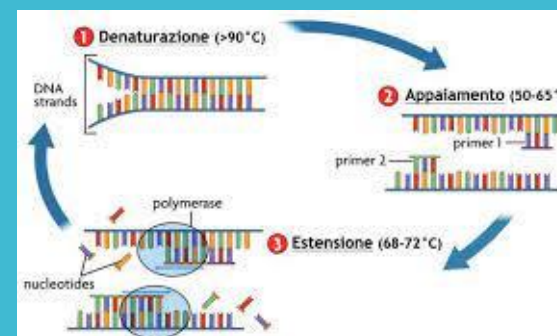
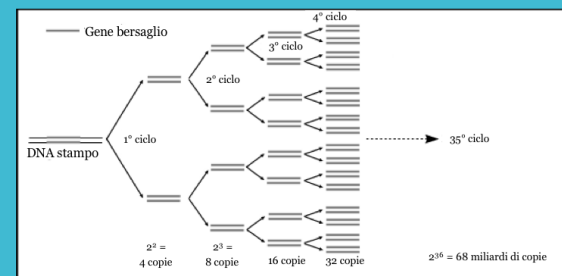


AMPLIFICAZIONE DEL DNA

La Polymerase Chain Reaction (PCR) consente di produrre un elevatissimo numero di copie di DNA a partire da poche molecole.

La reazione di PCR necessita di alcuni reagenti: buffer, sali, dNTP, Taq polimerasi, primer e (solo alla fine) DNA template.

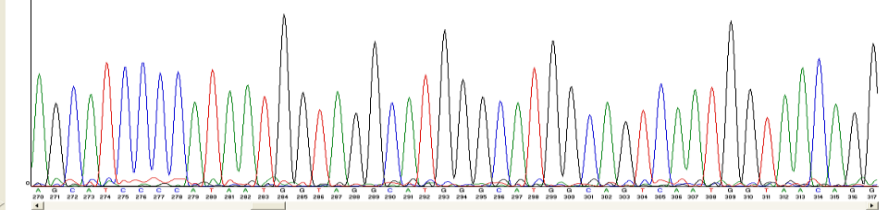
Programma di PCR end-point → n cicli di:



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

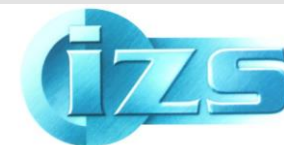


SEQUENZIAMENTO SANGER



Dopo la reazione di PCR, l'avvenuta amplificazione del DNA target va controllata con corsa elettroforetica su gel di agarosio. I prodotti della prima amplificazione vengono poi purificati e vengono effettuate una seconda reazione di PCR (reazione di sequenza) con gli stessi primer della prima amplificazione (ma a [] inferiore) + BigDye e una successiva purificazione.

Il purificato con FD viene caricato sul sequenziatore per la corsa elettroforetica su capillare. L'output viene visualizzato come sequenza grezza sul PC del sequenziatore (4 picchi di colori diversi a seconda della base azotata) e viene poi sottoposto a successive analisi dei dati.



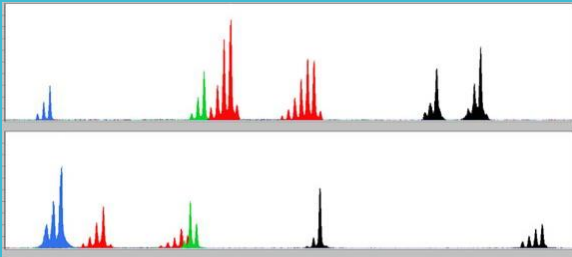
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

ANALISI DI FRAMMENTI (STR)



La reazione di PCR per amplificare i microsatelliti (STR) avviene grazie a coppie di primer (uno dei due nella coppia è marcato con fluorescenza, l'altro no) che vengono combinate in multiplex a seconda del peso molecolare e della compatibilità delle fluorescenze dei diversi loci.

Il prodotto di amplificazione viene diluito a seconda della concentrazione più idonea e caricato sul sequenziatore insieme alla FD e ad un marker di peso molecolare noto. Dopo la corsa elettroforetica su capillare l'output viene visualizzato come picchi (di colori diversi a seconda del locus) elaborati da software appositi (es. GeneMapper) sul PC del sequenziatore e viene poi sottoposto a successive analisi dei dati.

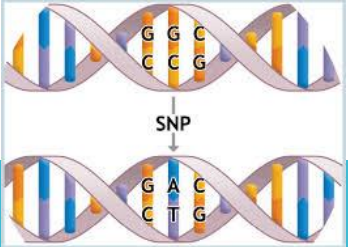


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



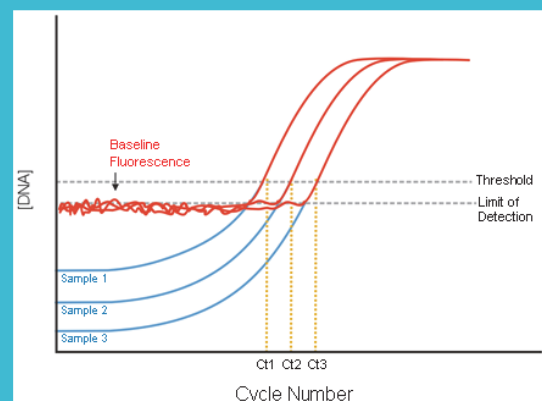
CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

