MSRCTE 01/11

Studio pilota per la creazione e l'utilizzo di un database contenente i profili genetici di una popolazione controllata di cani

C. Cammà

Reparto Ricerca e Sviluppo Biotecnologie

Obiettivo

- Sviluppo di un sistema che renda possibile il riconoscimento individuale di un cane sulla base del suo corredo genetico

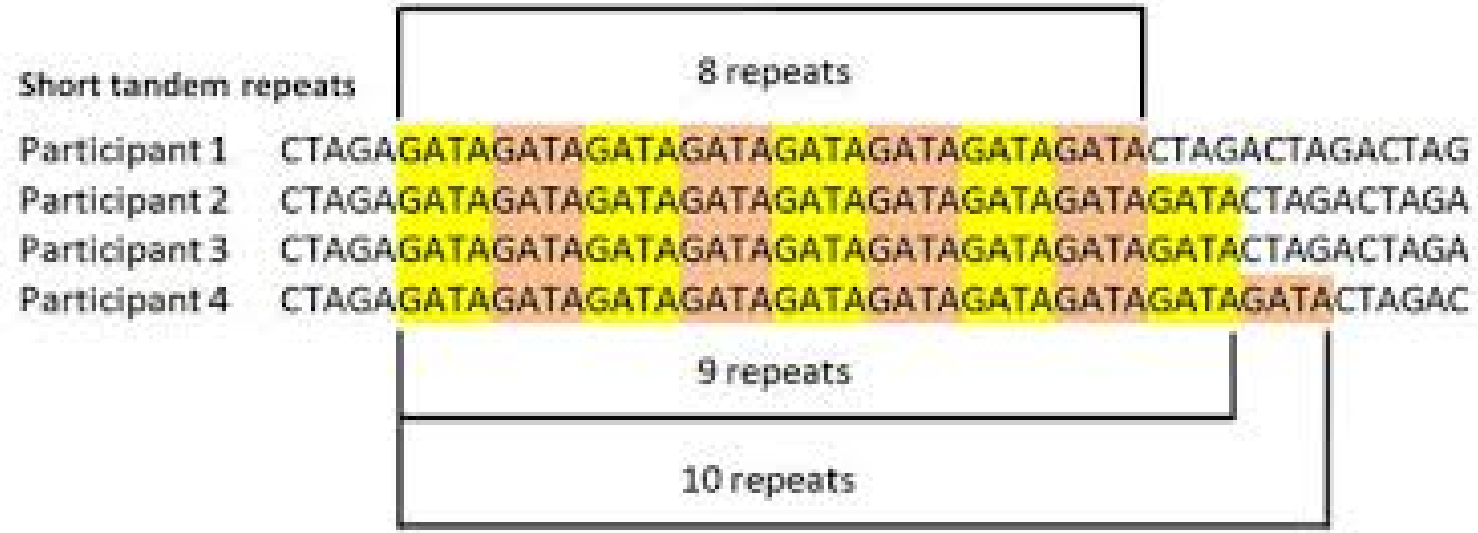
  - raccolta dei campioni biologici
  - ottimizzazione dei protocolli su matrici biologiche provenienti da un campione di 15 cani
  - analisi dei profili genetici di una popolazione controllata di 94 cani
  - creazione di un database contenente i profili genetici ottenuti
  - sviluppo di un metodo analitico per il confronto fra i profili genetici provenienti da campioni incogniti di feci e i genotipi degli individui presenti nella banca dati

Metodologia utilizzata

Analisi di microsatelliti

Short Tandem Repeat (STR) Simple Sequence Repeats (SSR)

