



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

Manuale operativo per il prelievo di campioni biologici finalizzato alle analisi genetiche nell'ambito della Convenzione di Washington (CITES)

MANUALI
E LINEE GUIDA

201/2022

Manuale operativo per il prelievo di campioni biologici finalizzato alle analisi genetiche nell'ambito della Convenzione di Washington (CITES)

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), insieme alle 21 Agenzie Regionali (ARPA) e Provinciali (APPA) per la protezione dell'ambiente, a partire dal 14 gennaio 2017 fa parte del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente (SNPA), istituito con la Legge 28 giugno 2016, n.132.

Le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questa pubblicazione.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, MLG 201/2022
ISBN 978-88-448-1138-9

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

Grafica di copertina: Sonia Poponessi - ISPRA – Area Comunicazione Ufficio Grafica
Foto di copertina: Immagine da repository copyright-free

ISPRA – Area Comunicazione

Coordinamento pubblicazione online:

Daria Mazzella

ISPRA – Area Comunicazione

11/10/2022

Autori

Chiara Mengoni
(ISPRA, Area per la Genetica della Conservazione)

Edoardo Velli
(ISPRA, Area per la Genetica della Conservazione)

Patrizia Giangregorio
(ISPRA, Area per la Genetica della Conservazione)

Claudia Greco
(ISPRA, Area per la Genetica della Conservazione)

Anna Padula
(ISPRA, Area per la Genetica della Conservazione)

Nadia Mucci
(ISPRA, Responsabile Area per la Genetica della Conservazione)

Manuale realizzato nell'ambito del progetto di alternanza scuola-lavoro coordinato da ISPRA: «Investigando il DNA per la difesa delle specie animali protette».

Con il contributo della classe 4°L dell'Istituto di Istruzione Superiore Ettore Majorana di San Lazzaro di Savena (BO) coordinata dalla prof.ssa Silvia Arnone

Ringraziamenti

Ringraziamo per la collaborazione l'Istituto Superiore Ettore Majorana di San Lazzaro.

Ringraziamo per la collaborazione i Carabinieri Forestali, in particolare i Nuclei CITES di Forlì e Bologna per la partecipazione al progetto di alternanza scuola-lavoro coordinato da ISPRA: «Investigando il DNA per la difesa delle specie esemplari protette».

Ringraziamo la Dott.ssa Irene Aguzzi (MiTE) per il suo costante e importante contributo alle attività

Sommario

Presentazione	5
Introduzione	6
L'Area per la Genetica della Conservazione di ISPRA	7
1. Principi generali	8
1.1. La commissione scientifica CITES	8
1.2. I nuclei CITES dei Carabinieri Forestali	8
1.3. La certificazione CITES relativa alle nascite in cattività	8
1.4. Le attività di campionamento in ambito CITES	11
1.5. La genetica forense	11
1.5.1. Genotipizzazione individuale	11
1.5.2. Analisi di parentela	12
1.5.3. Problemi relativi al campionamento	12
1.5.4. Ricostruzione dei nuclei parentali	13
1.5.5. Determinazione della specie	13
1.5.6. Il sessaggio molecolare	13
2. A cosa serve e a chi è dedicato questo manuale	14
2.1. Disposizioni generali	14
3. Prelievo di peli o penne	15
3.1. Casi di applicazione	15
3.2. Materiali per il prelievo dei campioni biologici	15
3.3. Procedura di prelievo	15
4. Prelievo di tamponi buccali e cloacali	17
4.1. Casi di applicazione	17
4.2. Materiali per il prelievo dei campioni biologici	17
4.3. Procedure di prelievo	18
5. Prelievo di sangue	19
5.1. Casi di applicazione	19
5.2. Materiali per il prelievo dei campioni biologici	19
5.3. Procedure di prelievo	19
6. Prelievo di tessuti	21
6.1. Casi di applicazione	21
6.2. Materiali per il prelievo dei campioni biologici	21
6.3. Procedure di prelievo	21
7. Compilazione del verbale e buone pratiche	23
8. Frequently asked questions	24
8.1. Richieste di materiale di campionamento	24
8.2. Operazioni di prelievo	25

8.3. In caso di riproduttori dubbi	25
8.4. Esito delle analisi	26
9. Glossario	27
10. Informazioni aggiuntive sui reagenti e le soluzioni impiegati per la conservazione dei campioni	28

Presentazione

Il presente manuale, dedicato interamente alle modalità di campionamento di materiale biologico finalizzato alle analisi genetiche, ha come principale obiettivo quello di assistere, nelle attività di campionamento, gli operatori che si trovino ad effettuare prelievi biologici a fine conservazionistico o forense.

All'interno del Dipartimento monitoraggio e tutela dell'ambiente e conservazione della biodiversità, l'Area per la Genetica della Conservazione si avvale dell'approccio biomolecolare per fornire informazioni utili a piani di gestione e conservazione della fauna selvatica.

L'attività di verifica dei flussi di commercio di specie protette dalla Convenzione di Washington (CITES) è una delle attività principali dell'Area e permette di identificare commerci illeciti di specie animali a rischio di estinzione, protette dalla Convenzione. Alla base di questo processo, si collocano le analisi genetiche che permettono di verificare e confermare la legale detenzione degli esemplari presenti negli allevamenti autorizzati e di identificare altresì dichiarazioni di nascita in cattività non veritiere o prelievi in natura non autorizzati. Per questo motivo, il corretto prelievo del materiale biologico da ogni esemplare, rappresenta un elemento cruciale per l'affidabilità dei risultati e necessita di personale adeguatamente formato in materia.

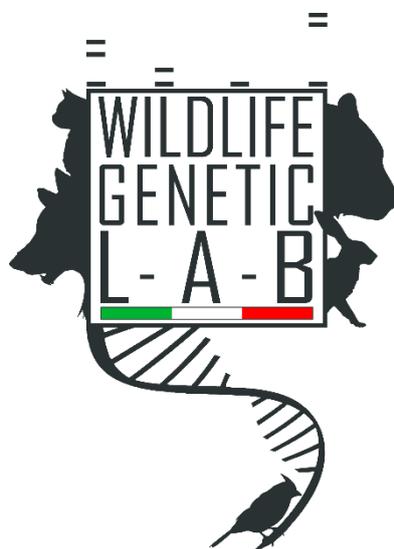
Consapevoli delle variabili che rendono questo processo di non facile applicazione, nell'ambito del Progetto di Alternanza Scuola Lavoro "Investigando il DNA per la difesa delle specie animali protette", svolto con l'Istituto di Istruzione Superiore Ettore Majorana di San Lazzaro (Bologna) e in stretto contatto con il personale del Comando unità forestali, ambientali e agroalimentari (CUFA), abbiamo ideato e realizzato questo manuale, dedicato interamente alle modalità di campionamento di materiale biologico finalizzato alle analisi genetiche, che si prefigge l'intento di coadiuvare le attività degli operatori che debbano svolgere tali operazioni di prelievo a fine conservazionistico o forense.

Il documento si articola in tre parti: una prima parte introduttiva che descrive il processo e gli enti coinvolti, una seconda che raccoglie le schede descrittive per il corretto campionamento a partire da diverse matrici biologiche e un'appendice finale che raccoglie tutte le domande frequenti (Frequently Asked Questions, FAQ) ricevute dai nuclei CITES coinvolti in questo processo ed a cui, nel corso degli anni, il personale dell'area ha dato risposta, con l'intento di prevenire dubbi da parte dei nuovi operatori.

Nadia Mucci

Responsabile Area per la Genetica della Conservazione

Nadia Mucci



Introduzione

La Convenzione di Washington sul commercio internazionale delle specie di fauna e flora minacciate di estinzione (CITES) è un accordo internazionale fra Stati che ha la finalità di regolamentare, monitorare e, ove necessario, vietare il commercio di specie animali e vegetali a rischio di estinzione, nonché dei loro prodotti e derivati.

La Convenzione, firmata nel 1973 ed entrata in vigore in tutti i Paesi firmatari nel 1975, prevede che ogni Stato Parte designi un'Autorità di Gestione quale organo responsabile dell'applicazione della CITES con funzioni di indirizzo politico, amministrativo e di coordinamento ed istituisca un'Autorità scientifica, in Italia nota come "Commissione Scientifica CITES (CSC)". Ogni Stato Parte può individuare anche ulteriori Autorità a supporto dell'Autorità di gestione.

In Italia l'Autorità di Gestione principale è rappresentata dal Ministero della Transizione Ecologica (MiTE ex MATTM) mentre le altre Autorità deputate all'applicazione della Convenzione di Washington sono: il Ministero degli affari esteri e commerciali (MAECI) per il rilascio dei permessi di importazione ed esportazione, il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali in collaborazione con l'Arma dei Carabinieri tramite il Raggruppamento CITES (CUFA) per il rilascio delle certificazioni di riesportazione e sfruttamento commerciale. A queste si uniscono le Autorità deputate al controllo rappresentate dall'Arma dei Carabinieri (CUFA e relativi distaccamenti territoriali detti Nuclei CITES) per il controllo sul territorio nazionale e dalla Guardia di Finanza per il controllo in dogana.