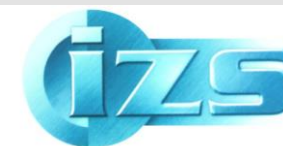
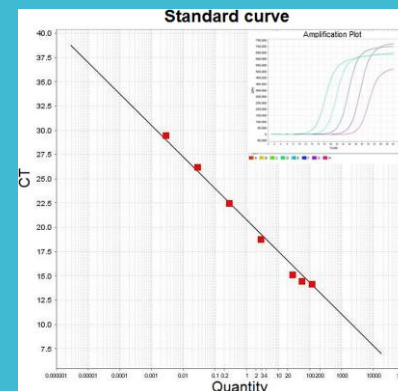
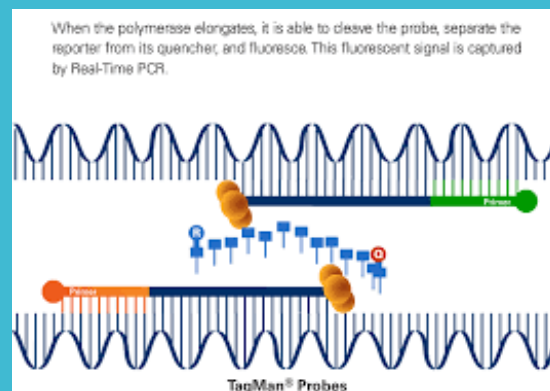


ANALISI DI SNP

Le mutazioni a singolo nucleotide (SNP) possono essere analizzate con diverse tecniche molecolari (es. MicroArray, beads). Nel laboratorio di Diagnostica Molecolare Forense del CeMedForVet vengono amplificate tramite corsa di PCR RealTime.



Possono essere effettuati saggi diversi:
es. TaqMan Probe,
TaqMan MGB, SYBR
Green, etc.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



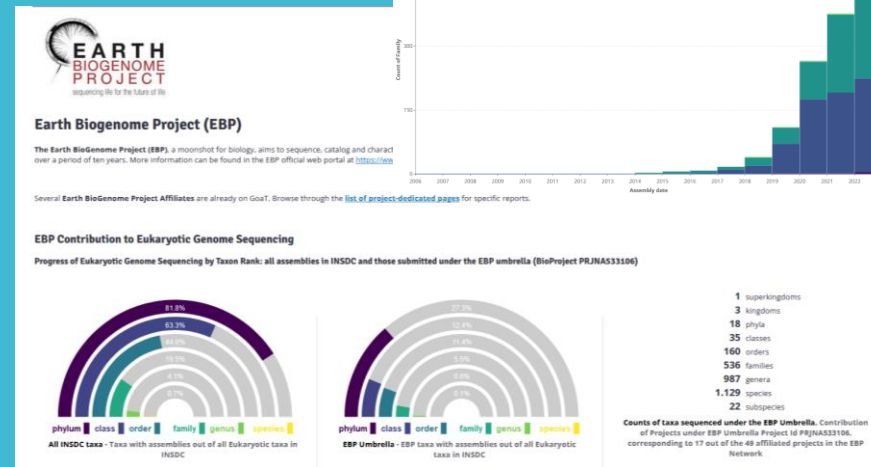
Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria



REFERENCE GENOMES

L'uso di routine degli SNP o dei microarray per la diagnostica forense animale necessita una conoscenza a priori del genoma della specie e della variabilità inter- e intra-specifica.

Sulla genomica della wildlife ci sono diversi progetti mondiali in corso...



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



QUESITI DIAGNOSTICI

Identificazione di specie

**Identificazione ibridi
inter- e intra-specifici**

Determinazione popolazione di origine

Identificazione individuale

DNA match

Identificazione del sesso

Test di paternità

Analisi di parentela



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

Marcatori diversi vengono utilizzati a seconda dello scopo:

a) Marcatori uniparentali

- DNA mitocondriale (sequenze e SNP)
- Cromosomi sessuali

b) Marcatori biparentali

- Sequenze di geni nucleari
- STR (Short Tandem Repeats)
- SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)

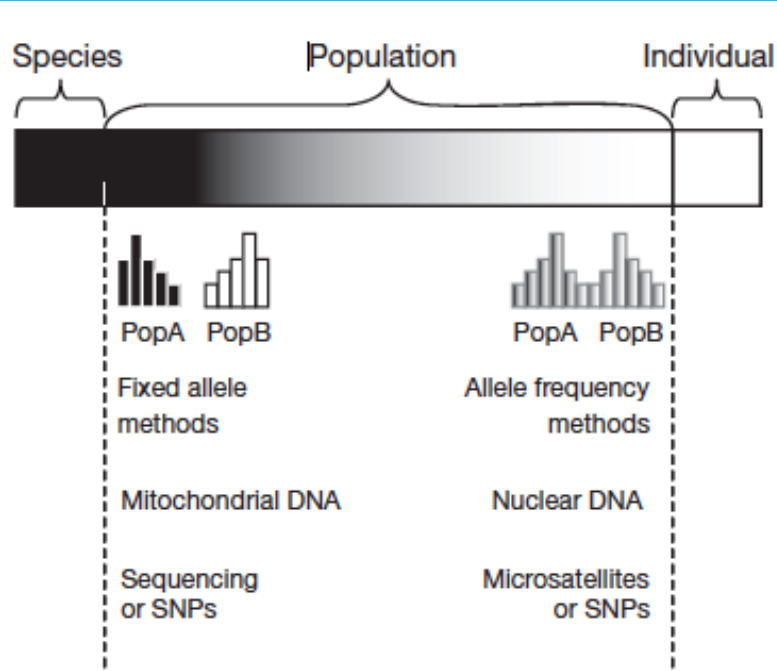


Fig. 1. The level of genetic diversity between populations exhibits continuous variation, from subspecies (dark end) to extended families (light end). The degree of population (Pop) divergence dictates the selection of genetic markers and subsequent analytical methods used to assign a sample to its geographic origin. SNPs: single nucleotide polymorphisms



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



CeMedForVet

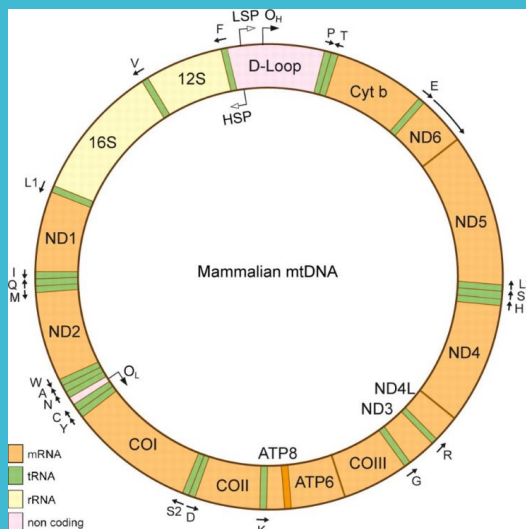
Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

VARIABILITA' GENETICA

a) variabilità di sequenza

.....GAAT**C**AAGG**A**TC.....

