

DETEKCIJA DNA PREDVIDENEGA NAPADALCA NA KADAVRU OVCE

Jelka Zabavnik Piano*, Marko Cotman

¹Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

jelka.zabavnik@vf.uni-lj.si

V dveh zaporednih nočeh je neidentificirani napadalec (ali več napadalcev) poklal ali hudo ranil 35 ovac, ki so živele na pašniku v zaprti ogradi. Zaradi močnega zaščitnega volnenega kožuha na telesih ovac so bile smrtne rane prisotne predvsem na glavah živali. Štiri glave zaklanih živali so bile pet dni po napadu dostavljene v laboratorij, da bi na njih poiskali sledi možnega napadalca. Sledi slin smo iskali predvsem ob robovih ran. Iz vzorcev zlepljenih dlak ob robovih ran na glavah živali smo z reagenti QIAamp DNA Investigator kit proizvajalca Qiagen izolirali DNA. Na izolirani DNA smo z verižno reakcijo s polimerazo (polymerase chain reaction – PCR) pomnoževali kratke tandemske ponovitve (short tandem repeat – STR), značilne za pse. Za pomnoževanje lokusov STR smo uporabili reagent Canine Genotypes Panel 1.1 (Finnzymes Diagnostics), ki je namenjen za genotipizacijo, identifikacijo in preverjanje starševstva ter pasem pri psih. Ločevanje in opazovanje dobljenih fluorescentno označenih produktov PCR smo izvedli s kapilarno elektroforezo na ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Pri enem vzorcu smo uspešno določili DNA profil 11 lokusov STR. Ta profil bi lahko pripadal predvidenemu napadalcu tropa ovac, ki pripada družini psov.

Ključne besede: živalska forenzika; napad; profil DNA; kratke tandemske ponovitve

Uvod

Na ograjenem pašniku je meseca marca neidentificirani napadalec ali skupina napadalcev ponoči napadla trop ovac. Lastnik je zjutraj na pašniku našel zaklane ali hudo ranjene živali. V naslednji noči se je napad ponovil in v dveh zaporednih nočeh je bilo vseh 35 ovac zaklanih ali tako hudo ranjenih, da so bile kasneje humano usmrčene. Ovce so imele kožuh z dolgo volno, ki je ščitila trup pred ugrizi, zato je bila večina smrtnih ran na glavah živali. Po dogovoru z lastnikom ovac so bile pet dni po napadu štiri glave ubitih ovac dostavljene v laboratorij, da bi na glavah poiskali možne sledi, ki bi omogočile identifikacijo profila DNA napadalca.

Biološki vzorci psov, iz katerih je možno ugotovili profil lokusov kratkih tandemskih ponovitev (short tandem repeat – STR), ki omogočajo identifikacijo, so pogosto prisotni na prizoriščih, obravnavanih v različnih sodnih procesih. Lahko gre za povzročitelje nesreč, udeležence v nesrečah, za primere mučenja živali ali pa ugotavljanje sledi psa ljubljenca na oblačilih povzročitelja kriminalnega dejanja. Za razliko od uporabnosti podatkov o humanih profilih STR, ki omogočajo statistično vrednotenje pri proučevanju humanih sledi (1), pa je le malo uporabnih validiranih postopkov določanja profila STR in malo podatkov o profilih STR v različnih populacijah psov (2, 3).

Želeli smo ugotoviti, ali je pet dni po napadu možno dobiti uporabne sledi iz kadavrov ovac in ali z reagenti Canine Genotypes, Panel 1.1 lahko pridobimo podatke za identifikacijo napadalca.

Material in metode

Vsaki živali smo odstrigli vzorec zlepljenih dlak ob ranah na glavi. Iz teh vzorcev smo z reagenti QIAamp DNA Investigator kit (Qiagen), ki deluje na osnovi vezave DNA na silikonske delce, izolirali DNA. Uporabili smo protokol proizvajalca za izolacijo DNA iz sledov telesnih tekočin. Za psa specifične STR smo pomnožili v reakciji PCR z uporabo reagentov Canine Genotypes, Panel 1.1 (Finnzymes Diagnostics). Reakcijo PCR smo izvedli po navodilih proizvajalca, v vsaki reakciji smo uporabili po 1 ml DNA vzorca. Za preverjanje občutljivosti postopka smo uporabili znano koncentracijo DNA (od 2,0 ng do 7,5 pg), izolirano iz psa. Velikost fluorescentno označenih produktov PCR smo ocenjevali s kapilarno elektroforezo na ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Rezultati

S preverjanjem značilnosti postopka določanja profila STR na znani koncentraciji DNA z reagentom Canine Genotypes, Panel 1.1 (4) smo v laboratoriju dobili vseh 18 lokusov STR s koncentracijo DNA od 2 ng do 250 pg. Pri uporabi 125 pg znane DNA psa se je nekaj vrhov STR izgubilo.