A seconda del diverso livello di protezione, le specie di interesse per la CITES sono suddivise in tre Appendici (I, II, III) che differiscono per il grado di controllo e conseguenti azioni sulle attività commerciali.

L'Unione Europea applica la Convenzione CITES mediante emanazione di specifici Regolamenti comunitari. Tramite i quali ogni Stato Membro dell'Unione dovrà regolamentare il proprio commercio anche inserendo ulteriori misure di restrizione.

La Convenzione CITES è applicata unilateralmente dall'UE, inizialmente con il regolamento 362/82 e ora con il Regolamento 338/97 relativo alla protezione di specie della flora e della fauna selvatiche mediante il controllo del loro commercio. Il Regolamento (CE) n. 338/97 è direttamente applicabile in tutti gli Stati membri dell'UE e, insieme al Regolamento (CE) n. 865/2006 (e successive modifiche), costituisce la base giuridica per l'attuazione della CITES nell'UE. Questi testi giuridici disciplinano il commercio internazionale e comunitario della fauna selvatica e contengono disposizioni aggiuntive alla CITES.

Il regolamento stabilisce quattro diversi regimi di protezione: l'allegato A corrisponde all'appendice I della CITES; l'allegato B all'appendice II; l'allegato C all'appendice III, mentre l'allegato D contiene specie che non figurano in nessuna delle appendici CITES. Da questo punto di vista, il regolamento ha in realtà un campo di applicazione più ampio di quello della CITES.

In particolare l'allegato A comprende: tutte le specie dell'appendice I CITES, ad eccezione dei casi in cui gli Stati membri dell'UE hanno formulato una riserva, alcune specie delle appendici II e III CITES, per le quali l'UE ha adottato misure interne più severe e alcune specie non-CITES.

L'allegato B comprende: tutte le altre specie dell'appendice II CITES, tranne quando gli Stati membri dell'UE hanno formulato una riserva, alcune specie dell'appendice III CITES e alcune specie non-CITES.

L'allegato C comprende: tutte le altre specie dell'appendice III CITES, tranne quando gli Stati membri dell'UE hanno formulato una riserva.

L'allegato D comprende: alcune specie dell'appendice III CITES per le quali l'UE ha una riserva, alcune specie non-CITES per essere coerenti con altri regolamenti UE sulla protezione delle specie autoctone, come la direttiva Habitat e la direttiva Uccelli

Ulteriori informazioni sull'applicazione della CITES nel mondo sono reperibili al sito ufficiale della Convenzione www.cites.org e sul sito del MiTE <https://www.mite.gov.it/pagina/cites-convenzione-di-washington-sul-commercio-internazionale-delle-specie-di-fauna-e-flora>.

L'Area per la Genetica della Conservazione di ISPRA

L'area per Genetica della Conservazione (BIO-CGE – ISPRA, Dipartimento Monitoraggio, tutela dell'ambiente e conservazione della biodiversità) si occupa da oltre trent'anni di progetti di biologia molecolare a supporto della conservazione e gestione delle specie protette di fauna selvatica. Il personale afferente all'area lavora in conformità con le norme previste dalla Certificazione del Sistema di Gestione per la Qualità ISO 9001.

L'area, dislocata su due piani, dispone di locali adibiti a laboratori, stoccaggio ed uffici; è fornita di moderne apparecchiature per l'analisi automatizzata di campioni biologici e piattaforme informatiche per le elaborazioni statistiche dei dati prodotti.

L'area è un'entità riconosciuta a livello nazionale ed internazionale nel settore della genetica e, di recente, anche della genomica applicata alla conservazione delle specie a rischio di estinzione.

L'area produce periodicamente elaborati scientifici pubblicati su riviste internazionali ISI che testimoniano l'importanza delle attività di ricerca svolte.

Le attività principali prevedono:

- Progetti di monitoraggio decennali delle popolazioni di carnivori (lupo, orso, gatto selvatico, lontra) per identificarne la presenza, la distribuzione e lo stato di conservazione delle popolazioni residue;
- Progetti di caratterizzazione dei principali endemismi italiani (lepre italica, capriolo italico, capra di Montecristo, cervo sardo, coturnice siciliana, ecc.) al fine di supportare la realizzazione di Piani di Azione o per mettere in atto le misure gestionali previste dalle normative vigenti o dalle direttive ministeriali;
- Caratterizzazione delle popolazioni appartenenti a specie selvatiche a rischio di estinzione (chiroteri, anfibi, mustelidi, ecc.) al fine di colmare la mancanza di dati scientifici necessari per l'adozione di adeguate misure di protezione;
- Studio dei rischi dovuti all'impatto antropico, in particolar modo la frammentazione degli habitat e l'ibridazione di popolazioni selvatiche con specie domestiche (lupo-cane; gatto selvatico-gatto domestico; cinghiale-maiale; coturnice-chukar; colombo selvatico-piccione, ecc.);
- Identificazione di illeciti nel commercio di specie protette dalla CITES (uccelli, mammiferi, rettili) tramite il controllo delle nascite in cattività negli allevamenti presenti su tutto il territorio nazionale;
- Supporto ad indagini forensi disposte o richieste dagli organi di controllo vigenti nazionali (Carabinieri forestali, Procura, Tribunale, ecc.).

Al fine di ottenere dati affidabili e di qualità, le procedure di routine impiegate per svolgere quanto sopra elencato sono sempre affiancate da continue attività di ricerca, sviluppo e sperimentazione che permettono di ottimizzare tempi e costi di analisi, e di rimanere competitivi nel settore della genetica della conservazione.

Le attività prevedono collaborazioni e scambi con Enti Pubblici ed Università Nazionali ed Internazionali e produzione di manuali e linee guida.

Dal 1999 l'Area per la Genetica della Conservazione fornisce supporto al MiTE, ex MATTM per la verifica della legale nascita in cattività mediante test biomolecolari. L'Area detiene i database e la biobanca di tutti i campioni analizzati fino ad oggi.

In oltre vent'anni l'attività ha permesso l'analisi di più di 12.000 campioni biologici appartenenti a circa 200 differenti specie di uccelli, rettili e mammiferi.

1. Principi generali

1.1. La commissione scientifica CITES

La Commissione Scientifica CITES (CSC) svolge la funzione di Autorità Scientifica nazionale per l'attuazione della Convenzione di Washington e dei Regolamenti Comunitari in materia di commercio di fauna e flora ed è istituita presso il Ministero della Transizione Ecologica; è presieduta dal Ministro o da un suo delegato, ed è composta da diciotto membri nominati con decreto ministeriale su indicazione della Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province autonome, di enti di carattere scientifico e di associazioni ambientaliste.

La CSC è organo indispensabile ai fini del commercio sostenibile delle specie poiché è l'organo deputato ad esprimere pareri vincolanti sulle importazioni ed esportazioni di specie di Allegato A e B e sugli spostamenti all'interno della UE di specie di Allegato A, inoltre si esprime sulle richieste di nascite in allevamento di esemplari CITES o di prodotti con essi realizzati inoltrate dall'Arma dei Carabinieri (CUFA) in qualità di Autorità accertatrice. Tale attività è necessaria affinché il commercio di specie selvatiche non pregiudichino la sopravvivenza in natura delle predette specie.

1.2. I nuclei CITES dei Carabinieri Forestali

I nuclei CITES dei Carabinieri Forestali (rispondenti al Raggruppamento CITES- CUFA) eseguono i controlli per il rilascio delle certificazioni di sfruttamento commerciale in attuazione della Convenzione di Washington sul commercio internazionale di esemplari di specie di flora e fauna minacciate. Relativamente al riconoscimento di nascita in cattività, il Servizio CITES territoriale competente, a seguito della richiesta di rilascio del certificato da parte dell'allevatore, dopo aver valutato le condizioni di ammissibilità e i presupposti rilevanti per il seguito del procedimento (marcatura esemplari, completezza informazioni nucleo familiare ecc.), dispone gli adempimenti istruttori necessari e provvede ad inviare la documentazione alla segreteria della CSC per l'emissione del parere di competenza, informando, per conoscenza, il Raggruppamento Carabinieri CITES.