.....GAAT**G**AAGG**T**TC.....

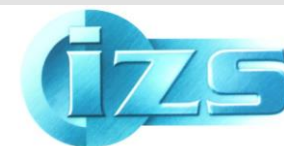


DNA MITOCONDRIALE

VANTAGGIO PER LA FORENSE:

Nel citoplasma di una cellula ci sono da centinaia a migliaia di mitocondri, e ognuno di essi contiene da 1 a 10 molecole di mtDNA.

Eredità uniparentale (materna):
tutto il genoma mitocondriale si comporta come un singolo locus non-ricombinante



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



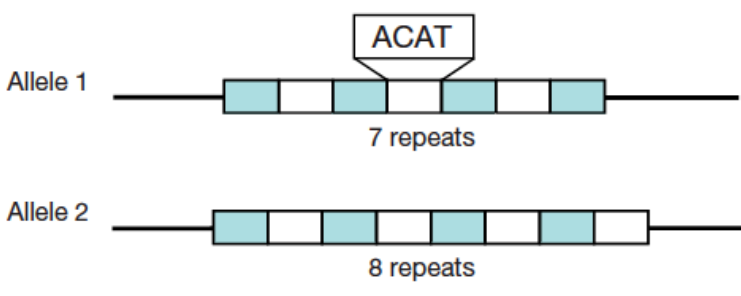
Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

b) variabilità di lunghezza

...**(CA)₂** (CA)₂(CA)₂(CA)₂...
..... (CA)₂(CA)₂(CA)₂.....

STR (Short Tandem Repeats) nucleari

- Corte sequenze di 2-6 basi
- Biparentali
- Specie-specifici
- Eredità mendeliana semplice
- Non codificanti
- Tasso di mutazione ~ 10⁻³



locus	A	B
CXX20	130-132	130-130
MU05	133-137	133-133
G10X	130-130	130-136
G10B	155-155	137-155
G1D	170-184	184-184
MU59	223-223	229-229
G10C	96-96	104-104
MU50	129-133	133-133
G10P	161-173	173-173
G10H	246-246	246-246
G10L	157-163	163-163



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

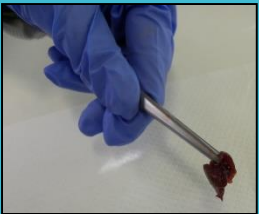


CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

1. Confronto tra una sequenza incognita con quelle già registrate in database pubblici online, ad es. il network NCBI/EMBL/DDBJ (www.insdc.org);
2. Confronto (attraverso allineamenti e ricostruzioni filogenetiche) con sequenze ottenute da campioni di riferimento raccolti e conservati presso il Laboratorio di Genetica del CeMedForVet).



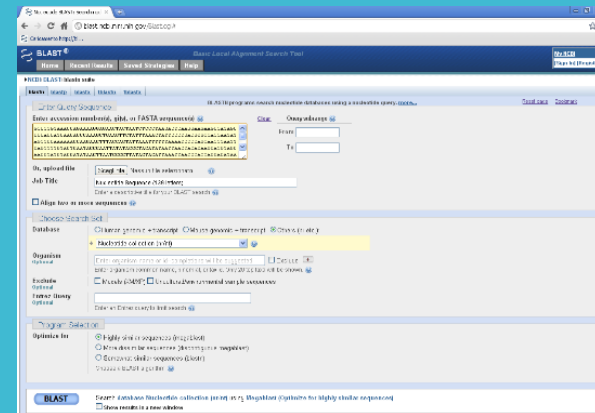
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

Per le specie che sono ben rappresentate nei database (es. cane, gatto, specie allevate o modello) si ottiene anche il 100% di identità tra la sequenza incognita e la reference species. Per le altre meno studiate e a causa della variabilità all'interno delle specie si ottengono in genere percentuali inferiori (ad es. 98.5%).

Specie molto vicine filogeneticamente possono mostrare similarità di sequenza tra il 90 e il 95%, o maggiori. Ad influire sul grado di confidenza del match è anche la lunghezza della sequenza da confrontare.