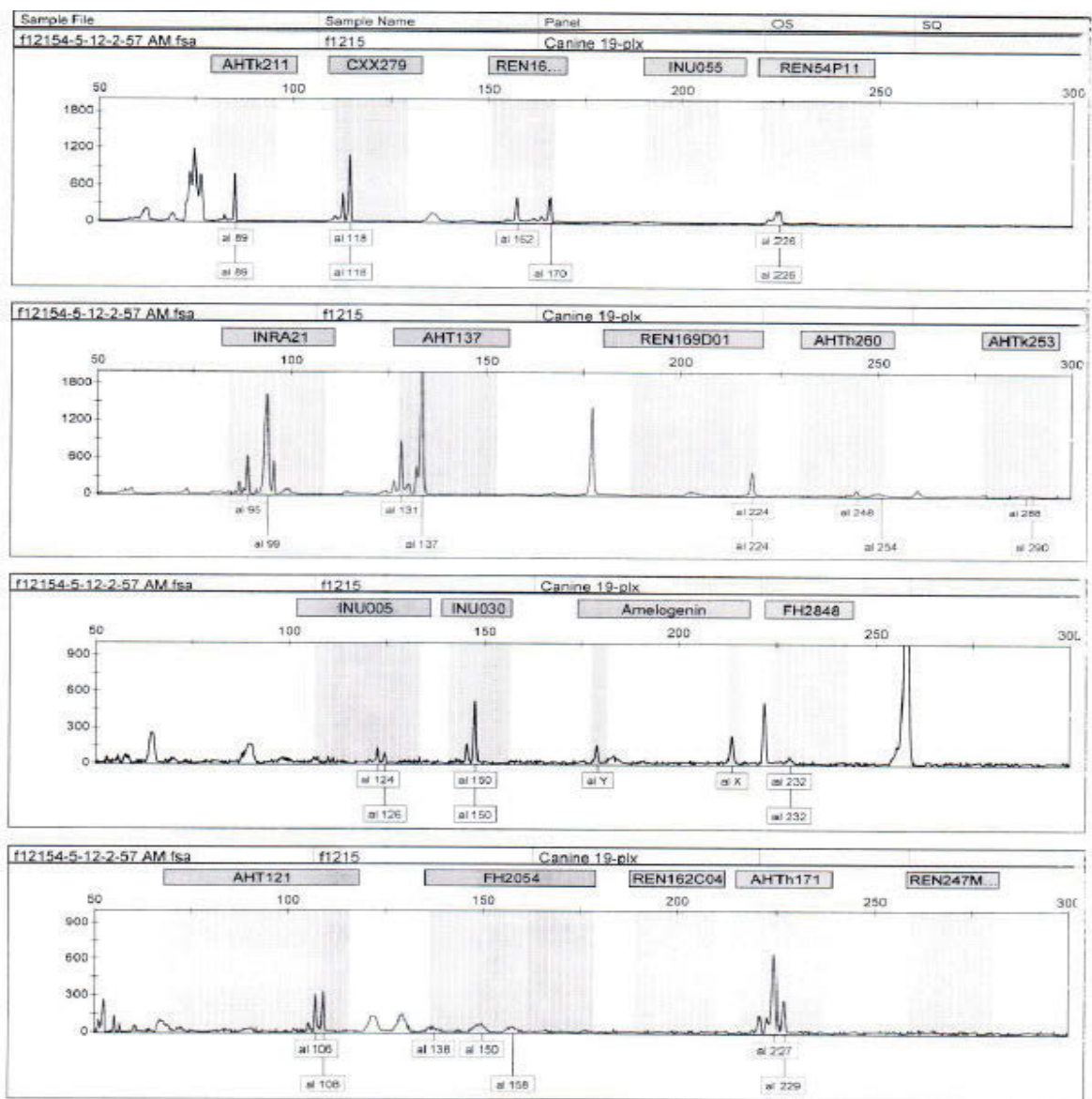
Pri določitvi profila STR na vzorcih iz štirih kadavrov smo na enem vzorcu izolirali DNA psa, kateremu smo določili profil 11 lokusov STR. Gen za amelogenin v tem vzorcu je imel profil, značilen za kromosom X in kromosom Y.