1.3. La certificazione CITES relativa alle nascite in cattività

Il DPNM rilasciato dal Corpo Forestale dello Stato, ora Carabinieri Forestali (scaricabile al link: [https://www.carabinieri.it/docs/default-source/default-document-library/procedure-per-l'accertamento-della-nascita-in-cattivit%C3%A0-e-della-riproduzione-artificiale-di-esemplari-di-specie-animale-e-vegetali-incluse-negli-allegati-a-e-b-al-regolamento-\(ce\)-33897-nonch%C3%A9-al-rilascio-dei-relativi-certifi.pdf?sfvrsn=7f057d23_0](https://www.carabinieri.it/docs/default-source/default-document-library/procedure-per-l'accertamento-della-nascita-in-cattivit%C3%A0-e-della-riproduzione-artificiale-di-esemplari-di-specie-animale-e-vegetali-incluse-negli-allegati-a-e-b-al-regolamento-(ce)-33897-nonch%C3%A9-al-rilascio-dei-relativi-certifi.pdf?sfvrsn=7f057d23_0)), include tutte le procedure e obblighi e modulistica per rispettare le normative CITES vigenti.

In particolare la detenzione ed il commercio di specie in Allegato A sono vietati, eccetto che per i soggetti nati in cattività. Realizzandosi questa condizione il possessore deve essere sempre in grado di produrre, di fronte ad un eventuale controllo effettuato dagli agenti del CUFA, i documenti attestanti l'acquisto, come la fattura, la dichiarazione di cessione o la denuncia di nascita.

L'allevatore di esemplari animali presenti in Allegato A deve quindi, ad ogni nuova nascita, presentare all'ufficio CUFA di competenza la dichiarazione di denuncia di nascita di tali esemplari.

Acquisita la denuncia nelle forme previste, il Servizio CITES competente, dopo aver svolto i necessari accertamenti istruttori ed aver acquisito gli eventuali elementi e/o documentazioni mancanti, provvede ad inoltrare una apposita lettera al denunciante, concernente la presa d'atto della denuncia, le opportune informazioni riguardanti le disposizioni previste dalla normativa comunitaria e nazionale in materia di commercio e detenzione di specie incluse in allegato A, nonché ogni altra utile informazione per poter reperire la modulistica all'uopo predisposta.

A seguito di richiesta di rilascio del certificato ai sensi dell'articolo 8, paragrafo 3, lettera d), compilata conformemente all'apposito formulario annesso al regolamento (CE) n. 865/2006 (modello SCT2) e corredata

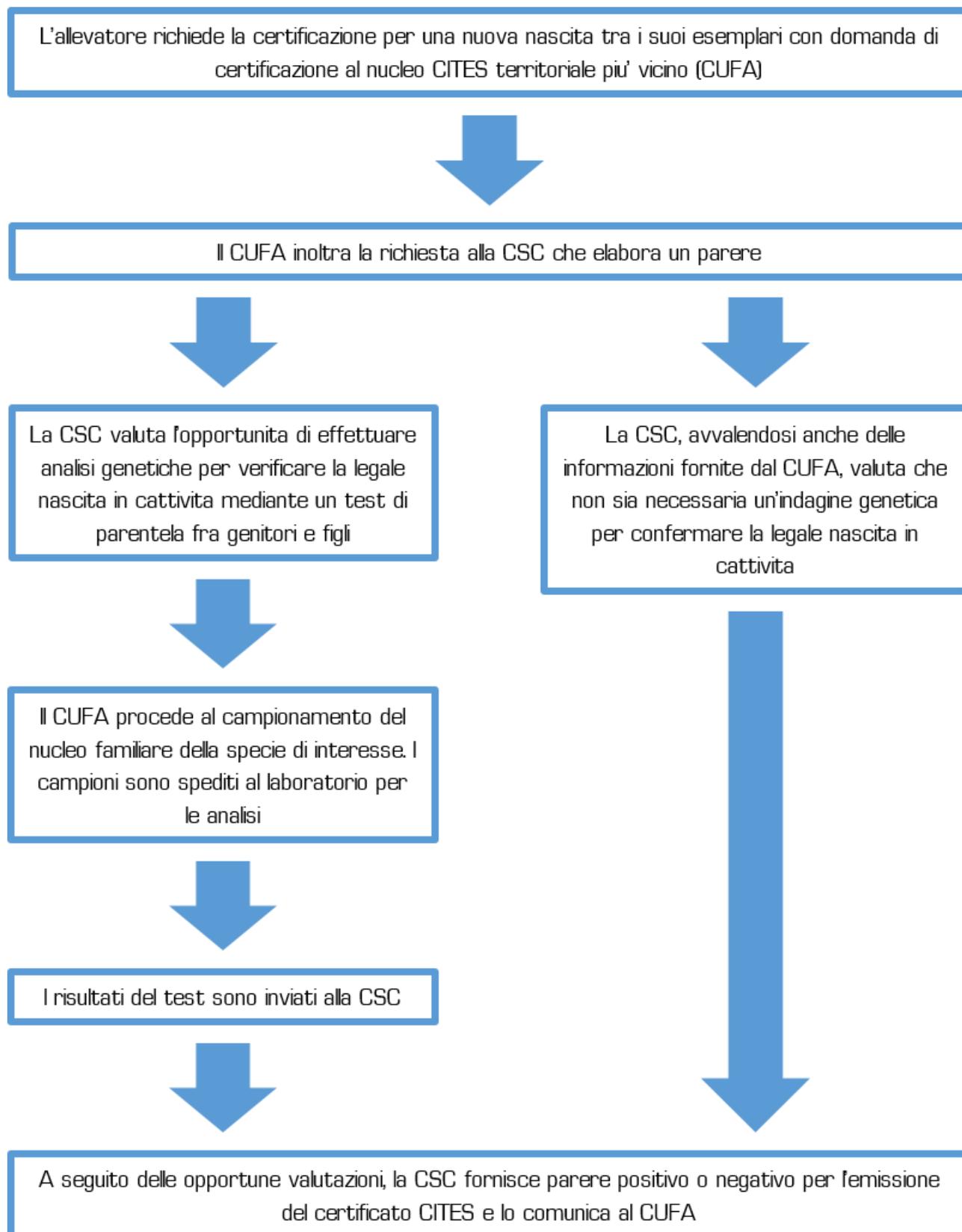
da tutti i documenti giustificativi, il Servizio CITES competente, dopo aver valutato le condizioni di ammissibilità e i presupposti rilevanti per il prosieguo del procedimento e, in particolare, la completezza delle informazioni richieste nella scheda informativa di cui al modello SCT2/A, ivi compreso gli estremi della marcatura della riserva riproduttiva e degli esemplari riprodotti, dispone gli adempimenti istruttori del caso e provvede ad inviarla alla segreteria della Commissione Scientifica CITES (CSC), unitamente a copia di tutta la documentazione, informando, per conoscenza, il Servizio CITES centrale.

La documentazione a supporto della suddetta verifica, costituente necessario supplemento istruttorio, andrà inviata anche all'Autorità di Gestione CITES. Ove necessario, la CSC potrà richiedere eventuali chiarimenti e/o supplementi di istruttoria al Servizio CITES competente, nel rispetto delle previsioni recate dalla legge 241/90, nonché lo svolgimento di sopralluoghi e/o prelievi di campioni biologici per stabilire tramite analisi genetiche l'ascendenza degli esemplari.

In caso di esito positivo dell'istruttoria preliminare svolta dal Servizio CITES competente e a seguito del parere favorevole espresso dalla Commissione scientifica CITES, detto Servizio provvederà al rilascio del certificato per uso commerciale, cui all'articolo 8, paragrafo 3, lettera d) del regolamento (CE) n. 338/97, attribuendo il codice origine "C" (captive) per indicare l'origine dell'animale quale allevato in cattività in conformità all'art. 54 del reg. (CE) n.865/2006. In caso di mancato riconoscimento di almeno uno dei requisiti previsti dall'articolo 54 del regolamento (CE) n. 865/2006, gli esemplari saranno considerati, ferma restando la legale acquisizione dei genitori e della relativa discendenza, come esemplari con codice origine "F" e quindi accompagnati da "certificato non valido per scopi commerciali".

Nel diagramma sottostante (Figura 1.1) è rappresentato il processo per l'ottenimento della certificazione CITES per le nascite in cattività riguardante tutti gli allevamenti di specie protette presenti sul territorio italiano.

Fig 1.1 - Diagramma di flusso rappresentante il processo per l'ottenimento della certificazione CITES per le nascite in cattività riguardante tutti gli allevamenti di specie protette presenti sul territorio italiano.



1.4. Le attività di campionamento in ambito CITES

Le analisi genetiche CITES sono finalizzate principalmente alla conferma della nascita in cattività di esemplari appartenenti a specie protette o minacciate elencate nell'allegato A del Regolamento Europeo

(eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/160/oj). Per garantire la corretta applicazione della convenzione di Washington nell'ambito del riconoscimento della nascita in cattività e identificare eventuali illeciti legati al commercio delle specie protette, l'Autorità di Gestione del MiTE ha attivato una apposita convenzione.