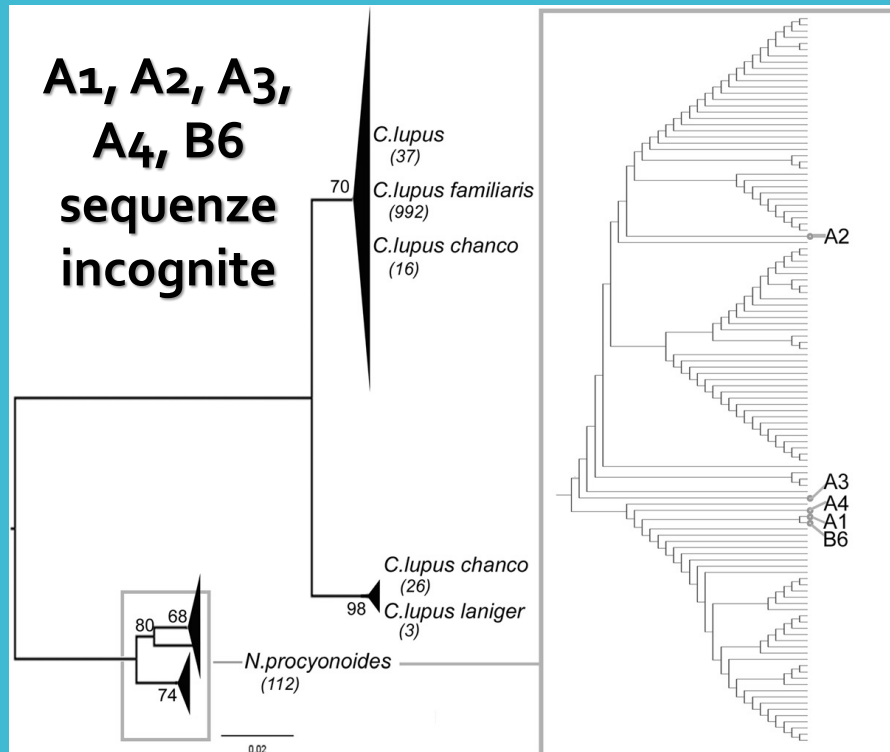


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

COSTRUZIONE DI UN ALBERO FILOGENETICO



La posizione del campione incognito nell'albero permette l'identificazione della reference species più vicina filogeneticamente. Diversi metodi: Neighbor-Joining, Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Bayesian, ecc.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

MARCATORI MOLECOLARI

Per l'identificazione di specie è necessario scegliere marcatori molecolari in cui siano:

- massime le differenze genetiche fissate TRA SPECIE (elevata variabilità inter-specifica)
- minima la diversità all'INTERNO DELLE SPECIE (bassa variabilità intra-specifica)



Regioni CONSERVATE



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



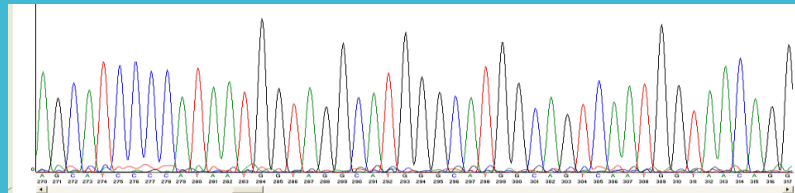
Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

BRACCONAGGIO

Vari oggetti
appartenenti ad un
cacciatore sequestrati
dal Corpo Forestale
dello Stato



ANALISI del DNA
sequenziamento di
frammenti nei geni
Cytb e 12S



Istrix
(*Hystrix cristata*)
PROTETTO



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria



TRACCE DI SANGUE



Muflone
(*Ovis aries musimon*)

PROTETTO



LACCI & BRACCONAGGIO



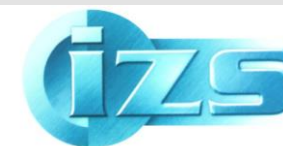
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

COMMERCIO ILLEGALE DI SPECIE PROTETTE ESOTICHE



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria



June 2022
VOLUME 46 - N. 1

[READ ARTICLE ONLINE](#)
[DOWNLOAD PDF](#)

DOI:
<https://doi.org/10.30456/AVO.2022102>

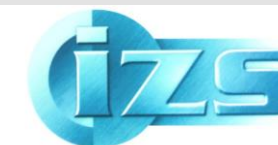
Short Communication – European Roller thief nailed by DNA found in a bird carrier

Luisa Garofalo, Rita Fanelli, Annalisa Brucoli, Sebastian Cannarella, Rita Lorenzini

[READ ARTICLE](#) [DOWNLOAD](#)

ABSTRACT:

In 2018 a bird poacher, who used to remove chicks illegally from their wild nests in Central Italy, was the focus of a complex investigation by law-enforcement. Several clues were found suggesting his illegal activity against wildlife, and some items were seized by the authorities from his home, including a carrier probably used to restrain birds. The bird carrier was delivered to the Forensic Genetics Laboratory (Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana “M. Aleandri”) where evidence of the offence was looked for through molecular tools. To identify the species of origin for the poached birds, portions of two mitochondrial markers (Cytochrome b and Cytochrome Oxidase I) were amplified and sequenced using the DNA isolated from biological traces that were found inside the carrier. Sequences from the evidence samples were compared for homology with those lodged in online genetic repositories. The results revealed that at least one individual of European roller *Coracias garrulus*, a protected bird species listed as vulnerable in the Italian Red List, had been restrained in that pet carrier. Species identification was further confirmed through comparison with sequences from an in-house *C. garrulus* sample. Eventually, the suspect and seven more people were formally charged with poaching of protected species, and a long list of further crimes.



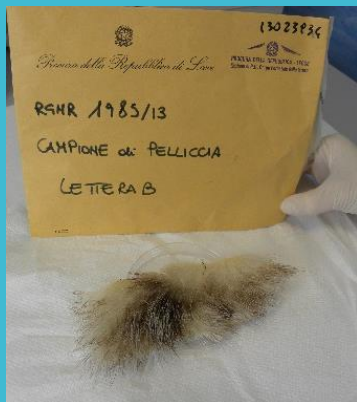
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

COMMERCIO ILLEGALE DI SPECIE PROTETTE DOMESTICHE (CANE E GATTO)

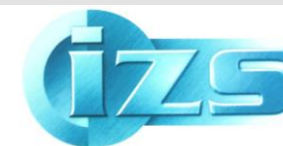
**Il Ministero della Salute ha incaricato
il CeMedForVet di mettere a punto un
protocollo per l'identificazione di
pellicce illegali (Progetto di Ricerca
Corrente RC)**