Razprava

Za preverjanje starševstva psov uporabljamo v našem laboratoriju reagent Canine Genotypes Panel 1.1 proizvajalca Finnzymes Diagnostics, ki omogoča določitev 18 lokusov STR in gena za amelogenin za določitev spola (5). Ker imamo že nekaj podatkov o profilih STR pri psih, smo želeli ugotoviti ali je metoda uporabna tudi za določanje profila STR v sledih. Za proučevanje DNA sledi psov v forenziki se pogosto uporabljajo reagenti StockMarks Dog Genotyping Kit (Applied Biosystems) (2) in reagenti Canine Genotypes, Panel 2.1 (Finnzymes Diagnostics) (3).

V našem primeru smo dobili vzorce v laboratorij pet dni po napadu. Predvidevali smo, da zlepljena dlaka okoli rane vsebuje biološki material ovce in sledi sline napadalca, zato smo iz teh zlepljenih dlak izolirali DNA. V enem primeru od štirih nam je uspelo določiti profil STR, značilen za osebek iz družine psov, ki bi lahko pripadal napadalcu. Profil gena za amelogenin, s katerim določamo spol osebka, je bil značilen za moški spol, vendar zaradi visoke ohranjenosti nekaterih odsekov tega gena pri različnih živalskih vrstah, ne moremo izključiti pomnoževanja gena za amelogenin katerega drugega osebka, ki je lahko kontaminiral dlako ovce.

Ovce na pašniku pred napadom niso bile v stiku s psi, vendar so kadavri več dni potovali do laboratorija, zato kontaminacije z biološkim materialom na poti do laboratorija ne moremo izključiti. Potrditev ujemanja dobljenega profila bi bila mogoča ob izolaciji DNA dejanskega osumljenca in primerjavi profilov STR s profili STR na kadavru ovce.



| | | | | | | | | | |
|---------|---------|-----------|---------|----------|-----------|---------|-----------|------------|---------|
| AHTk211 | CXX279 | REN169O18 | INU055 | REN54P11 | INRA21 | AHT137 | REN169D01 | AHTh260 | AHTk253 |
| 89/89 | 118/118 | 162/170 | NP | 226/226 | 95/99 | 131/137 | 224/224 | NP | NP |
| INU005 | INU030 | FH2848 | AHT121 | FH2054 | REN162C04 | AHTh171 | REN247M23 | Amelogenin | |
| 124/126 | 150/150 | NP | 106/108 | NP | NP | 227/229 | NP | X/Y | |

Slika 1: Profili lokusov STR, značilnih za psa, ugotovljeni na DNA, izolirani iz zlepljene dlake na robu rane na glavi ovce

Reference

1. Servick K. Sizing up the evidence. *Science* 2016; 351:1130-2.
2. Kanthaswamy S, Tom BK, Mattila AM, Johnston E, Dayton M, Kinaga J, Erickson BJ, Halverson J, Fantin D, DeNise S, Kou A, Malladi V, Satkoski J, Budowle B, Smith DG, Koskinen MT. Canine population data generated from a multiplex STR kit for use in forensic casework. *J Forensic Sci* 2009; 54: 829-40.
3. Ogden R, Mellanby RJ, Clements D, Gow AG, Powell R, McEwing R. Genetic data from 15 STR loci for forensic individual identification and parentage analyses in UK domestic dogs (*Canis lupus familiaris*). *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6: 63-5.
4. Cotman M, Zabavnik Piano J. Assessment of slovenian dog population by the micro-satellite marker panel consisting from 18 STR loci. In: 9th ISABS Conference on Forensic, Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine. Bol, Island of Brač: International Society for Applied Biological Sciences 2015, 134.
5. Cotman M, Zupanič-Pajnič I, Zabavnik Piano J. Identification of canine DNA from mixed DNA sample in traces. In: 32nd Conference of the International Society for Animal Genetics. Edinburgh: International Society for Animal Genetics 2010, 57.

Detection of suspect attacker DNA on the sheep cadaver

On two successive nights a flock of sheep living in the fenced meadow was attacked by an unidentified attacker(s) and all of thirty-five sheep were killed or badly injured. Deadly injuries were mainly located on the heads of the sheep because of the long protective woollen fleece on the sheep bodies. Four heads of the killed animals were delivered to the laboratory five days after the attack to look for traces of the suspect attacker. Traces of saliva were looked for specially at the edges of the lacerations. From the samples of the glued hair near the lacerations on sheep heads DNA was isolated using QIAamp DNA Investigator kit from Qiagen. Canine specific short tandem repeats (STRs) were amplified in the PCR reaction using the kit Canine Genotypes, Panel 1.1 (Finnzymes Diagnostics) that is designed for canine genotyping, identification, parentage testing and breed testing. Separation and visualisation of the obtained fluorescently labelled PCR products was performed by capillary electrophoresis on the ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). In one sample the DNA profile on 11 STR loci was determined. The obtained STR profile could belong to the suspect attacker on the flock from the canidae family.

Key words: animal forensics; attack; DNA profiling; short tandem repeats