

Utilizzo dei marcatori ipervariabili del DNA nella pratica forense veterinaria: identificazione di reperti biologici appartenenti alla specie canina

RIASSUNTO

Alcuni animali domestici, in particolare i cani, vengono spesso chiamati in causa come autori di episodi di violenza e di rado come vittime di questi episodi. Gli autori descrivono un caso giudiziario avente come protagonista un cane di razza Labrador Retriever, rinvenuto in fin di vita in un cassonetto della nettezza urbana. L'animale presentava, infatti, numerose lesioni sul corpo riconducibili a colpi di arma da fuoco e di arma bianca, e segni di costrizione intorno al collo. La tempestività dei soccorsi e cure mediche adeguate hanno consentito di salvare l'animale. Nel corso delle indagini sono stati rinvenuti un'accetta con tracce di materiale biologico e un filo metallico, verosimilmente utilizzato per immobilizzare il cane. I reperti sono stati conservati a temperatura ambiente e, dopo circa 24 mesi, sono stati sottoposti ad analisi genetiche per verificare se le tracce biologiche fossero riconducibili alla vittima del reato, e per individuare eventuali responsabili del fatto. Il test del DNA, effettuato con marcatori microsatelliti specifici per la specie canina, ha consentito di evidenziare che sui reperti era presente materiale biologico appartenente alla specie canina, e che il profilo genetico dedotto era compatibile con quello del cane vittima del reato.

INTRODUZIONE

I progressi realizzati nel settore delle biotecnologie fanno sì che oggi anche la tipizzazione genetica di specie animali e l'attribuzione dell'identità individuale ad un reperto biologico possano essere inserite con successo nelle indagini forensi: la presenza di tracce di origine animale sulla scena di un crimine può infatti rappresentare un importante collegamento tra la vittima e il responsabile di un reato. Nei procedimenti giudiziari possono essere coinvolti animali domestici o di allevamento e in genere si tratta di questioni relative a frodi alimentari (ad es. per i bovini da carne tracciabilità individuale o razziale)¹, di verifica delle genealogie o identificazione genetica da campioni di urina nelle competizioni dei cavalli sportivi, di test parentali richiesti dall'Ente Nazionale Cinofilia Italiano per i cani, e, sempre per il cane, il coinvolgimento in episodi di violenza. A titolo di esempio, i dati presenti in letteratura riportano che negli Stati Uniti ogni anno tra 1 e 4 milioni di persone vengono morse dai cani, con conseguenze anche letali^{2,3}. Ma gli animali, oltre che artefici, possono a loro volta essere vittime di eventi criminosi anche molto efferati, come nel caso di cui riferiamo. Si tratta appunto di un caso di un cane di sesso maschile, di razza Labrador Retriever, trovato in fin di vita in un cassonetto per i rifiuti, con evidenti ferite da arma da fuoco e da arma da taglio, e con alcuni segni di costrizione sul collo, attribuibili ad un laccio. Nel cassonetto è stato rinvenuto anche un laccio metallico, composto da quattro fili, con nodo scorsoio, sul quale erano evidenti alcune formazioni pilifere (Figura 1). Nella tenuta del proprietario del cane è stata inoltre rinvenuta un'accetta con manico di legno lungo circa 50 cm e lama in metallo, con formazioni pilifere di varia natura e alcune tracce di materiale simil-ematico (Figura 2). Il medico veterinario che ha visitato e sottoposto il cane ad un intervento chirurgico che ne ha consentito la sopravvivenza, ha stabilito che le ferite riportate erano compatibili con l'arma in sequestro. È stato quindi chiesto all'Ufficio del Pubblico Ministero di accertare se le tracce presenti sull'accetta fossero riconducibili al cane o se, come sostenuto dal proprietario, l'attrezzo fosse stato utilizzato esclusivamente per 'tagliare il collo alle galline'. Sull'accetta erano, infatti, presenti formazioni pilifere riconducibili a piume (Figura 3). Risalire alla specie di appartenenza di una traccia biologica o identificare un determinato animale è ora possibile grazie a tecniche estremamente sensibili e specifiche di biologia molecolare^{4,5}. In medicina veterinaria i possibili campi di applicazione della biologia molecolare sono vari e numerosi e vanno dallo studio della variabilità genetica, della consanguineità, dell'eredità patologica, all'identificazione delle varianti

Marina Dobosz

*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale,
Sezione di Medicina Legale e Medicina Specialistica
dello Sport, Università di Perugia - Perugia*

**Paolo De Iuliis, Margherita Bonuglia,
Cinzia Grasso, Chiara Bocci**

*U.N.I.R.E.LAB s.r.l.,
Laboratorio di Genetica Forense Veterinaria, Pomezia (RM)*

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 02/12/2008 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 26/09/2009".