Decreto Legislativo 15 marzo 2010, n. 47

"Disciplina sanzionatoria per la violazione delle disposizioni di cui al regolamento (CE) n. 1523/2007, che vieta la commercializzazione, l'importazione nella Comunità e l'esportazione fuori della Comunità di pellicce di cane e di gatto e di prodotti che le contengono"

pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* del 31 marzo 2010, n. 75

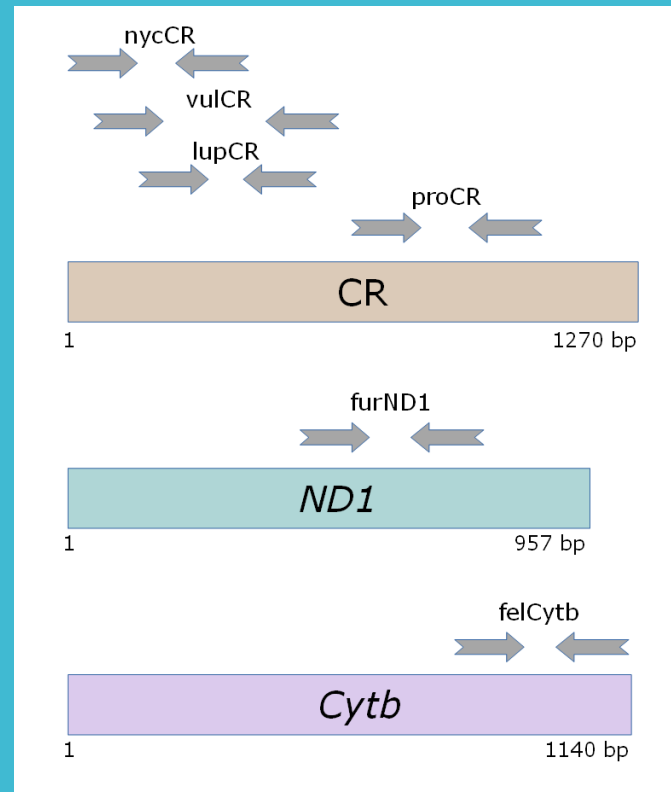


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

- ✓ DISEGNO DI NUOVE COPPIE DI PRIMER
- ✓ TEST DI VALIDAZIONE SU CAMPIONI DI RIFERIMENTO (specificità, sensibilità, replicabilità, riproducibilità, test con DNA misto target + uomo).
- ✓ ANALISI dei CASEWORK



Seguite le linee guida dell'ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) e del SWGWILD (Scientific Working Group for Wildlife Forensic Sciences)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

PeerJ

Hindering the illegal trade in dog and cat furs through a DNA-based protocol for species identification

Luisa Garofalo¹, Alessia Mariacher², Rita Fanelli¹, Rosario Fico² and Rita Lorenzini¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana "M. Aleandri", Centro di Referenza Nazionale per la Medicina Forense Veterinaria, Rieti, Italy

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana "M. Aleandri", Centro di Referenza Nazionale per la Medicina Forense Veterinaria, Grosseto, Italy

ABSTRACT

In Western countries dogs and cats are the most popular pets, and people are increasingly opposed to their rearing for the fur industry. In 2007, a Regulation of the European Union (EU) banned the use and trade of dog and cat furs, but an official analytical protocol to identify them as source species was not provided, and violations of law are still frequent in all Member States. In this paper we report on the development and validation of a simple and affordable DNA method for species detection in furs to use as an effective tool to combat illegal trade in fur products. A set of mitochondrial primers was designed for amplification of partial cytochrome b, control region and ND1 gene in highly degraded samples, like furs and pelts. Our amplification workflow involved the use of a non-specific primer pair to perform a first test to identify the species through sequencing, then the application of species-specific primer pairs to use in singleplex end-point PCRs as confirmation



**IDENTIFICATE 6
PELLICCE ILLEGALI**



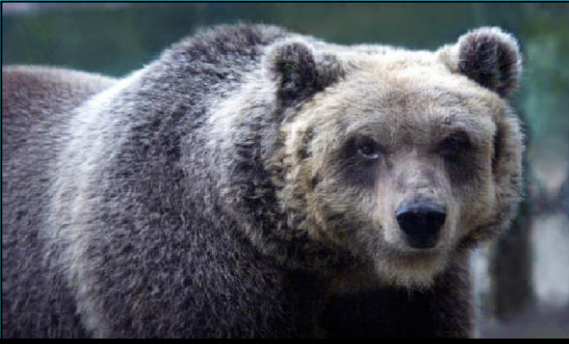
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

DATABASE STR SPECIE SELVATICHE



Ursus arctos



Capreolus capreolus



Gyps fulvus



***Rupicapra
pyrenaica***



Cervus elaphus



Procyon lotor



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

RILEVAZIONE DI IBRIDI INTRASPECIFICI



Ovis aries
(loci STR)



Sus scrofa (loci
STR + SNP)



Canis lupus
(loci STR + Y-STR)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



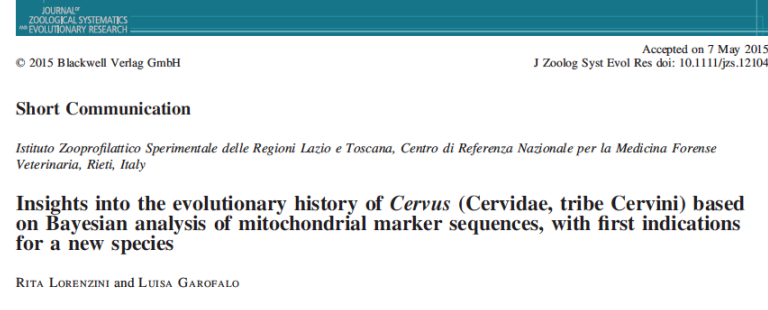
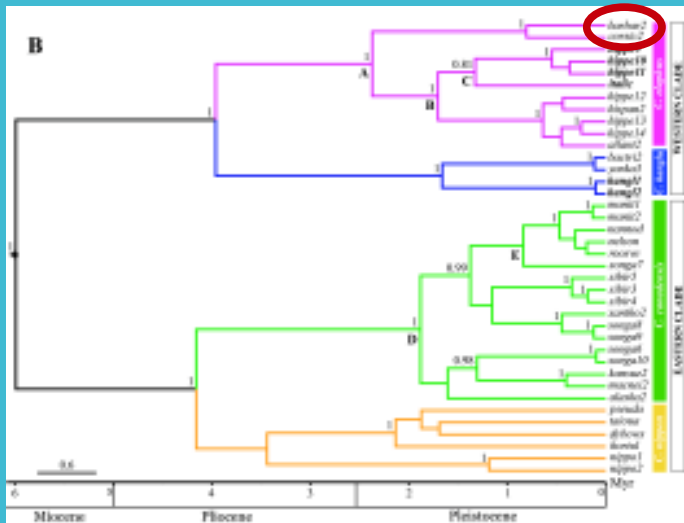
Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