Il processo, che prevede il prelievo di campioni biologici e la verbalizzazione di tutti gli elementi conoscitivi utili alla pratica, deve essere eseguito in maniera corretta da personale debitamente formato in modo da garantire la raccolta di materiale contenente DNA di elevata qualità e quantità.

La corretta procedura di prelievo deve essere svolta alla presenza del personale del CUFA e, laddove necessario, in caso di prelievo di sangue, per specie pericolose o se richiesto dall'allevatore, anche di un veterinario. Per il prelievo, devono essere utilizzati materiali e strumentazioni idonei.

ISPRA fornisce il materiale di campionamento non facilmente reperibile in commercio, come soluzioni conservanti e provette safe-lock, e garantisce supporto in caso di dubbi o difficoltà (e-mail: analisi_cites@isprambiente.it).

Grazie alle analisi genetiche è possibile verificare le relazioni parentali (madre, padre, figlio) dichiarate nei verbali di prelievo.

L'accuratezza nel campionamento e nella conservazione del materiale biologico, la corretta verbalizzazione e la registrazione di tutte le informazioni utili alle analisi permettono di ottenere risultati affidabili in tempi celeri.

Le fasi fondamentali per il campionamento, raccolta, conservazione, etichettatura e tracciabilità, verranno descritte di seguito nelle sezioni dedicate alle differenti tipologie di campione biologico.

1.5. La genetica forense

La genetica forense utilizza il dato biomolecolare per ottenere informazioni utili a confermare l'esistenza di un illecito. Si avvale dei progressi scientifici ottenuti nell'ambito della Genetica della Conservazione e li applica laddove possibile. L'utilizzo delle tecniche forensi di natura biomolecolare è ampiamente diffuso nel campo umano; negli ultimi 20 anni le tecniche di genetica forense si sono ampiamente sviluppate anche per la risoluzione di illeciti contro la fauna selvatica ma le conoscenze e i campi di applicazione sono molto più limitati rispetto al campo umano.

Occorre segnalare che qualsiasi attività di natura forense su base molecolare richiede uno studio di fattibilità preliminare in cui è fondamentale la disponibilità di tutti i presupposti imprescindibili per garantire una solida affidabilità alle analisi e sono necessarie risorse economiche dedicate alla sua realizzazione.

È fondamentale avere solide basi conoscitive in campo biomolecolare per le forze dell'ordine che lavorano sul territorio in modo tale da valutare, in sinergia con tecnici e scienziati, quali siano i casi in cui è opportuno o meno proporre all'autorità giudiziaria accertamenti forensi di natura biomolecolare.

Di seguito, verranno illustrati, in sintesi, i principi di base delle tipologie di analisi più utilizzate.

1.5.1. Genotipizzazione individuale

La genotipizzazione individuale permette di ottenere il genotipo individuale di un esemplare, una sorta di impronta genetica. Il metodo più utilizzato si avvale dell'analisi di tratti di DNA ripetuto (loci microsatellite) che sono sparsi nel genoma e sono altamente variabili, anche tra singoli individui. Ciò permette di caratterizzare in maniera univoca gli esemplari di una specie rispetto ai propri simili e di differenziarli in maniera inequivocabile anche dai soggetti che derivano da loro per discendenza diretta.

Permette di comparare differenti prelievi biologici effettuati e di capire se l'esemplare a cui appartengono sia il medesimo o sia stato sostituito in maniera illegale con un altro.

1.5.2. Analisi di parentela

L'analisi di parentela permette di verificare le dichiarazioni dell'allevatore in merito alle nascite in cattività dei propri esemplari. Si basa sul principio secondo il quale, negli organismi diploidi, ogni figlio riceve il 50% del proprio corredo genetico dal padre ed il 50% dalla madre.

Nelle immagini sono rappresentati gli elettroferogrammi dalla cui lettura si ricavano i genotipi individuali (Figura 1.2) che permettono di verificare la discendenza dei figli dai genitori. Nella figura 1.2, l'esempio si riferisce ad un solo locus microsatellite (sequenza di DNA in una determinata posizione del genoma) ma è importante segnalare che, per essere affidabile, il test viene eseguito su molteplici loci per ciascun individuo.

Questa tipologia di analisi può essere condotta per una specie solo qualora esistano degli studi preliminari che abbiano sviluppato protocolli di analisi specie-specifici. Pertanto è buona regola valutare l'esistenza di questi protocolli interfacciandosi con il personale afferente all'Area per la Genetica della Conservazione prima di disporre analisi di parentela.

Fig 1.2 – Elettroferogrammi di genotipi di quattro individui relativi ad un locus. I primi due genotipi appartengono ad una coppia riproduttiva (padre e madre). Il terzo genotipo mostra una compatibilità di una parentela diretta con la coppia riproduttiva (possiede due alleli provenienti ognuno da un genitore). Il quarto genotipo risulta incompatibile con una discendenza diretta dai due individui riproduttivi in quanto mostra un allele che nessuno dei due individui riproduttori possiede.



1.5.3. Problemi relativi al campionamento

Un buon campionamento è alla base dell'affidabilità dell'intero processo analitico. Come anticipato, esiste una componente allelica (ovvero una combinazione di varianti dei loci microsatellite) che permette di assegnare la compatibilità dei figli ai genitori. Qualora il DNA non sia di buona qualità, a causa di un campionamento non efficace o di una errata conservazione del materiale biologico, possono verificarsi contaminazioni o errori nella rilevazione della componente allelica. In particolare può verificarsi la mancata visualizzazione di alcuni alleli (drop out allelico – ADO), rendendo incongruente l'associazione con i genitori. Questa problematica può essere risolta grazie alla reiterazione delle analisi ma ciò determina un aumento dei tempi di esecuzione e dei costi delle analisi.

1.5.4. Ricostruzione dei nuclei parentali

La ricostruzione dei nuclei familiari permette di identificare le coppie di riproduttori associate ai singoli figli all'interno di una riserva riproduttiva (Figura 1.2). Sono analisi estremamente complesse e dispendiose in termini di tempo e il cui successo dipende da molti fattori (variabilità genetica della specie, qualità del campionamento, numero di presunti riproduttori, ecc.). Hanno costi di realizzazione quasi triplicati rispetto ad analisi di parentela, e possono, a causa delle suddette difficoltà, fornire risultati parziali e non affidabili. Necessitano di uno studio di fattibilità prima di essere effettuate.

1.5.5. Determinazione della specie

La determinazione della specie permette di attribuire la specie di appartenenza ad un materiale biologico di origine ignota o controversa. È una tipologia di analisi più semplice rispetto alla determinazione della parentela, ma è attuabile per le specie per cui sono disponibili le sequenze di DNA di riferimento nelle banche dati internazionali online. Questa analisi non fornisce informazioni adeguate sull'ibridazione perché i metodi ad oggi in uso utilizzano prevalentemente il DNA mitocondriale che è ereditato solo per via materna.

1.5.6. Il sessaggio molecolare

Il sessaggio molecolare permette di identificare il sesso di un esemplare. È un'analisi particolarmente utile ad esempio per specie di uccelli che non presentano dimorfismo sessuale, in quelle in cui i pulcini non manifestano caratteri sessuali secondari o nei casi in cui siano disponibili solo alcune parti del corpo o tracce lasciate dall'esemplare. È un'indagine che coinvolge lo studio di tratti di DNA dei cromosomi sessuali. Il test è possibile solo per le specie su cui siano stati già sviluppati e validati i protocolli genetici.

2. A cosa serve e a chi è dedicato questo manuale

2.1. Disposizioni generali

Questo manuale vuole essere un supporto pratico ed operativo alle attività di campionamento di materiale biologico idoneo per analisi genetiche finalizzate al rilascio delle certificazioni CITES.

Il manuale è diviso in quattro sezioni dedicate al campionamento di: 1) peli e penne, 2) tamponi salivari e cloacali, 3) sangue, 4) tessuti muscolari. A queste si aggiungono ulteriori approfondimenti utili alla compilazione del verbale, alla conservazione ed alla spedizione dei campioni.

Una sezione dedicata alle domande frequenti suddivise per macro argomenti permette di verificare in maniera rapida i dubbi più comunemente riscontrati.

Per semplificarne l'utilizzo, le schede di campionamento sono identificate con diversi colori per tipologia di campione come riportato in Tabella 2.1:

Tab 2.1 – Identificazione dei colori corrispondenti alle diverse tipologie di campione.

Peli e penne	
Tamponi salivari e cloacali	
Sangue	
Tessuti muscolari	

3. Prelievo di peli o penne



3.1. Casi di applicazione

Il prelievo di penne o peli risulta la prima scelta nel caso di **uccelli o mammiferi**. Si tratta di una tipologia di prelievo poco invasiva e fornisce DNA di buona qualità.

3.2. Materiali per il prelievo dei campioni biologici

Prima di recarsi sul luogo del prelievo assicurarsi di avere a disposizione tutti i dispositivi di protezione individuale ed il materiale occorrente per un corretto campionamento e conservazione del materiale biologico (Figura 3.1). Di seguito sono elencati gli strumenti indispensabili per le operazioni di raccolta dei campioni:

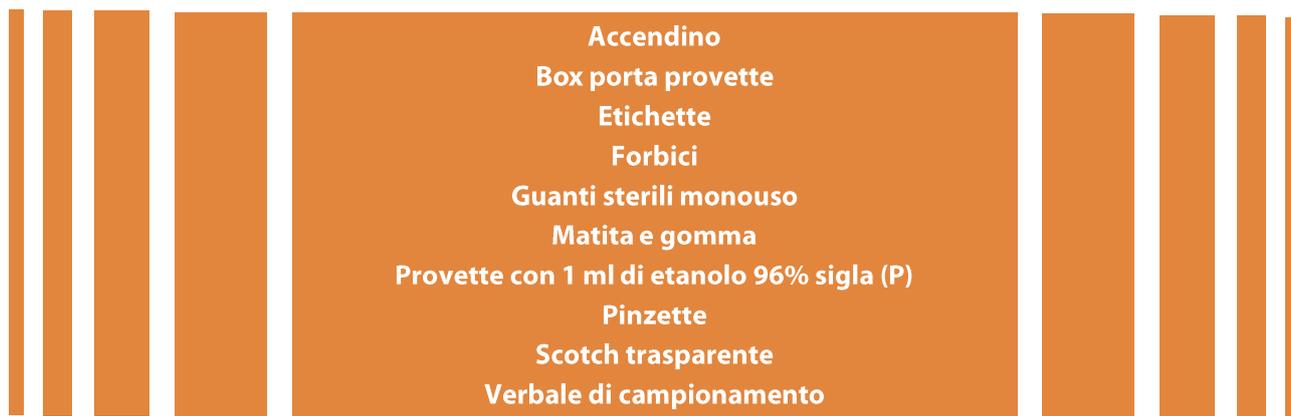
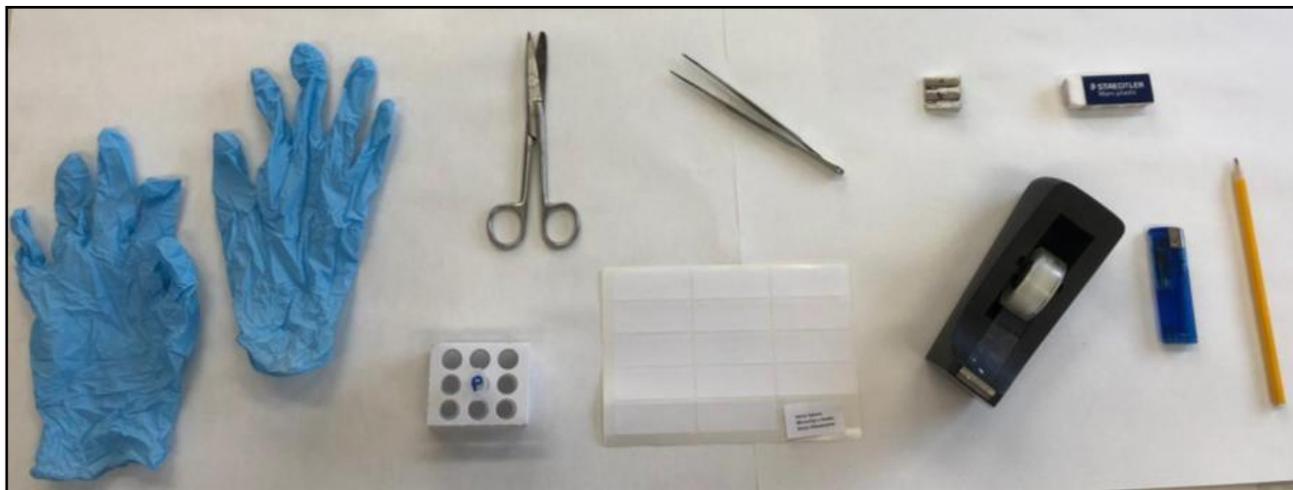


Fig 3.1 – DPI e materiali di prelievo.



3.3. Procedura di prelievo

Immobilizzare l'esemplare e prelevare:

- Per gli uccelli un minimo di 5 penne con calamo integro, preferibilmente in accrescimento. Prediligere la zona del petto o il sotto ala evitando di danneggiare la cute dell'esemplare.
- Per i mammiferi un ciuffo di peli (circa 10-20), con bulbo pilifero visibile e integro. Aggiungere 1 ml di alcol etilico (etanolo) al 96% o buongusto (per uso alimentare, assolutamente non alcol rosa denaturato!).

Inserire i peli o le penne nella provetta (Figura 3.2). Se troppo lunghi/e tagliare con forbici pulite in modo che rimangano completamente coperti dalla soluzione conservante ed all'interno della provetta senza impedire la chiusura ermetica del tappo (importante verificare la corretta chiusura).

Fig 3.2 – Esempio di un corretto prelievo di penne ed etichettatura.



Apporre l'ID identificativo mediante etichetta compilata digitalmente in font Arial dimensione 6 pt e riportare uno sotto l'altro (Figura 3.2):

IDENTIFICATIVO PROVETTA

NOME SPECIE

ANELLO O MICROCHIP

NOME ALLEVATORE

Assicurare l'etichetta con un giro semplice di scotch.

N.B. Una volta eseguito il campionamento di un individuo, i guanti ed i materiali utilizzati devono essere smaltiti in un contenitore idoneo per la raccolta dei rifiuti e le pinzette e le forbici utilizzate per il prelievo sterilizzate con la fiamma di un accendino.

4. Prelievo di tamponi buccali e cloacali

4.1.Casi di applicazione

Il prelievo di tamponi (*swab*) buccali e cloacali risulta il più indicato nel caso dei **rettili**. Questo tipo di prelievo garantisce un DNA di discreta qualità.

4.2.Materiali per il prelievo dei campioni biologici

Prima di recarsi sul luogo del prelievo assicurarsi di avere a disposizione tutti i dispositivi di protezione individuale ed il materiale occorrente per un corretto campionamento e conservazione del materiale biologico (Figura 4.1). Di seguito sono elencati gli strumenti indispensabili per le operazioni di raccolta dei campioni:

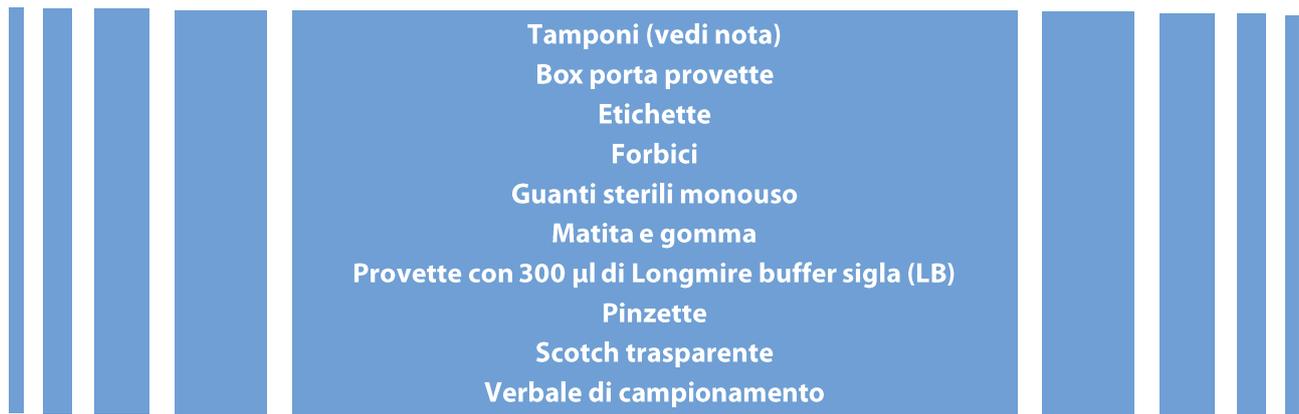
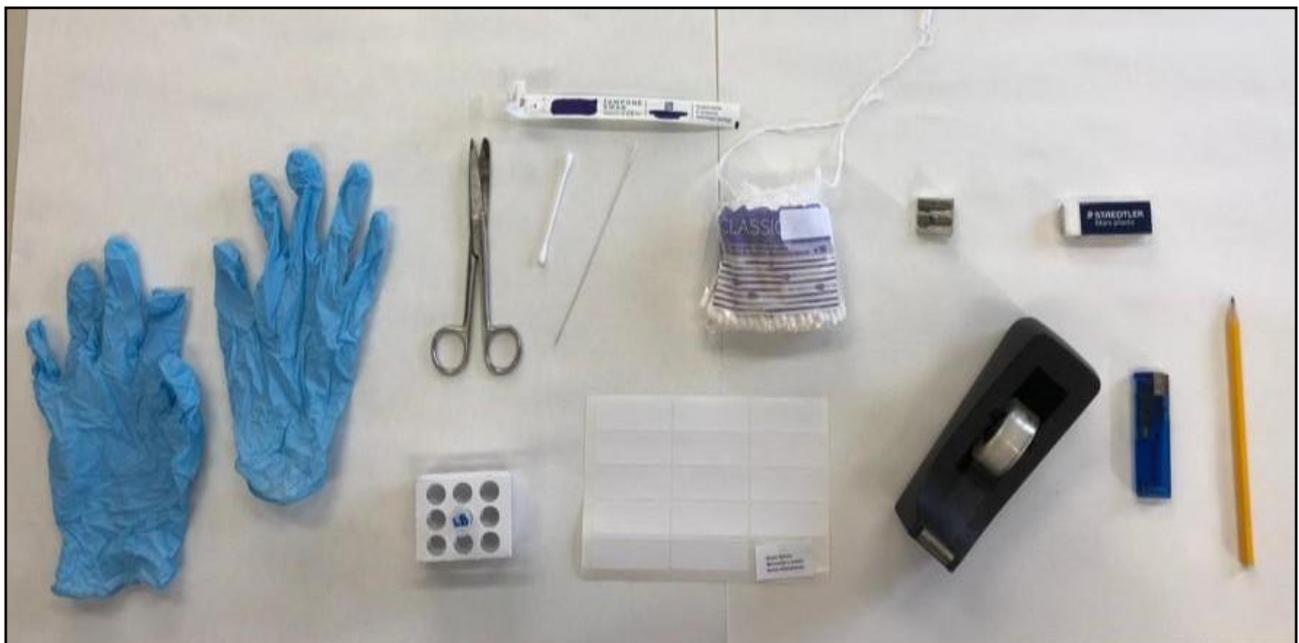