FIGURA 1 - Filo metallico in sequestro.



FIGURA 2 - Accetta in sequestro.



FIGURA 3 - Formazioni pilifere e piume presenti sull'accetta.

allelische responsabili di determinati fenotipi morfofunzionali che possono interessare la selezione di una determinata razza animale, alla tracciabilità razziale delle carni bovine crude, cotte o trasformate. Le recenti scoperte legate alla mappatura del genoma di numerose specie animali aprono

nuovi orizzonti in tutto l'ambito zootecnico ed i marcatori genetici evidenziati fino ad ora hanno già permesso studi di filogenesi su numerose razze canine^{6,7,8,9,10}. I marcatori utilizzati nella presente indagine appartengono alla categoria degli Short Tandem Repeats (STRs), ovvero microsatelliti che presentano una sequenza base di DNA formata da 2 a 7 paia di basi (*core sequence*), ripetuta in tandem. Ogni sistema è caratterizzato da un numero variabile di alleli, che si differenziano in base al numero di volte in cui è presente la sequenza ripetuta. I microsatelliti rappresentano i marcatori genetici attualmente più utilizzati nel campo della mappatura dei geni e per lo studio della variabilità genetica, umana e animale^{11,12,13,14}. Negli ultimi anni gli studi genetici riguardanti il cane domestico (*Canis familiaris*) si sono moltiplicati e hanno consentito di individuare nel cane circa 200 microsatelliti^{15,16}. Le razze con il maggior numero di soggetti analizzati sono: Labrador Retriever, Bassotto, Yorkshire Terrier, Chihuahua, Zwergspitz, Shih tzu, Golden Retriever, Pastore Tedesco e Beagle¹⁷.

Alcuni marcatori microsatelliti sono stati validati ad uso forense, sia per quanto riguarda l'identificazione individuale che il controllo della parentela, in quanto presentano elevata variabilità nel numero degli alleli che vengono ereditati come caratteri mendeliani semplici di tipo codominante.

MATERIALI E METODI

La tecnologia utilizzata nel presente lavoro è del tutto simile a quella impiegata per lo studio della variabilità genetica nell'uomo, ed utilizza marcatori specifici per la specie canina. Le indagini sono state condotte presso il laboratorio di Genetica Forense Veterinaria dell'Unirelab, un'azienda attiva ormai da alcuni anni nel settore della Genetica Forense Veterinaria, in grado di analizzare con tecniche di biologia molecolare campioni biologici delle più comuni specie animali.

I campioni biologici analizzati sono rappresentati da alcune formazioni pilifere e tracce di sangue, conservate a temperatura ambiente per circa 24 mesi. Le formazioni pilifere presenti sull'accetta erano per lo più riconducibili a piume di colore bianco sporco o biondo chiaro, integre o frammentate, frammiste a materiale simil-ematico, in alcuni punti con piccole croste. Dal momento che risultava difficile una differenziazione delle formazioni pilifere su base morfologica, abbiamo provato a verificare se sul reperto fossero presenti materiali biologici di altra natura (come ad esempio sangue).

Diagnosi generica di sangue

Alcuni frammenti di pochi mm delle tracce frammiste a peli presenti sull'accetta sono stati sottoposti alla diagnosi generica per stabilire se si trat-

tava di sangue, mediante il test della fenoltaleina di Kastle e Meyer¹⁸. L'indagine ha avuto *esito positivo* per la presenza di sangue.

Analisi del DNA

Sono stati sottoposti ad indagine genetica i seguenti campioni: due tracce di sangue presenti sull'accetta; le formazioni pilifere presenti sul filo metallico; un tampone buccale prelevato al cane.