IDENTIFICAZIONE DELLA POPOLAZIONE DI ORIGINE

4 pezzi di carne
sequestrati in casa di un
sospetto bracconiere



ANALISI del DNA sequenziamento del
gene Cytb (primer noti e nuovi) + analisi
filogenetica dell'intero D-loop



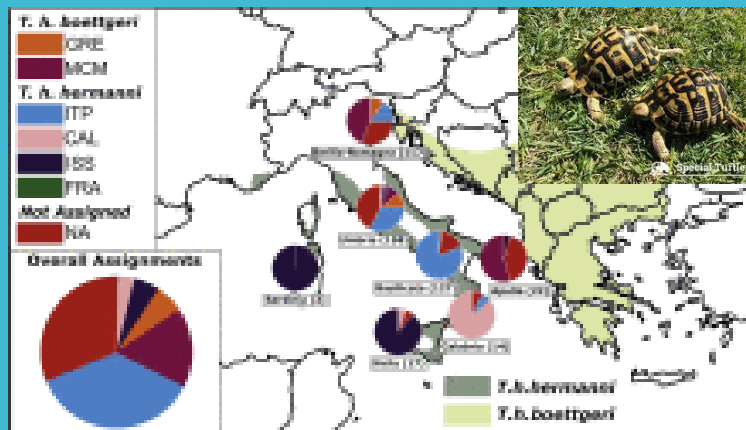
CERVO SARDO
(*Cervus elaphus*
***corsicanus*)**
PROTETTO



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



IDENTIFICAZIONE DELLA POPOLAZIONE DI ORIGINE



An Application of Manel's Model: Detecting Bobcat Poaching in Michigan
 Millions, Devin G.; Swanson, Bradley J.
Wildlife Society Bulletin; 2006; 34, 1; Biological Science Database
 pg. 150

Peer Reviewed

An Application of Manel's Model: Detecting Bobcat Poaching in Michigan

DEVIN G. MILLIONS, *Applied Technologies in Conservation Genetics Laboratory, Central Michigan University, Mt. Pleasant, MI 48859, USA*

BRADLEY J. SWANSON,¹ *Applied Technologies in Conservation Genetics Laboratory, Central Michigan University, Mt. Pleasant, MI 48859, USA*



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biological Conservation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocon



Dragons in our midst: Phyloforensics of illegally traded Southeast Asian monitor lizards

Luke J. Welton^{a,1}, Cameron D. Siler^{b,*,1}, Charles W. Linkem^c, Arvin C. Diesmos^d, Mae L. Diesmos^e, Emerson Sy^d, Rafe M. Brown^{f,1}



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
 del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Centro di Riferenza Nazionale
 per la Medicina Forense Veterinaria

IDENTIFICAZIONE INDIVIDUALE

Per l'identificazione individuale è necessario scegliere marcatori molecolari:



Come in Umana, anche nella Forense Animale il profilo multilocus è diverso per ciascun individuo

- SPECIE-SPECIFICI (si amplificano solo per quella specie)
- Con elevata diversità all'INTERNO DELLA SPECIE (alta variabilità intra-specifica)



Regioni RIPETUTE
STR o microsatelliti



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria



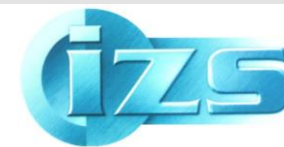
Lorenzini et al. (2011)

IDENTIFICAZIONE SOTTOSPECIFICA ED INDIVIDUALE

Identificata una carcassa di muflone (*Ovis aries musimon*) tramite sequenziamento + loci STR + test di assegnazione bayesiana

DNA MATCH

Match del genotipo individuale con quello ottenuto da tracce di sangue ritrovate a casa del sospettato.
Random Match Probability calcolata in $1,8 \times 10^{-4}$, che equivale a 1 in 5600 (\approx 3000 mufloni in Sardegna)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

**Coriano (Rimini),
4 novembre 2017**

CRONACA

Coriano, lupo appeso alla fermata del bus. Due denunciati / FOTO

Le sevizie: aveva la testa fracassata e buchi sul corpo come se l'avessero colpito col forcone



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

Last Stop for the Wolf Killers: Forensic Analysis Puzzles Out a Fierce Crime Against Wildlife

Garofalo Luisa*, Fanelli Rita*, Mariacher Alessia, Ciarrocca Erika**, Fico Rosario**, Lorenzini Rita***

^{**} Centro di Riferenza Nazionale per la Medicina Forense Veterinaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana "M. Aleandri", Grosseto, Italy.



Figure 1. The wolf hung at the bus stop, recovered by Carabinieri. Photo by: "Il Resto del Carlino".