Fig 4.1 - DPI e materiali di prelievo.



Nota: vengono utilizzate due differenti tipologie di cotton fioc:

-Standard: per esemplari giovani, sub-adulti e adulti, da procurarsi autonomamente, facilmente reperibile in commercio.

-Piccolo: esclusivamente per esemplari molto giovani con apertura buccale di dimensioni ridotte (inferiore a 1 cm), mini tampone fornito da ISPRA, asticella in metallo. Da non utilizzare per altri esemplari poiché la capacità di asportare cellule diventa insufficiente su esemplari di dimensioni maggiori.

4.3.Procedure di prelievo

Bloccare l'esemplare in modo che non possa ferire sé stesso o l'operatore che effettua il campionamento (Figura 4.2a).

Scegliere in base alle indicazioni precedenti il corretto tipo di cotton fioc da utilizzare.

Prendere il tampone e sfregare energicamente nella cavità orale (lingua/palato/guancia).

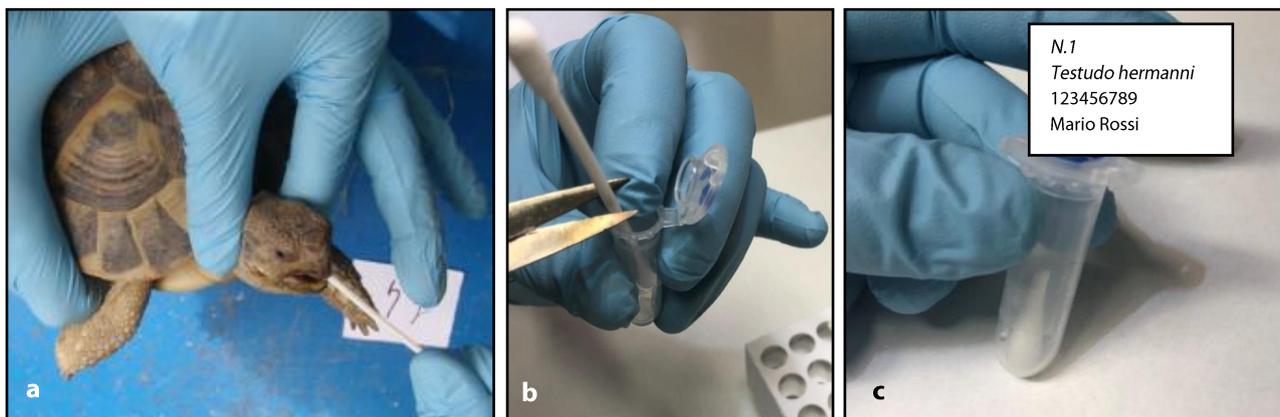
Nel caso in cui l'esemplare non mantenga la bocca aperta o sia difficile aprirla, è possibile procedere per via cloacale (attraverso l'orifizio anale dell'esemplare).

Inserire la testa del tampone all'interno della provetta e tagliare con le forbici l'asticella del cotton fioc (Figura 4.2b) in modo che rimanga completamente inserito all'interno della provetta e ne permetta la chiusura ermetica (l'asta dello *swab* non deve esercitare pressione né sul tappo né sulla ghiera di sicurezza interna).

Chiudere la provetta accuratamente assicurandosi che essa sia perfettamente sigillata (importante verificare la corretta chiusura, Figura 4.2c).

Ripetere questa operazione utilizzando un secondo cotton fioc ed una seconda provetta.

Fig 4.2 - Corretto prelievo di un tampone buccale su un esemplare di tartaruga.



Apporre l'ID identificativo mediante etichetta compilata digitalmente in Arial 6 pt e riportare uno sotto l'altro (come da immagine, Figura 4.2c):

IDENTIFICATIVO PROVETTA

NOME SPECIE

ANELLO O MICROCHIP

NOME ALLEVATORE

5. Prelievo di sangue

5.1.Casi di applicazione

Il prelievo di sangue va utilizzato nei casi in cui non sia possibile ricorrere alle altre tipologie di prelievo descritte precedentemente.

Deve essere effettuato da personale veterinario specializzato. Garantisce DNA di ottima qualità.

5.2.Materiali per il prelievo dei campioni biologici

Prima di recarsi sul luogo del prelievo assicurarsi di avere a disposizione tutti i dispositivi di protezione individuale ed il materiale occorrente per un corretto campionamento e conservazione del materiale biologico (Figura 5.1). Di seguito sono elencati gli strumenti indispensabili per le operazioni di raccolta dei campioni:



Fig 5.1 - DPI e materiali di prelievo.



5.3.Procedure di prelievo

Una volta effettuato il prelievo da parte del veterinario trasferire mediante siringa o pipetta monouso non più di 1 ml di sangue nell'apposita provetta S (Figura 5.2).

Non superare il rapporto di 1:1 tra soluzione conservante e campione prelevato (le provette sono graduate così da agevolare il trasferimento dei giusti quantitativi di sangue).

Chiudere la provetta accuratamente assicurandosi che essa sia perfettamente sigillata (importante verificare la corretta chiusura).

Agitare delicatamente di modo da ottenere una soluzione omogenea.

Fig 5.2 - Inserimento del campione di sangue nell'apposita provetta.



Apporre l'ID identificativo mediante etichetta compilata digitalmente in font Arial dimensione 6 pt e riportare uno sotto l'altro (come da immagine, Figura 5.2):

IDENTIFICATIVO PROVETTA

NOME SPECIE

ANELLO O MICROCHIP

NOME ALLEVATORE

Assicurare l'etichetta con un giro semplice di scotch.

N.B. Una volta eseguito il campionamento di un individuo, i guanti ed i materiali utilizzati devono essere smaltiti in un contenitore idoneo per la raccolta dei rifiuti

6. Prelievo di tessuti



6.1.Casi di applicazione

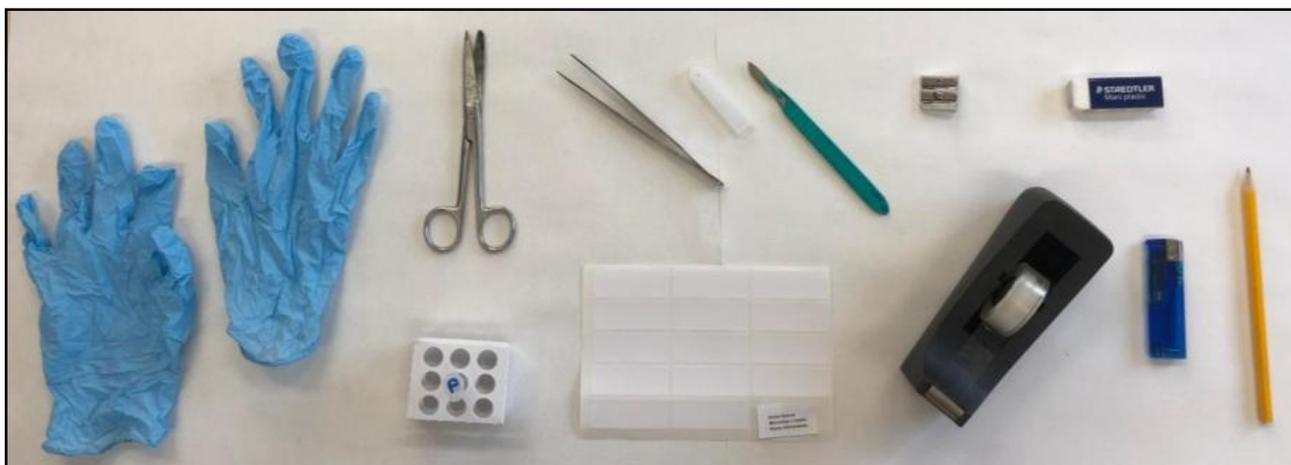
Si ricorre al prelievo di tessuti solo in presenza di **soggetti deceduti**. È un prelievo caratterizzato da alta invasività. Se la carcassa è in buono stato di conservazione questo tipo di prelievo garantisce un DNA di elevata qualità.

6.2.Materiali per il prelievo dei campioni biologici

Prima di recarsi sul luogo del prelievo assicurarsi di avere a disposizione tutti i dispositivi di protezione individuale ed il materiale occorrente per un corretto campionamento e conservazione del materiale biologico (Figura 6.1). Di seguito sono elencati gli strumenti indispensabili per le operazioni di raccolta dei campioni:



Fig 6.1 - DPI e materiali di prelievo



6.3.Procedure di prelievo

Sterilizzare bisturi e pinzette sulla fiamma prima e dopo ogni utilizzo.

Prelevare con il bisturi 0.5-1 centimetri cubici di tessuto muscolare dell'esemplare, prediligere il tessuto sottocutaneo a quello superficiale. Aggiungere 1 ml di alcol etilico (etanolo) al 96% o buongusto (per uso alimentare, assolutamente non alcol rosa denaturato!).

N.B. Non eccedere le quantità di tessuto raccomandate (Figura 6.2). Chiudere la provetta accuratamente assicurandosi che essa sia perfettamente sigillata (importante verificare la corretta chiusura).

Fig. 6.2 – Quantità corrette di materiale biologico da inserire nella provetta.



Apporre l'ID identificativo mediante etichetta compilata digitalmente in font Arial dimensione 6 pt e riportare uno sotto l'altro (come da immagine sottostante):

IDENTIFICATIVO PROVETTA

NOME SPECIE

ANELLO O MICROCHIP

NOME ALLEVATORE

Assicurare l'etichetta con un giro semplice di scotch.

N.B. Una volta eseguito il campionamento di un individuo, i guanti ed i materiali utilizzati devono essere smaltiti in un contenitore idoneo per la raccolta dei rifiuti e le pinzette ed il bisturi utilizzati per il prelievo sterilizzati con la fiamma di un accendino.

7. Compilazione del verbale e buone pratiche

Redigere digitalmente il verbale di campionamento usando il format fornito da ISPRA e aggiornato costantemente in accordo con MiTE, CSC e CUFA.

Compilare le diverse voci: codice identificativo (ID) di ogni provetta, anello/microchip per ogni esemplare, nome specie, nome allevatore, rapporti di parentela ecc.

Fornire le informazioni in modo più completo possibile e annotare tutte le dichiarazioni dell'allevatore.

Segnalare sempre e comunque eventuali cessioni, acquisizioni, fughe, decessi e la presenza di ulteriori individui nell'allevamento.

Soprattutto relativamente ai prelievi del genere *Testudo*, compilare dettagliatamente le informazioni riguardanti il nucleo familiare. Inserire sempre la data di nascita della progenie e la data di acquisizione/nascita dei riproduttori, soprattutto della madre, che può risultare già fecondata (ritenzione spermatica) al momento dell'acquisto.

Riportare tutte le informazioni che si ritengono possano essere utili, anche fornendo una relazione allegata.

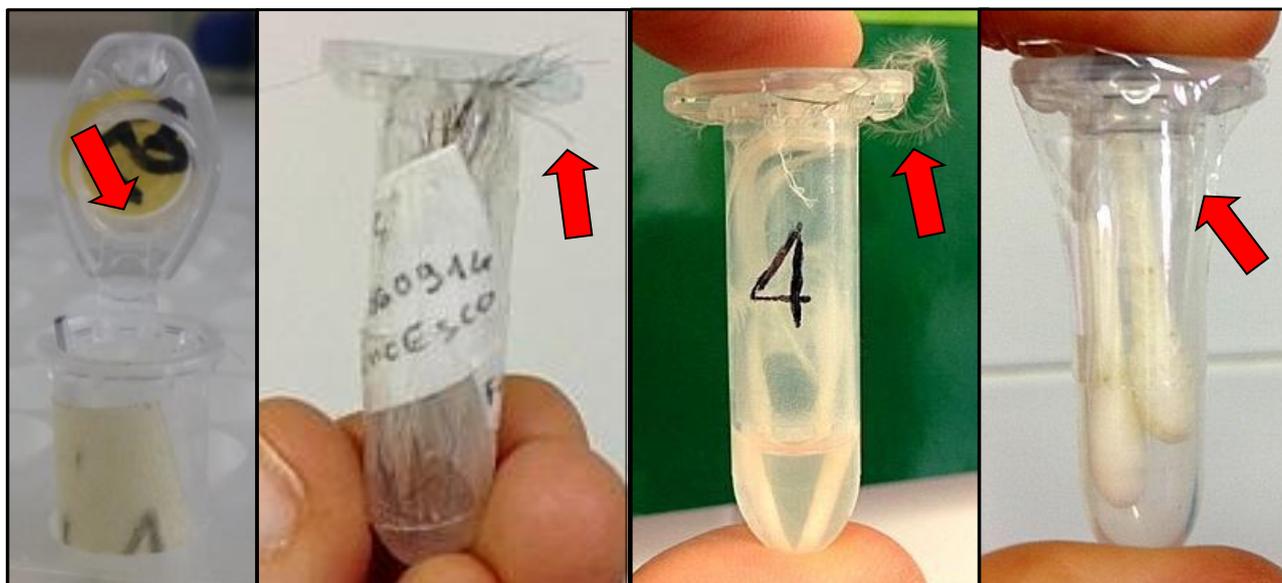
Inviare anticipatamente una copia digitale della tabella del verbale in formato editabile (NO PDF) all'e-mail: analiscites@isprambiente.it.

Tab 7.1 – Identificazione delle buone e delle cattive pratiche nella gestione dei campioni raccolti

BUONE PRATICHE ✓	CATTIVE PRATICHE ⚡
Tenere i campioni al riparo dalla luce	Tenere i campioni sotto il sole o al caldo
Tenere i campioni al fresco	Congelare e scongelare i campioni
Se molto caldo riporli in frigorifero	Spedire i campioni oltre una settimana dopo il prelievo

Di seguito (Figura 7.1) alcune immagini di campionamenti errati (da sinistra a destra): asticella tampone troppo lunga, peli debordanti e provetta rotta, barbule di penne fuoriuscite dal tappo, due tamponi in una sola provetta.

Fig 7.1 – Esempi di errori comuni nel metodo di conservazione del campione.



8. Frequently asked questions

Di seguito si riportano alcune domande frequenti (D) e le relative risposte (R) per chiarire la maggior parte dei dubbi inerenti alle procedure di campionamento. Le domande sono raggruppate in categorie omogenee:

8.1. Richieste di materiale di campionamento

D - *Qual è la procedura di richiesta delle provette?*

R - La corretta modalità è effettuare le richieste tramite e-mail all'indirizzo di posta elettronica: analisicites@isprambiente.it.

D - *Cosa devo scrivere nella richiesta?*

R - Nella richiesta va indicato il numero di provette che servono specificando la tipologia (S, vuote, LB) in funzione del numero e del tipo di campioni biologici da prelevare (S per sangue, vuote per penne e peli, LB per swab buccali e cloacali).

D - *Posso chiedere più provette per fare scorta in caso di bisogno?*

R - È utile ma senza eccedere, è sufficiente tenere un numero limitato di provette di scorta senza eccedere nelle richieste perché c'è il rischio che il materiale venga sprecato e le soluzioni conservanti si alterino. Si può comunque procedere in qualunque momento alla richiesta di nuovo materiale al laboratorio che provvederà all'invio tramite posta entro pochi giorni.

D - *Il laboratorio ISPRA fornisce tamponi standard per il prelievo salivare?*

R - No. I tamponi standard devono essere procurati dal CUFA o dagli allevatori, mentre i mini-tamponi da utilizzare esclusivamente per esemplari di piccole dimensioni con apertura buccale inferiore ad 1 cm sono forniti da ISPRA.

D - *A cosa servono i mini tamponi forniti da ISPRA?*

R - I mini tamponi servono esclusivamente per il prelievo in esemplari giovani di dimensioni talmente ridotte da non consentire l'ingresso nella cavità orale del tampone standard. Il mini tampone è assolutamente controindicato per adulti o subadulti perché la capacità di asportazione delle cellule buccali è ridotta e quindi il poco DNA prelevato spesso non è sufficiente per le analisi.

D - *Se mi mancano le provette LB per il prelievo buccale posso usare le provette P per le penne?*

R - No. Ogni tipologia di provetta contiene la soluzione conservante specifica e nella quantità idonea alla conservazione di ogni specifica tipologia di campione biologico.

D - *Se mi mancano le provette LB per il prelievo buccale posso usare le provette S per il sangue dal momento che si tratta dello stesso liquido di conservazione?*

R - No. Le provette S e LB contengono quantità diverse di soluzione conservante e adeguate ai processi di estrazione del DNA dei rispettivi tipi di campione.

D - *È possibile far spedire il materiale di campionamento direttamente all'allevatore?*

R - No. Il materiale deve essere fornito esclusivamente ai nuclei CUFA e conferito in allevamento solo in occasione dei prelievi.

D - *Cosa devo fare delle provette conferite in allevamento e non utilizzate?*

R - Le provette non utilizzate vanno conservate per campionamenti futuri in successive attività ispettive.

8.2.Operazioni di prelievo

D - *Chi è autorizzato al prelievo di sangue?*

R - Il prelievo di sangue deve essere eseguito esclusivamente da un veterinario alla presenza dei rappresentanti del CUFA i quali non sono coinvolti nelle operazioni di prelievo ma ne assicurano la regolarità di esecuzione, provvedendo alla trasmissione dei campioni per le analisi genetiche.

D - *Chi è autorizzato a fare il prelievo di penne, peli o tamponi buccali?*

R - Per queste tipologie di campioni biologici il prelievo può essere effettuato sia dall'allevatore stesso che da un veterinario ma comunque sempre alla presenza dei rappresentanti del CUFA.

D - *Come mi comporto se un riproduttore muore prima della disposizione delle analisi da parte della CSC?*

R - Se è possibile, congelare l'esemplare e, successivamente alla disposizione delle analisi, effettuare il prelievo di tessuto muscolare dalla carcassa alla presenza del CUFA. Se non è possibile conservare l'esemplare deceduto, eseguire il prelievo dalla carcassa sempre alla presenza del CUFA e spedire il campione prelevato allegando il verbale e specificando che si tratta di un invio di materiale biologico campionato in maniera preventiva.

D - *Se mi accorgo che ho sbagliato provette cosa devo fare?*

R - Se possibile ripetere il campionamento nella modalità corretta. Se non è possibile, annotare sul verbale l'errore ed informare comunque in maniera preventiva ISPRA tramite e-mail all'indirizzo di posta elettronica: analiscites@isprambiente.it.

D - *Se non riesco a spedire in tempi brevi i campioni prelevati come posso conservarli al meglio?*

R - Per pochi giorni anche in frigorifero; per molti giorni (oltre una settimana) è meglio riporli in congelatore.

8.3.In caso di riproduttori dubbi

D - *Se un allevatore non sa quali siano i riproduttori, si procede con i prelievi su tutta la riserva riproduttiva?*

R - In questo caso ISPRA non è in grado di eseguire il test di comparazione per attestare le relazioni parentali. E sarà cura del Nucleo CITES verificare il rispetto della L.150/1992 e rifiutare l'istanza di riconoscimento nascita in cattività

D - *Se un riproduttore è già stato campionato devo ricampionarlo?*

R - No, non è necessario. Le analisi vanno condotte in modo da minimizzare lo stress degli esemplari. Bisogna quindi accertarsi tramite e-mail (analiscites@isprambiente.it) che nella Biobanca ISPRA ci sia materiale disponibile e procedere al prelievo solo dalla progenie.

N.B. Ove segnalato, in particolare per le Testudo, ISPRA potrebbe richiedere la ripetizione del campionamento perché il prelievo salivare fornisce un quantitativo inferiore di DNA che è anche più facilmente deteriorabile.

D - Perché è importante diffondere fra gli allevatori la consapevolezza che l'incertezza sui riproduttori può creare problemi alle analisi (ritardi nel processo, difficoltà di associazione figli-coppie, mancato esito delle analisi, ecc.)?

R - L'informazione è fondamentale per acquisire consapevolezza e capire quali aspetti possono creare difficoltà nei processi di analisi. Anche in questo caso sarà cura del Nucleo CITES competente chiarire gli aspetti legati alla normativa nazionale e alla conseguenza necessaria di una buona gestione dell'allevamento pena il rigetto dell'istanza stessa

D - Nel caso in cui l'allevatore non sia in possesso di alcuni esemplari per qualsiasi motivo (furto, cessione, vendita, decesso, ecc.) le analisi sono in grado di fornire informazioni circa la nascita in cattività?

R - Non è detto. Qualora i riproduttori non siano disponibili potrebbe non essere possibile stabilire se l'impossibilità di determinare la nascita in cattività sia dovuta alla mancanza dei riproduttori o al commercio illecito. Sarà cura del Nucleo CITES competente verificare e valutare come procedere nel rispetto della normativa nazionale

8.4. Esito delle analisi

D - L'allevatore può chiamare direttamente ISPRA?

R - NO l'allevatore non può chiamare direttamente ISPRA ma deve rivolgersi all'Autorità richiedente e cioè al Nucleo CITES competente.

D - Se l'allevatore vuole effettuare analisi privatamente può chiamare ISPRA?

R - No, il laboratorio di ISPRA non è un laboratorio di servizio e non effettua analisi a pagamento per soggetti privati. ISPRA procederà unicamente su incarico della Commissione Scientifica CITES. È altresì possibile rivolgersi ai numerosi laboratori di servizio privati presenti sul territorio che offrono questo tipo di servizi.

D - Se l'allevatore ritiene possibile che la femmina fosse già stata fecondata al momento dell'acquisizione cosa bisogna fare?

R - Ogni dettaglio riguardante gli esemplari oggetto delle analisi va riportato scrupolosamente sul verbale. Le analisi genetiche sono in grado di verificare le dichiarazioni fornite dall'allevatore.

9. Glossario

CALAMO: parte basale dello scapo delle penne degli uccelli.

CITES: Convenzione di Washington sul commercio internazionale delle specie di fauna e flora minacciate di estinzione.

CSC: Commissione Scientifica CITES.

CUFA: Comando Unità Forestali, Ambientali e Agroalimentari.

DPI: Dispositivi di Protezione Individuale.

ETOH: etanolo o alcool etilico.

GENOTIPO: combinazione degli alleli presenti in un individuo per ogni gene osservato.

ISPRA: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale.

MiTE: Ministero della Transizione Ecologica

RISERVA RIPRODUTTIVA: tutti gli esemplari utilizzati nelle operazioni di allevamento a fini di riproduzione.

RITENZIONE SPERMATICA: conservazione dei gameti maschili nelle vie genitali femminili, è un fenomeno comune in rettili e uccelli. Nei cheloni lo sperma può essere accumulato dalla femmina per periodi molto lunghi (anche 3 o 4 anni).

SWAB: in inglese tampone (che può essere salivare o cloacale).

10. Informazioni aggiuntive sui reagenti e le soluzioni impiegati per la conservazione dei campioni

In generale, considerando i quantitativi estremamente ridotti impiegati, si segnala la bassa pericolosità di tutti i reagenti chimici utilizzati.

ETANOLO (ETOH)

Comunemente detto alcool

Formula molecolare C_2H_6O

Indicazioni di pericolo:

H225 liquido e vapori facilmente infiammabili.

H319 provoca grave irritazione oculare.

Pittogrammi



LONGMIRE BUFFER (LB)

Miscela di reagenti chimici riportati di seguito:

Tris-HCl: questa sostanza non risponde ai criteri di classificazione di cui al regolamento n. 1272/2008/ce.

EDTA (disodium salt solution): h373. Può provocare danni agli organi (sistema respiratorio) in caso di esposizione prolungata o ripetuta (in caso di inalazione).

NaCl (cloruro di sodio): questa sostanza non risponde ai criteri di classificazione di cui al regolamento n. 1272/2008/ce.

SDS (sodio dodecil solfato): la soluzione liquida non presenta particolari rischi.

ddH₂O (acqua bidistillata): non pericolosa.