L'analisi è stata condotta utilizzando 19 marcatori ipervariabili del DNA, inclusi nel *core panel* di loci ipervariabili raccomandati dall'International Society of Animal Genetics (ISAG). Per ogni marcatore sono noti la localizzazione cromosomica, la *core sequence* e l'intervallo di peso molecolare. Si tratta di loci a base per lo più dinucleotidica, tranne per un marcatore, che risulta essere un tetranucleotide (Tabella 1).

I campioni sono stati sottoposti a procedimento di estrazione del DNA utilizzando il kit commerciale DNA IQ™ System (Promega Corporation, Madison, WI 53711 USA). Il DNA estratto è stato quindi sottoposto ad analisi con lo spettrofotometro NanoDrop Spectrophotometer – ND 1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE 19810 USA) per valutare la quantità e la qualità del materiale estratto. I dati ottenuti hanno indicato quantità di DNA tra 14 e 90 ng/μl, con una purezza tra 1,5 e 1,9.

I campioni in esame sono stati dunque sottoposti ad amplificazione enzimatica. Le determinazioni si sono basate sull'impiego della reazione polimerasica a catena (PCR), seguita da separazione elettroforetica semiautomatica dei frammenti in laser-fluorescenza. Gli esperimenti sono stati eseguiti con il kit commerciale Canine Genotypes™ Panel 1.1 (Finzymes Diagnostics, 02150 Espoo, Finland), specifico per la specie canina, che consente di amplificare contemporaneamente i 19 sistemi. L'amplificazione è stata condotta con il Thermal Cycler Piko (Finzymes Diagnostics, 02150 Espoo, Finland). I frammenti sono stati analizzati con l'impiego del sequenziatore capillare A.B.I. 3100. Controlli positivi e negativi sono stati allestiti in tutti gli esperimenti. L'analisi dei dati elaborati dal sequenziatore è stata effettuata con il software GeneMapper ID v 3.1 o v. 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA 94404 USA); lo standard utilizzato è il LIZ500 e la determinazione degli alleli segue la nomenclatura proposta dall'ISAG. Gli esperimenti sono stati condotti in conformità alle direttive espresse dalla stessa ISAG¹⁹.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti sono i seguenti:

- dal tampone buccale prelevato al cane è stato ottenuto un profilo genetico completo, formato da 19 marcatori microsatelliti;

TABELLA 1 Caratteristiche dei marcatori analizzati. Sono indicati i nomi dei singoli loci, la localizzazione cromosomica, la natura dell'unità di ripetizione e il range di peso molecolare degli alleli			
marcatore	cromosoma	Repeat motif	Size range (bp)
AHTk211	26	dinucleotide	79-101
CXX279	22	dinucleotide	109-13
REN169O	29	dinucleotide	150-170
INU055	10	dinucleotide	190-216
REN54P11	18	dinucleotide	222-244
INRA21	21	dinucleotide	87-111
AHT137	11	dinucleotide	126-156
REN169D01	14	dinucleotide	199-221
AHTTh260	16	dinucleotide	230-254
AHTk253	23	dinucleotide	277-297
INU005	33	dinucleotide	102-136
INU030	12	dinucleotide	139-157
Amelogenina	X	dinucleotide	174-218
FH2848	2	dinucleotide	222-244
AHT121	13	dinucleotide	68-118
FH2054	12	tetranucleotide	135-179
REN162C04	7	dinucleotide	192-212
AHTTh171	6	dinucleotide	215-239
REN247M23	15	dinucleotide	258-282

- tale profilo è *identico* a quello dedotto dall'analisi delle *formazioni pilifere presenti sul filo metallico* (19 loci su 19);
- l'analisi di una *traccia presente sull'accetta* ha fornito un profilo genetico incompleto; un locus ha dato esito negativo, *13 loci su 19 presentano profili allelici identici* a quelli evidenziati nel DNA genomico del cane, per 5 loci la traccia risulta omozigote per un allele, condiviso con il profilo genetico del cane;
- anche l'analisi di un'altra *traccia presente sull'accetta* ha fornito un profilo genetico incompleto; 3 loci hanno dato esito negativo, *15 loci su 19 sono identici* a quelli evidenziati nel cane, in un locus la traccia è omozigote per un allele, condiviso con il profilo genetico del cane.