DNA EXTRACTION, AMPLIFICATION AND ANALYSIS

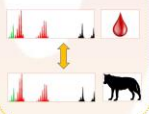
All the evidence samples were submitted to DNA extraction using the DNA IQ™ Casework Sample Kit and the Maxwell 16 LEV System (Promega). Afterwards, DNA from the wolf muscle was extracted and analyzed separately with the QiAmp Tissue Mini kit (QIAGEN). Negative controls were included in each session of DNA extraction. DNA from the evidence was amplified and sequenced at mitochondrial loci (12S, Cytb, D-loop) for species identification according to the procedures in [1]. Five multiplexes of twenty nuclear Short Tandem Repeats (STRs) loci specific to *C. lupus* were amplified with the Multiplex PCR Kit (QIAGEN) for individual identification, according to the procedures in [2]. Negative controls were added to each PCR session to check for contamination. PCR products were loaded onto an ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sizing of the STR fragments was performed using the GeneMapper Software Version 5.0. Statistical support for the DNA match probability (see Results) was calculated using an in-house database built on hundreds canine genotypes from Italian unrelated dogs and wolves [2].

3. The analysis of samples



Figure 3. Hairs and blood traces on the seized items. In our laboratory, samples were opened and the DNA was extracted, amplified and analyzed with the genetic markers chosen. A. hairs; B. pitchfork; C. suit; D. trousers.

4. The DNA match



THE CASE

The recent trend towards an increase in the number of wolves (*Canis lupus*) in Italy has led to a resumption of conflicts with human activities and to possible retaliatory killings. A carcass of a male wolf that was poisoned, tortured, killed and hung on a bus shelter was found in an early morning of November 2017 near a small Italian town (Fig. 1). Law enforcement authorities acquired the images of a surveillance camera that had captured a van circulating during that night close to the hanging wolf carcass. The van, owned by two workers of a farm, was confiscated and inspected finding biological evidence (blood traces, hairs; Fig. 2). Blood traces were also found on a pitfork, trousers and a suit (Fig. 3). All samples were subjected to forensic analysis to assess the source species.



Figure 2. Inspection by the Carabinieri authority in the farm of the suspects, where several additional offenses (i.e. illegal slaughter of animals, animal abuse, abandonment of waste, illegal detention of dangerous animals) were ascertained. A. the van seized; B. a blood trace on the running board of the van. Photo by: "Il Resto del Carlino".

SPECIES AND INDIVIDUAL IDENTIFICATION

Comparison between the sequences obtained from the hairs (Fig. 3A) and the reference sequences from our Genetic Laboratory and from the GenBank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) returned the species *Ovis aries* (sheep).

Among the remaining samples collected during the inspection, only a blood trace found on the running board of the van (Fig. 2B) yielded enough DNA for both species and individual identification. The blood was identified as belonging to *C. lupus*.

A complete STR-based genotype was obtained from the blood trace sample (Fig. 2B) and then compared with that from the wolf carcass to find for DNA match. The results showed that the blood trace and the carcass bore the same STR multilocus profile. An estimate of the overall probability of identity was calculated to obtain statistical support for the DNA match.

5. The epilogue

The results indicated that the estimated probability of any two highly inbred individuals sharing the same multilocus genotype by chance alone was approximately 1 in 700,000. Given that the wolf population in Italy is estimated in less than 2,000 individuals [3], we concluded that the blood trace on the van belonged to the wolf killed and hung at the bus stop. The trial for violation of article 544bis of the Italian Penal Code is currently pending, and is having a wide echo by media.

ANIMALI

Lupo ucciso e appeso a una pensilina: in tre condannati a un anno e sei mesi

ANIMALI

Giovedì 21 Novembre 2019 di Remo Sabatini



mesi di reclusione, 9 mesi e un anno con la sospensione della pena.

Tutti condannati gli uccisori del lupo di Coriano. Lo ha deciso il tribunale di [Rimini](#). Così, dopo poco più di due anni dal fatto e a seguito della richiesta di patteggiamento, il titolare 83enne di una azienda agricola, suo figlio (43) e un dipendente di 38 anni, sono stati condannati rispettivamente a un anno e sei

ESCHE E BOCCONI AVVELENATI

Contenuto gastrico



esche o carne
confiscata



oppure



DNA MATCH
(o confronto
individuale)

risultati espressi in
termini probabilistici



Utile anche per
rintracciare più esche di
uno stesso avvelenatore
seriale che ha sparso vari
bocconi in una data area



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

ANALISI DI PARENTELA



Legge 201/2010

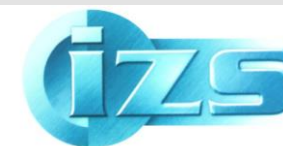
Tratta dei cuccioli



Cuccioli abbandonati e/o uccisi + Possibile madre/padre posseduto da un individuo sospettato

ANALISI DI PARENTELA

Reato:
Crudeltà animale,
uccisione o
abbandono di
cuccioli.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

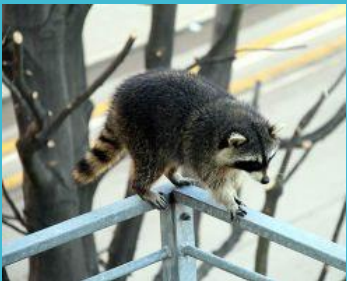
Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria



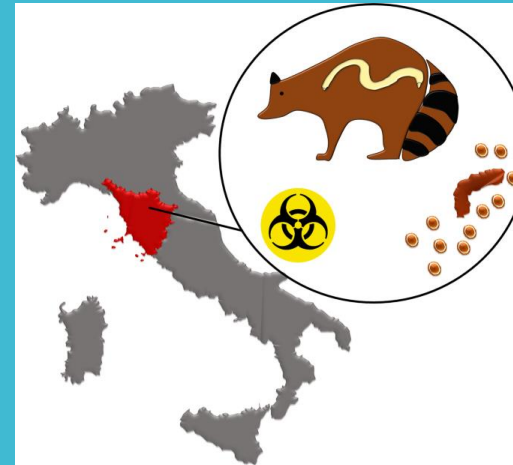
INTRODUZIONE DI SPECIE ALIENA

Per risolvere un caso di rilascio illegale di procioni nel
Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi (Toscana),
abbiamo messo a punto pannelli STR per questa specie.