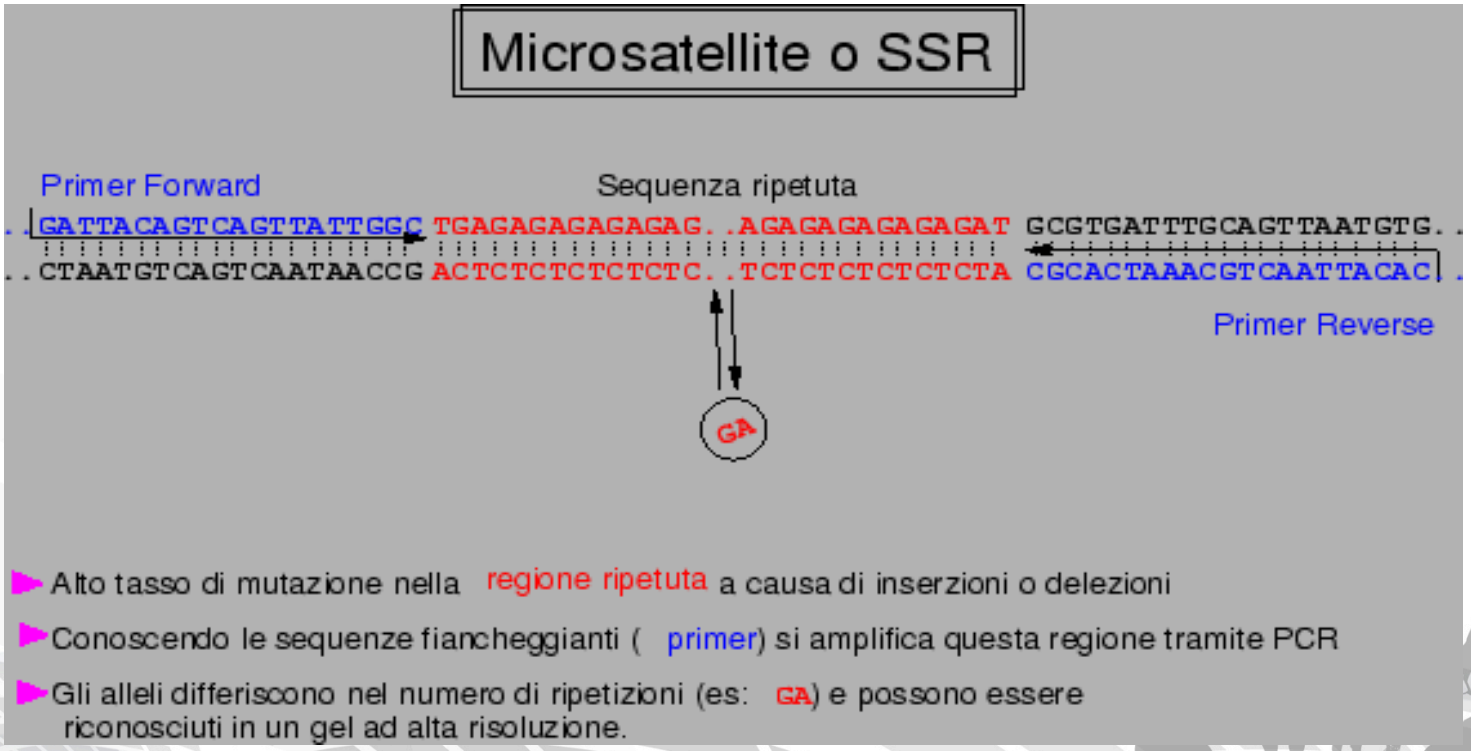
- Marcatori molecolari, localizzati sul DNA nucleare, costituiti da corte sequenze non codificanti (lunghe da 2 a 7 basi) ripetute in tandem



Metodologia utilizzata

Microsatelliti o Short Tandem Repeat (STR)

- elevato polimorfismo
- possono essere utilizzati per la caratterizzazione dei profili genetici individuali (DNA profiling o fingerprint)



Messa a punto di protocolli di estrazione del DNA da tre matrici prelevate da 15 cani

Campioni	Metodi di estrazione DNA
Sangue	Maxwell 16 Blood purification kit (Promega)
Tamponi gengivali	Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega)
Feci	QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen)

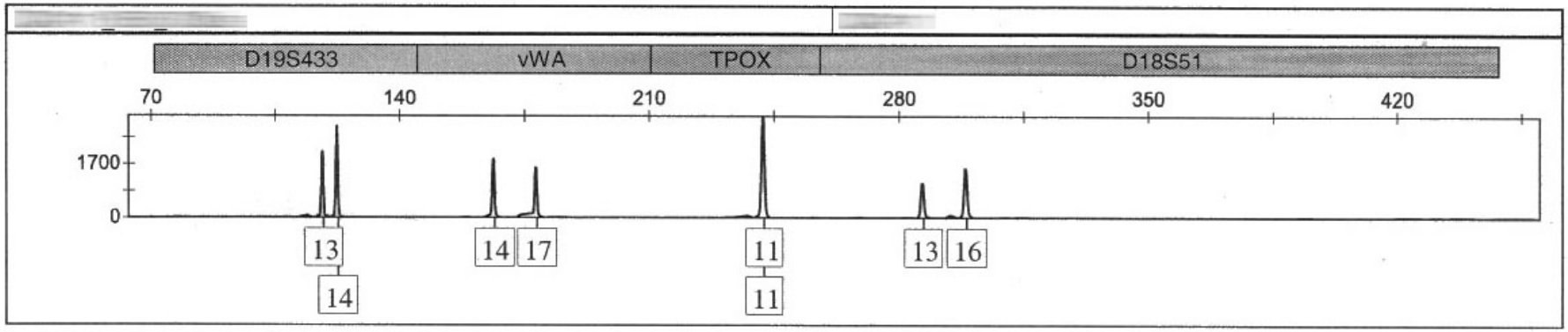
Metodologia utilizzata

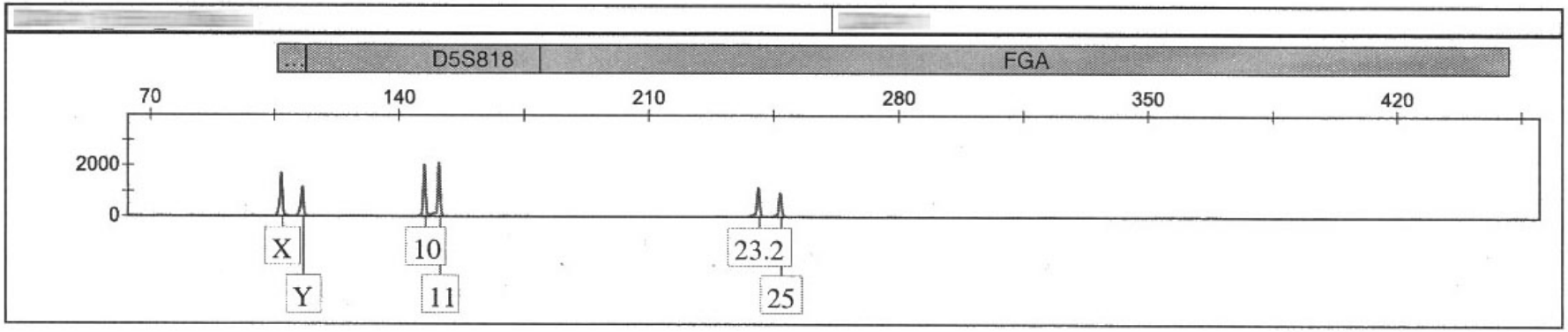
Analisi di microsatelliti o Short Tandem Repeat (STR)

- Amplificazione mediante PCR multiplex
  - co-amplificazione di 19 microsatelliti in una singola reazione di amplificazione mediante l'uso di un kit commerciale (Canine Genotypes Panel - Finnzymes)
  - 4 reazioni multiplex PCR per l'amplificazione dei 22 marker suggeriti dall'ISAG (International Society for Animal Genetics)

Metodologia utilizzata

- Elettroforesi capillare su sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente
  - *3130XL* Genetic Analyzer (Life Technologies) a 16 capillari





Risultati

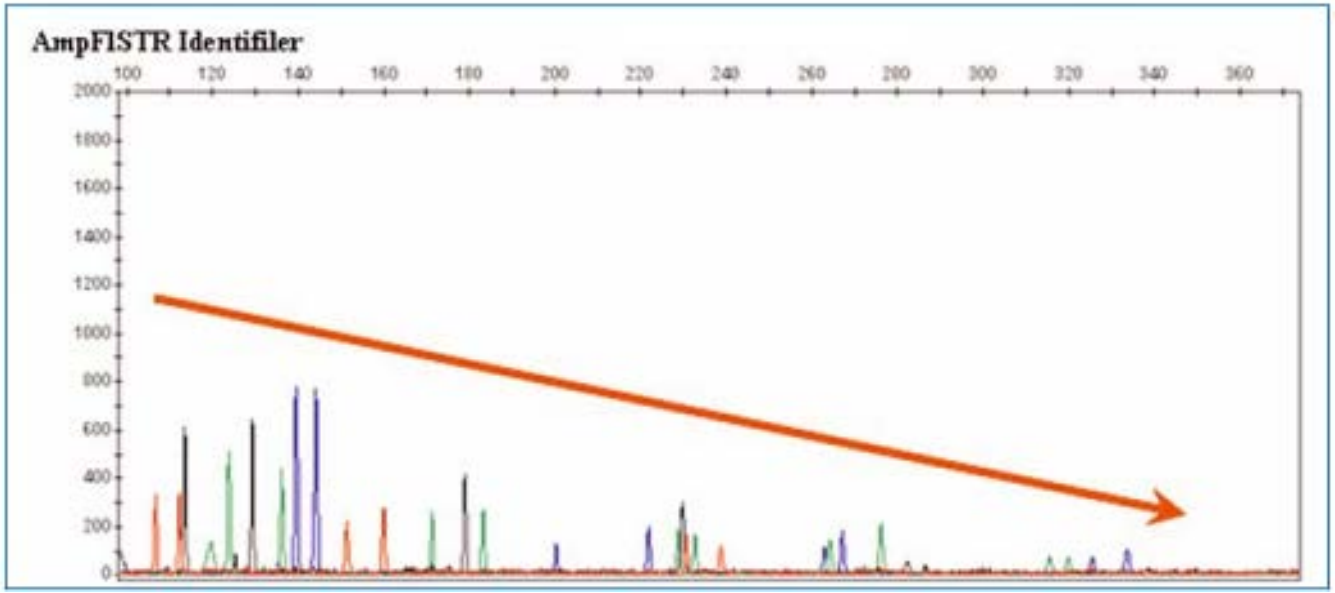
- Analizzati 94 campioni di sangue, 89 tamponi gengivali e 89 campioni di feci
- Variabilità di amplificazione dei singoli STRs sia all'interno della stessa matrice che tra matrici diverse
- 14 markers consentivano di ottenere profili genetici completi in tutte e tre le matrici
- Il numero di individui con cui costruire il DB è sceso quindi ad 83

Variabilità di amplificazione

In nessun campione di feci è stato possibile amplificare tutto il pannello dei 22 STRs

Marker	N. Individui	Marker	N. Individui
INRA21	88	REN169D011	46
INU005	87	REN54P11	46
CXX279	86	AHTk253	38
AHT121	86	REN105L103	26
AHTk211	84	Amelogenin	23
AHT137	82	FH2848	18
INU030	82	REN64E19	16
FH2054	79	REN162C04	8
INU055	60	AHTh171	3
REN169O18	54	AHTh260	2
REN247M23	54	AHTH130	1

Perché le feci sono campioni «difficili»