Questo risultato, ovvero la non totale compatibilità tra il profilo genetico delle due tracce presenti sull'accetta e quello appartenente al cane, può essere attribuito ad una esigua quantità di DNA canino presente nelle tracce stesse. Il dosaggio allo spettrofotometro, che indica la quantità di DNA nel campione, non ha consentito, infatti, di stabilirne la provenienza canina o di altra specie animale. Inoltre, la presenza di piume conferma la presenza di materiale biologico di altra specie animale. Nei campioni forensi non è affatto infrequente ottenere profili genetici parziali,

dovuti a fenomeni come la perdita di alleli (*allelic drop-out*), generalmente quelli a più alto peso molecolare^{20,21}. Quando accade un evento del genere, un campione eterozigote (con due alleli) può erroneamente essere considerato omozigote (con un allele solo). Un evento del genere può essere ipotizzato per spiegare la ragione per cui le due tracce sono omozigoti per gli alleli condivisi con il cane, e non presentano quelli a più alto peso molecolare.

Per quanto riguarda il significato statistico della compatibilità evidenziata, ovvero quanti altri cani di razza Labrador potrebbero condividere lo stesso genotipo, i dati presenti in letteratura non consentono di produrre una stima numerica. Mancano, infatti, dati di frequenze alleliche dei marcatori analizzati riferibili alla razza Labrador Retriever. I marcatori analizzati sono comunque numerosi (19 contro i 15 dell'uomo) e, secondo le direttive stabilite dall'ISAG, l'identità tra due genotipi per un numero minimo definito di marcatori (*core panel*) viene comunemente accettata per affermare che due campioni appartengono allo stesso individuo.

Il caso descritto rappresenta un esempio di come la tecnologia impiegata per lo studio della variabilità genetica nell'uomo può essere applicata anche agli animali. Se dunque da un punto di vista tecnico possiamo disporre di metodiche affidabili e validate a fini forensi, nel caso dell'identificazione animale è di fondamentale importanza la costituzione e la pubblicazione di un dataset internazionale delle frequenze alleliche per i marcatori STR consigliati dall'ISAG e per tutte le razze canine. È noto, infatti, che negli animali domestici, in particolare nei cani, la selezione (*inbreeding*) può influenzare enormemente le frequenze alleliche. In genetica l'*inbreeding* indica qualsiasi accoppiamento tra individui di una popolazione che abbiano antenati in comune, ed il cui grado di parentela sia più alto della media della popolazione stessa. Nel caso delle specie canine, in particolare della selezione delle razze, in genere gli allevatori intendono con questo termine un accoppiamento tra individui tra i quali non passi più di una generazione, ovvero padre con figlia, madre con figlio, fratello con sorella. Ciò significa che se padre e madre hanno antenati in comune, nelle generazioni successive si avrà una tendenza all'aumento dell'omozigosi, ovvero la possibilità che i due alleli di ogni gene siano uguali. Attraverso l'*inbreeding* si concentrano dunque i caratteri degli individui selezionati, a scapito di altri.

Questo processo, che consente di fissare i caratteri desiderati, rappresenta il modo con cui sono state selezionate le principali razze animali (non solo canine). Aumentando il numero di omozigoti per un determinato carattere, diminuirà la probabilità che due copie di uno stesso gene siano diverse tra loro (eterozigosi), con conseguente diminuzione della variabilità genetica. Per quanto riguarda la specie canina, i dati presenti in letteratura indicano valori di *inbreeding* significativi²² e, se si considera che è in continuo aumento il coinvolgimento di cani nelle vicende giudiziarie, sarebbe auspicabile sviluppare linee guida specifiche cui riferirsi e implementare gli studi in questo settore della genetica di popolazioni.

Parole chiave

Short Tandem Repeats, genoma canino, reperti biologici, medicina forense.

■ Forensic applications of hypervariable DNA markers in animal-derived traces analysis: identification of biological samples belonging to canine breeds

Summary

Dog-bite related injuries and fatalities are increasing in incidence and represent an important public health concern. But dogs can also be victims of injuries. The authors describe a case of violence on a male Labrador Retriever dog, found quite lifeless in a dust-bin. Medical examination revealed numerous wounds on the body of the animal, and signs of tightness all around the neck. Appropriate medical treatments were needed to save the animal. During the investigations a metallic lace and a hatchet with hairs and blood stains were found, stored 24 months at room temperature before genetic analysis. In order to identify the author of the violence, DNA analysis with canine STRs markers was performed on biological samples to establish if they belonged to canine breeds. The genetic compatibility found between the dog's swab and the hairs/blood stains on the exhibits allowed to verify the canine origin of the samples.