Articolo in progress, Progetto RC in corso...



ANALISI DI
PARENTELA



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Riferenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria



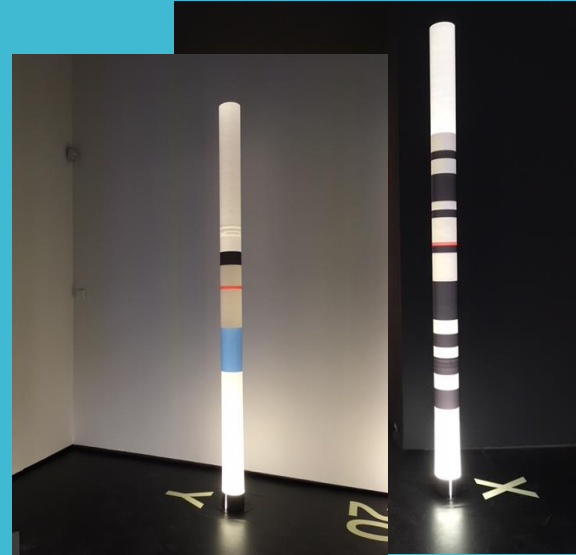
IDENTIFICAZIONE DEL SESSO

Avocetta 40: 17-22 (2016)

Comparison between two molecular protocols for sex determination in birds, with implications for the management and conservation of the Eurasian Griffon vulture *Gyps fulvus*

LUISA GAROFALO^{1*}, RITA FANELLI¹, GIANCARLO OPRAMOLLA², MIRIAM POLIDORI¹,
FRANCESCO TANCREDI¹, TIZIANA ALTEA², MARIO POSILICO^{2#}, RITA LORENZINI^{1#}

I mammiferi possiedono i cromosomi X e Y; il maschio è il sesso eterogametico. Gli uccelli possiedono i cromosomi Z e W; la femmina è il sesso eterogametico



TECNICHE MOLECOLARI IMPIEGATE NEL LAB:

- PCR end-point + gel di agarosio
- Analisi STR di loci sull'Y (lupi)
 - PCR RealTime (next)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

CAMPIONI CON DNA MISTO



Tre coltelli ed una pistola
a proiettile captivo
sequestrati in un
impianto di macellazione
autorizzato ad uccidere
solo ovini e caprini



APPROCCIO COMBINATO:
sequenziamento di
marcatori mtDNA + STR
specie-specifici



**ACCERTATA L'UCCISIONE
ILLEGALE DI TRE SPECIE**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

Identificazione di specie negli alimenti

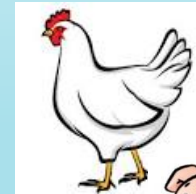
N=22 campioni di alimenti sequestrati ad un produttore sono stati inviati al CeMedForVet dai NAS, per confermare la presenza delle specie dichiarate in etichetta. L'assegnazione molecolare ha portato a rilevare la presenza inattesa di carne di pollo e di suino in alcuni alimenti quali:

-Ragù di cinghiale

-Ragù di lepre

-Salame di cervo

-Polpa di anatra e polpa di fagiano

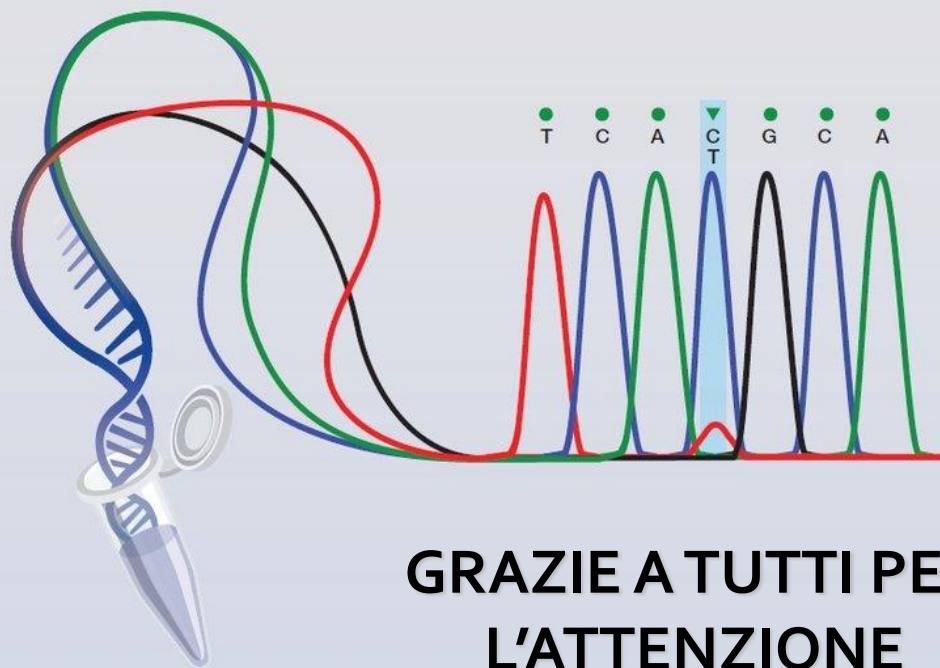


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

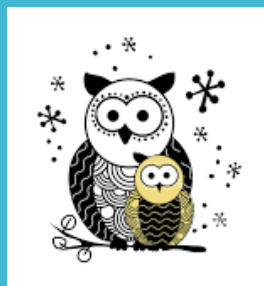


CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria



**GRAZIE A TUTTI PER
L'ATTENZIONE**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria