



Ricerca e diagnostica: sviluppo di nuovi metodi e marcatori per specie non modello

Luisa Garofalo

Laboratorio di Genetica Forense - Sezione di Rieti

Gli incontri del martedì: la conoscenza in 30 minuti Secondo ciclo









Test di routine → Protocolli standardizzati, POS, kit pronti all'uso



Test sperimentali → Studio della letteratura esistente, messa a punto e validazione di nuovi protocolli

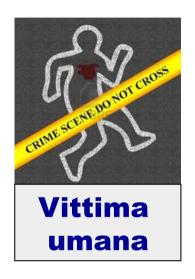






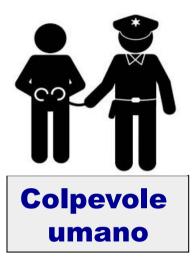


GENETICA FORENSE



UMANA

- ⇒ Una sola specie
- ⇒ Protocolli standardizzati





ANIMALE

- **⇒ Più specie**
- ⇒ Protocolli da standardizzare



umano







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











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.



I processi di validazione sono costosi e lunghi, ma necessari







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







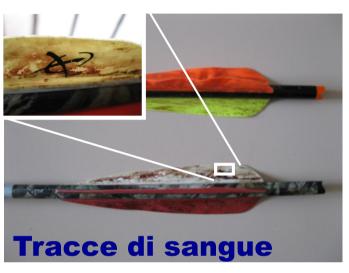


Centro di Referenza Nazionale per la Medicina Forense Veterinaria

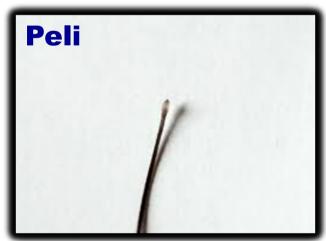
TIPI DI CAMPIONI



Tamponi di predazione



















QUESITI DIAGNOSTICI

Identificazione di specie
Identificazione ibridi
inter- e intra-specifici
Determinazione popolazione di origine

DNA match
Identificazione del sesso
Test di paternità
Analisi di parentela





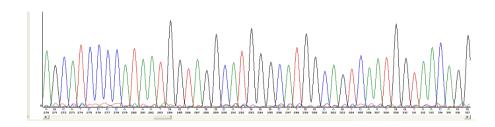


VARIABILITA' GENETICA

a) variabilità di sequenza

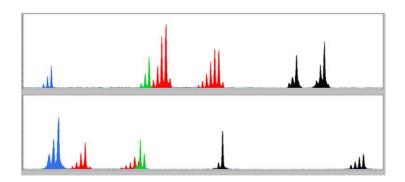
....GAATCAAGGATC....

.....GAATGAAGGTTC....



b) variabilità di lunghezza

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









Marcatori diversi vengono utilizzati a seconda dello scopo:

a) Marcatori uniparentali

- DNA mitocondriale (sequenze e SNP)
- Cromosomi sessuali (l'Y per i mammiferi, ad es. gli STR del lupo)

b) Marcatori biparentali

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

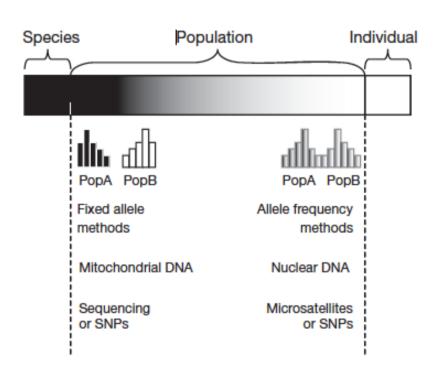


Fig. 1. The level of genetic diversity between populations exhibits continuous variation, from subspecies (dark end) to extended families (light end). The degree of population (Pop) divergence dictates the selection of genetic markers and subsequent analytical methods used to assign a sample to its geographic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





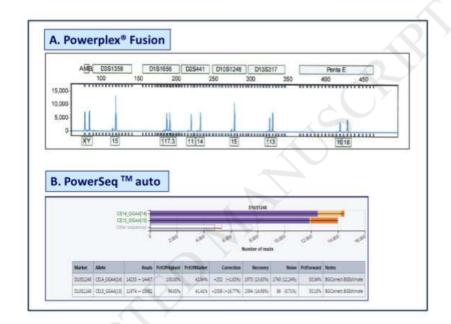
MARCATORI DEL FUTURO



FSI GENETICS					
Articles & Issues Y For Author	rs v Journal Information v ISFG	More Periodicals 🕶			
	All Content	Search Advanced Search			
Access provided by BIBLIOSA	N-Experimental Institute of Animal Hea	lth of Umbria			
< Previous Article	Articles in Press	Next Article >			
Article in Press					
From next generation sequencing to now generation sequencing in forensics					
Peter de Knijff [™] Department of Human Genetics Netherlands	, Leiden University Medical Center, Ein	thovenweg 20, 2333 ZC Leiden, the			
DOI: https://doi.org/10.1016/j.fsi	gen.2018.10.017	. f 💆 🖾 🛨			
Article Info					

Figure 2. Graphical outputs of CE detection of STRs and the FDSTools summary of MPS of STRs.

Shown are partial graphical outputs (of two different DNA samples) reflecting the results of CE-based STR genotyping (panel A) and MPS-based STR genotyping (panel B) as produced with FDSTools. As shown in panel A, the electropherogram visualizes the genetic variation as peaks with their heights measured in rfu's (relative fluorescent units), and the alleles designated in terms of number of repeats below each allele. In the case of MPS, for each allele the number of reads with a specific genetic variation is shown as a bar and further specified in a table. For more information see reference 23.



Capillary Electrophoresis (CE) vs Massively Parallel Sequencing (MPS)







MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES

Molecular Ecology Resources (2011) 11 (Suppl. 1), 109-116

doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02954.x

SNP DISCOVERY: NEXT GENERATION SEQUENCING
Unlocking the potential of genomic technologies for wildlife forensics

ROB OGDEN

TRACE Wildlife Forensics Network, Royal Zoological Society of Scotland, Edinburgh EH12 6TS, UK

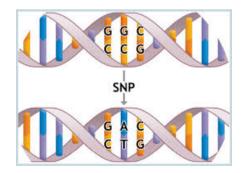
Abstract

Wildlife crime enforcement is increasingly relying on genetic techniques to deliver forensic evidence to investigators. Forensic DNA applications require robust molecular markers, informative at the level of the species, population and individual, in a wide range of taxa. Within species, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have long been recognized as offering many potential advantages over traditional microsatellite markers; however, the best methods for their discovery, validation and genotyping in non-model species remain an area of novel research and much discussion. The potential availability to wildlife geneticists of deep sequencing platforms and high-density genotyping arrays appears to promise an almost infinite source of variable markers for determining the geographic or individual origin of a sample. This study examines the drivers for developing SNP genotyping panels in wildlife forensics and their potential as applied tools, before examining a range of strategies that are being employed to try to unlock this potential and address current questions in wildlife conservation and enforcement.

Keywords: conservation genomics, forensic genetics, non-model, SNP discovery, wildlife crime, wildlife DNA forensics

"High-throughput sequencing of non-model species is likely to dominate SNPs discovery in the future. However, at present, the resources required to apply such technologies to non-model species research remain significant, and more costeffective alternatives are always being sought."

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









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 a Rieti).















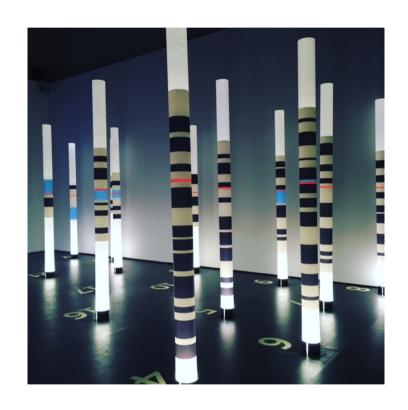
Per le specie che sono ben rappresentate nei database (es. cane, gatto, specie allevate o modello) si ottiene anche il 100% di identità tra la sequenza incognita e la reference species. Per le altre meno studiate e a causa della variabilità all'interno delle specie si ottengono in genere percentuali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