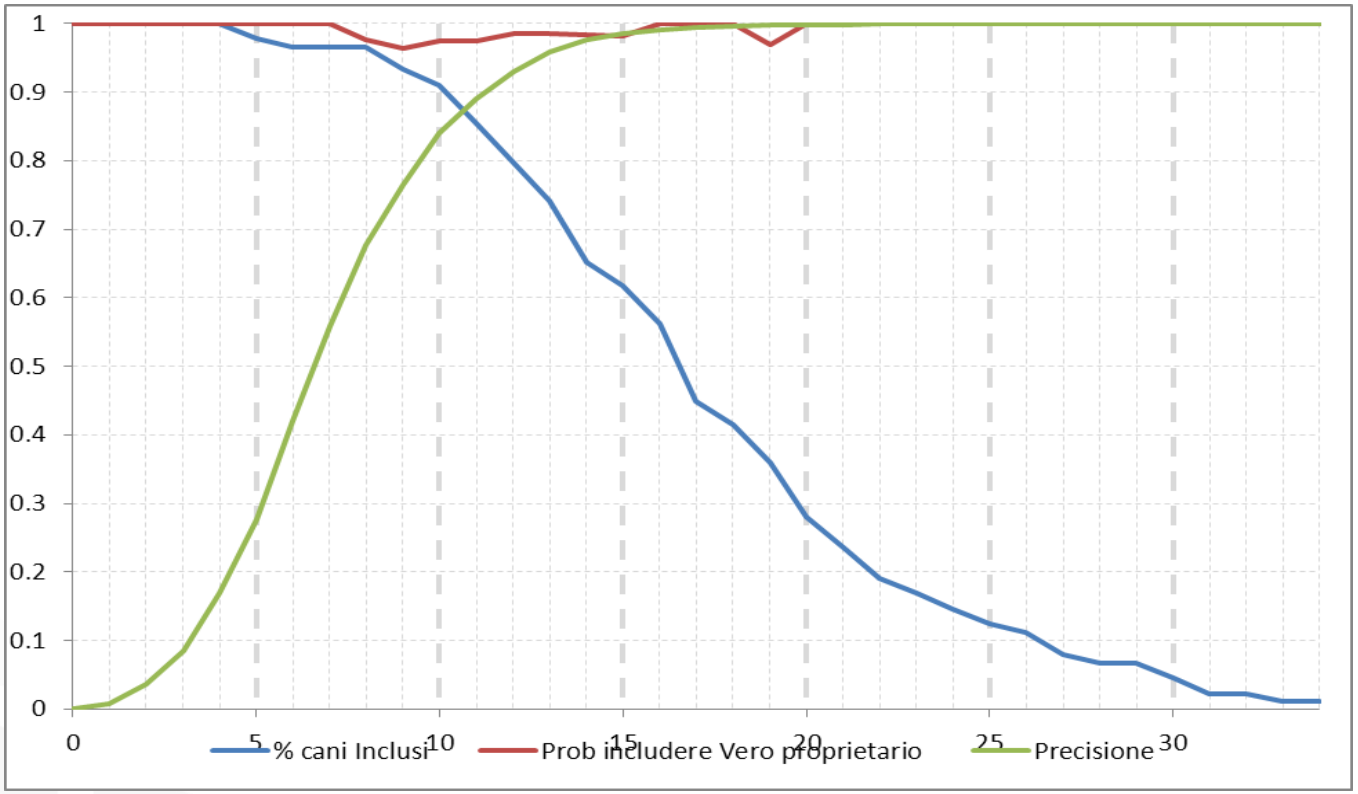


Effetto «*drop out*» dovuto a:

- Degradazione del DNA in campioni esposti a condizioni ambientali sfavorevoli
- Presenza di sostanze che inibiscono l'attività dell'enzima *Taq* polimerasi durante la reazione di PCR

Confronto tra profili genetici ottenuti da matrici diverse

Sviluppo di un algoritmo in VBA per valutare la probabilità di matching



Relazione tra il numero di marker considerati, la probabilità di includere il vero proprietario e la precisione del sistema

Conclusioni

- Generalmente è complesso applicare la tecnologia del confronto di profili genetici a partire da matrici differenti
- In particolare il campione di feci deve essere prelevato nel più breve tempo possibile dal momento della deiezione
- Le difficoltà aumentano nel caso di popolazioni imparentate

Sviluppi futuri

London Evening Standard

DNA tests on dog poo to trace owners who don't pick it up

Culprit: But owners now face being traced by the DNA in their dog's deposits

VGL Forensics AN ASCLD/LAB-*International* ACCREDITED TESTING LABORATORY SINCE 2010

The Veterinary Genetics Laboratory Forensic Unit (VGLForensics) is proud to be the first accredited crime lab dedicated to animal DNA profiling under the ASCLD/LAB-*International* program. We are also the only domestic animal DNA testing laboratory to be accredited by the Texas Department of Public Safety. Accreditation assures our clients that we are committed to a rigorous quality program that promotes acceptance of our test results.

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.

U.O. 3 IMS

CESARE CAMMÀ: Responsabile Unità Operativa

MAURILIA MARCACCI: Supporto attività progettuali

Ricerca e Sviluppo Biotecnologie

VALENTINA CURINI: Supporto attività progettuali

Ricerca e Sviluppo Biotecnologie

LUCA CANDELORO: Supporto attività progettuali

Statistica e GIS

La soluzione finale!