Key words

Short Tandem Repeats, canine genome, biological samples, forensic medicine.

BIBLIOGRAFIA

1. Ciampolini R, Cetica V, Ciani E, Mazzanti E, et al.: Statistical analysis of individual assignment tests among four cattle breeds using fifteen STR loci. *J of Anim. Sci.* 84:11-19, 2006.
2. Di Donato S, Ricci P, Panarese F and Turillazzi E: Cane Corso Attack Two Fatal Cases. *Forensic Sci. Med. Pathol* 2 (2): 137-141, 2006.
3. Sacks JJ, Sinclair L, Gilchrist J, Golab GC, et al.: Breeds of dogs involved in fatal human attacks in the United States between 1979 and 1998. *JAVMA* 217: 836-840, 2000.
4. Mullis KB, Faloona F: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 18:155-35, 1987.
5. Wang Y, Prosen DE, Mei L, Sullivan JC, et al.: A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced positivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Res.* 31: 4702-4709, 2004.
6. Halverson J, Basten C: A PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs. *J. Forensic Sci.* 50 (2): 352-363, 2005.
7. Ostrander EA, Sprague GF, Rine J: Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. *Genomics* 16: 207-213, 1993.
8. Ostrander EA, Mapa FA, Yee M and Rine J: One hundred and one simple sequence repeat-based markers for the canine genome. *Mammalian Genome* 6: 192-195, 1995.
9. Francisco LV, Langston AA, Mellersh CS, Neal CL, et al.: A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* 7: 359-362, 1996.
10. DeNise S, Johnston E, Halverson J, Marshall K, et al.: Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Anim. Genet.* 35 (1): 14-17, 2003.
11. Goldstein DB and Schlotterer C: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, 1999.
12. Beckman JS and Weber JL: Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12: 627, 1992.
13. Gill P, Kimpton CP, Urquhart A, Oldroyd N, et al.: Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic case-work - a strategy for the future. *Electrophoresis* 16 (9): 1543-1552, 1995.
14. Brinkmann B, Klintschar M, Nuehuber F, Huhne J: Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J of Hum. Genet.* 62:1408-1415, 1998.
15. Koskinen MT, Bredbacka P: Assessment of the population structure of five Finnish dog breeds with microsatellites. *Anim. Genet.* 31 (5): 310-317, 2000.
16. Onogi M, Nurimoto Y, Sato M, Morita A: Chromosomal duplication that includes the canine microsatellite INRA21 in Labrador Retrievers. *Anim. Genet.* 39 (3): 241-248, 2008.
17. Polli M, Marelli SP: Il controllo genetico della parentela nel cane con analisi del DNA. *I Nostri Cani* 14-15, 2003.
18. Gerin C, Antoniotti F, Merli F: *Medicina legale e delle Assicurazioni*. Società Editrice Universo, Roma, 296, 1991.
19. Budowle B, Garofano P, Hellman A, Ketchum M, et al.: Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *Int. J. Legal Med.* 119 (5): 295-302, 2005.
20. Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, et al.: An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci. Int.* 112 (1): 17-40, 2000.
21. Whitaker JP, Cotton EA, Gill P: A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPFISTR SGM Plus multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis. *Forensic Sci. Int.* 123, 2-3, 215-23, 2001.
22. Calboli FC, Sampson J, Fretwell N, Balding DJ: Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. *Genetics* 179(1): 593-601, 2008.

il controllo dell' iperadrenocorticismo (Cushing) del cane

amodo.it

SEMPLICE

RAPIDO

CON EFFETTO
REVERSIBILE

NESSUN EFFETTO
CITOTOSSICO

MARCHIO REGISTRATO

new

Ora disponibile la nuova
confezione da 10 mg



323.MX08

Milano

Via Michelangelo Buonarroti, 23
20093 • Cologno Monzese
Tel. 0225101 • Fax 022510500

JANSSEN
ANIMAL HEALTH