Scelta (e/o disegno) di 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)





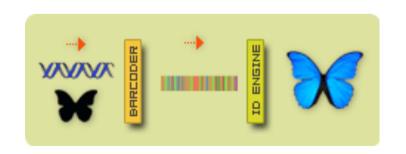




BARCODING OF LIFE

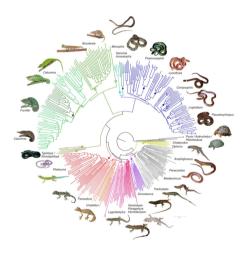
Nel DNA barcoding generalmente vengono utilizzate due regioni di ~ 600 bp nei geni Citocromo b (CytB) e Citocromo ossidasi I (COI).

Per i mammiferi la COI spesso non è adatta all'identificazione di specie, nonchè frammenti così grandi non si amplificano facilmente in presenza di campioni con DNA degradato.









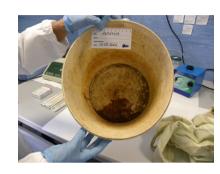






BRACCONAGGIO

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



















Istrice (*Hystrix cristata*) PROTETTO







COMMERCIO ILLEGALE DI SPECIE PROTETTE



















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 LT 1311)

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







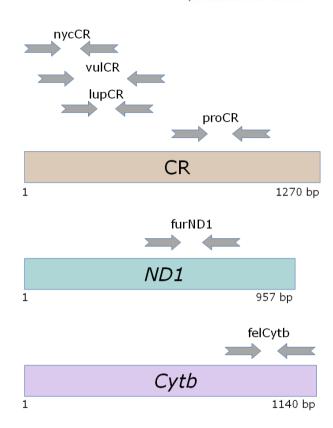






✓ DISEGNO DI NUOVE COPPIE DI PRIMER

- ✓ 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)



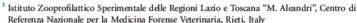






Hindering the illegal trade in dog and cat furs through a DNA-based protocol for species identification

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



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





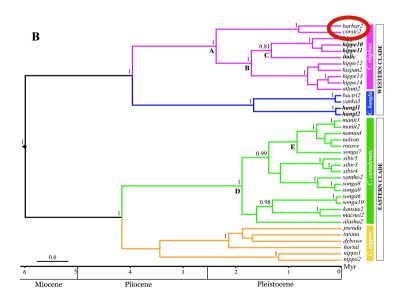




IDENTIFICAZIONE DELLA POPOLAZIONE DI ORIGINE

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

| 2015 Blackwell Verlag GmbH | J Zoolog Syst Evol Res doi: 10.1111/ps.12104

Short Communication

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

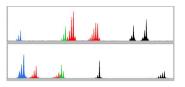
Insights into the evolutionary history of *Cervus* (Cervidae, tribe Cervini) based on Bayesian analysis of mitochondrial marker sequences, with first indications for a new species

RITA LORENZINI and LUISA GAROFALO



CERVO SARDO (Cervus elaphus corsicanus) PROTETTO





DATABASE STR IN-HOUSE per DIVERSE SPECIE SELVATICHE



Centro di Referenza Nazionale per la Medicina Forense Veterinaria





Rupicapra pyrenaica



Capreolus capreolus



Cervus elaphus



Gyps fulvus



Procyon lotor







RILEVAZIONE DI IBRIDI INTRASPECIFICI





Ovis aries (loci STR)







Sus scrofa (loci STR + SNP)

Convenzione con il Parco dell'Aspromonte





Canis lupus (loci STR + Y-STR)



Convenzione con il Parco dei Castelli Romani





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 x 10⁻⁴, che equivale a 1 in 5600 (≈ 3000 mufloni in Sardegna)







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















INTRODUZIONE DI SPECIE ALIENE

Il procione (*Procyon lotor*) è una specie di origine americana, introdotta in Europa centrale nel secolo scorso, ritrovata in nord Italia una decina di anni fa.





Si riproduce molto rapidamente, e può trasmettere rabbia e altre malattie ad animali selvatici e domestici.







Convenzione con il Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi



Per risolvere un caso di rilascio illegale di procioni in Toscana, il PNFC ci ha incaricato di mettere a punto un protocollo per l'analisi di parentela di questa specie.

Microsatellite analysis of raccoon (*Procyon lotor*) population structure across an extensive metropolitan landscape

TRENTEN T. SANTONASTASO.* JEAN DUBACH, STEPHANIE A. HAUVER, WILLIAM H. GRASER III, AND STANLEY D. GEHRT

Comparative Medicine, Loyola University Medical Center, Building 101, Room 0745, 2160 S First Avenue, Maywood, IL

School of Natural Resources, Ohio State University, 2021 Coffey Road, Columbus, OH 43210, USA (SAH, WHG, SDG) Forest Preserve District of Kane County, 1996 S Kirk Road, Suite 320, Geneva, IL 60134, USA (WHG)

Understanding population structure can lend insight into the spread of animal-borne disease, and the effects of anthropogenic land use c

although raccoon popula

a wide range of habitat t PERMANENT GENETIC RESOURCES

highly fragmented area. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite habitat types (agricultur loci in the raccoon (Procyon lotor)

C. SIRIPUNKAW,*‡C. KONGRIT,*‡K. M. FARIES,*R. J. MONELLO,†M. E. GOMPPER† and

*Division of Biological Sciences, 226 Tucker Hall, and †Department of Fisheries and Wildlife Sciences, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA, ‡Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

We report the isolation and characterization of 17 polymorphic microsatellite loci in the North American raccoon (Procyon lotor). These loci exhibit high levels of allelic diversity, with between four and 13 alleles per locus, and heterozygosity, with observed values of 0.500-1.000 in a sample of 20 individuals. All genotypes conformed to Hardy-Weinberg expectations and there were no instances of linkage disequilibrium detected.

TABLE 2.—Loci used for population substructure analysis of raccoons (Procyon lotor) in the greater Chicago area, size ranges (bp), number of alleles (A_N), allelic richness (A_R), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities for raccoon populations in the greater Chicago area. Significant differences between observed and expected heterozygosity are indicated with Hz deficiency P-values (P). Asterisks (*) indicate significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (P < 0.00051).

Locus	Size range (bp)	A_N	A_R	H_{O}	H_{E}	P
Plo3-86	320-437	37	11.19	0.75	0.88	0.00*
Plo-M17	169-234	11	5.35	0.81	0.75	0.93
Plo-M3	263-289	9	6.05	0.76	0.79	0.71
Plo2-14	227-327	29	8.89	0.83	0.87	0.00
Plo-M20	175-231	15	7.58	0.83	0.82	0.18
Plo-M2	282-336	17	8.42	0.81	0.84	0.21
Plo2-123	558-620	16	7.36	0.83	0.85	0.27
Plo-M15	159-198	17	8.18	0.76	0.84	0.00*
Plo2-117	274-353	31	11.58	0.91	0.90	0.00
Plo3-117×	260-387	13	6.30	0.37	0.74	0.00*
PFL11	142-177	19	8.78	0.84	0.84	0.01
P161	123-151	9	4.06	0.37	0.41	0.13
PFL9	201-231	13	7.26	0.77	0.79	0.06
P140	166-190	12	6.42	0.73	0.73	0.14
Overall		17.71	7.67			

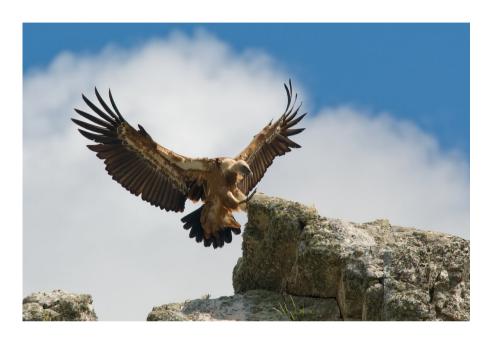
CHECK BIBLIO CHECK PARAMETRI



^{*} Correspondent: tsantonastaso@gmail.com











Convenzione con il Corpo Forestale di Castel di Sangro per lo studio genetico del grifone (Gyps fulvus)





per l'identificazione del lanario (Falco biarmicus)







SI ATTINGE DALLA RICERCA







SI CREANO DATI PER LA RICERCA





to be continued...

