

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

Kutya eredetű anyagmaradványok igazságügyi genetikai vizsgálata

PhD értekezés

Készítette:
Pádár Zsolt

2006

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Prof. Dr. Zöldág László CSc
SZIE, Állatorvos-tudományi Kar Budapest
Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet,
Állattenyésztési és Genetikai Osztály
témavezető

.....
Prof. Dr. Fekete Sándor MTA Doktor
SZIE, Állatorvos-tudományi Kar Budapest
Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet,
Laborállat-tudományi Osztály
témabizottsági tag

.....
Doc. Dr. habil. Veresegyházy Tamás CSc
SZIE, Állatorvos-tudományi Kar Budapest
Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály
témabizottsági tag

.....
Pádár Zsolt

1.	BEVEZETÉS.....	4
2.	CÉLKITŰZÉS.....	4
2.1.	A faj azonosítása	4
2.2.	<i>Canine</i> specifikus STR markerek vizsgálata magyarországi populációban.....	4
2.2.1.	Minták és markerek.....	5
2.2.2.	A detektált tulajdonságok azonosítása, elnevezése, a lókuszek jellemzése.....	5
2.2.3.	Alléllétrák készítése, a méretstandard kiválasztása.....	5
2.2.4.	A félautomata kiértékelés.....	5
2.3.	Populáció-statisztikai értékelés.....	5
2.3.1.	Allélgyakoriságok meghatározása.....	5
2.3.2.	Hardy–Weinberg és <i>linkage</i> egyensúly tesztelése.....	5
2.3.3.	A genetikai strukturáltság megállapítása.....	5
2.4.	Mintatípusok és a DNS extrakció vizsgálata.....	5
2.5.	A PCR reakció érzékenyítése, <i>monoplex screening</i>	5
2.6.	Eseti alkalmazás.....	5
3.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	5
3.1.	Minták és populációk.....	5
3.2.	A DNS kinyerése.....	6
3.3.	A vizsgálandó szakaszok felszorzozása.....	6
3.4.	A <i>cytochrome b</i> génszakasz szekvencia analízise.....	6
3.5.	Az STR fragmensek genotipizálása.....	6
3.5.1.	Alléllétrák készítése.....	6
3.5.2.	Az allélméret meghatározási pontosságának összehasonlítása.....	6
3.5.3.	A tipizáló szoftver átalakítása.....	6
3.6.	Populáció- és genetikai-statisztikai analízisek.....	7
3.7.	Vizsgálatok az eseti alkalmazás szempontjából.....	7
4.	ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK (TÉZISEK).....	7
4.1.	Azonosítás – a faj azonosítása.....	7
4.1.1.	Egyértelmű szekvenciák.....	7
4.1.2.	Szekvenciális eltérés detektálása.....	7
4.1.3.	Új szekvencia detektálása.....	7
4.1.4.	A fajta megállapításának lehetősége.....	8
4.2.	Individualizáció – az STR polimorfizmusok vizsgálata.....	8
4.2.1.	A PEZ20 lókuszek repetíciós szerkezetének leírása.....	8
4.2.2.	Az STR lókuszek repetíciós szerkezetének tisztázása.....	8
4.2.3.	Egységes nevezéktan kialakítása.....	8
4.2.4.	Alléllétrák összeállítása.....	8
4.2.5.	Allélgyakorisági adatok, populációgenetikai felmérések.....	8
4.2.6.	Monoplex szűrővizsgálatok lehetőségének megteremtése.....	9
4.2.7.	Fajidegen DNS PCR erősítő hatásának igazolása.....	9
4.2.8.	Szomatikus mutáció lehetőségének bemutatása.....	9
4.2.9.	Azonos genetikai profil előfordulása különböző egyedeknél.....	9
4.2.10.	Igazságügyi genetikai szakvélemények készítése.....	9
5.	KÖVETKEZTETÉSEK.....	9
5.1.	A faji eredet meghatározása.....	9
5.2.	Az egyed azonosságának megállapítása.....	10
5.3.	Törvényszéki alkalmazás.....	11
6.	PUBLIKÁCIÓK.....	13

1. BEVEZETÉS

A DNS alapú azonosítással foglalkozó igazságügyi genetika – a korábban a genetika határterületeként elkönyvelt klinikai genetikához vagy pharmacogenetikához hasonlóan – napjainkban önálló tudományágként funkcionál. Kihívásai, probléma felvetései, módszertani és technikai fejlesztései valamint eredményei nemcsak passzív felhasználóként, hanem aktív közreműködőként kapcsolják a genetikához és a jogalkalmazáshoz egyaránt, ugyanakkor nem tekinthető a két alkotórész egyszerű összegződésének. Az igazságügyi genetika önálló tudományterületként használja fel a genetika – pl. molekuláris genetika – módszereit, tudományos eredményeit. Kutatásai azonban a genetika más területére vonatkozó információkat – pl. polimorfizmusok molekuláris struktúrája, új szekvencia adatok, populációgenetikai értékek, jellemzők, stb. – is szolgáltathatnak, melyek ugyanakkor önmagukban nem az igazságügyi genetika célját jelentik. Törvényszéki aspektusból a természettudomány – genetika – csak eszköz, melynek segítségével a kriminalisztikai hipotézisek megerősíthetők avagy elvethetők, de az igazságszolgáltatás részévé válva a bűncselekmények felderítésének és bizonyításának lehetősége számos vonatkozásában kiszélesíthető. A helyszíni biológiai anyagmaradványok faji-, egyedi eredetének meghatározása, helyszínen-helyszínen kapcsolatának vizsgálata, ismeretlen egyedazonosságú holttestek, maradványok azonosítása, leszármazási viszonyok elemzése mellett polgári jogi – szülőségi – és történelmi, kegyeleti – tömegsír – vizsgálatok céljára is felhasználható. A lehetőségeket a nem emberi eredetű anyagok azonosítására vonatkozóan kiterjesztve a társadalom bűnmegelőzési stratégiáját méginkább segítő, bűnözéssel szembeni visszatartó erő indukálható.

A humán mikroszatellita markerek használata a törvényszéki gyakorlatban jelenleg általánosnak mondható, ugyanakkor az előforduló, közvetve illetve közvetlenül állatfajok azonosítását, egyedazonosságának megállapítását érintő igazságügyi genetikai szakkérdésekben a megkövetelt nemzetközi ajánlások kialakítása csak a közelmúltban kezdődött meg.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkám alapvető célja az volt, hogy a *Canis familiaris* példáján keresztül elindítsam azt a folyamatot, melynek segítségével a nem emberi eredetű biológiai anyagok individualizálása a törvényszéki genetika részévé válhat.

2.1. A faj azonosítása

Az ismeretlen eredetű minták *Canidae sp.* eredetének meghatározása a homológ *cytochrome b* gén meghatározott szakaszának szekvencia analízisével.

2.2. *Canine* specifikus STR markerek vizsgálata magyarországi populációban

Származásellenőrzés céljára már alkalmazott, de igazságügyi referenciával nem rendelkező lókuszok polimorfizmusának a törvényszéki alkalmazáshoz nélkülözhetetlen felmérése a populációban.

2.2.1. Minták és markerek

Több fajta genetikailag független egyedeitől származó, igazságügyi szempontból számításba vehető mintatípusának – pl. vérminta, nyálminta, szőrminta, ondóminta – vizsgálata 10 lókuszon.

2.2.2. A detektált tulajdonságok azonosítása, elnevezése, a lókuszek jellemzése

A genotípus pontos definiálása a repeat-struktúra alapján, a pontos allélmeghatározás esetleges problémáinak felmérése.

2.2.3. Alléllétrák készítése, a méretstandard kiválasztása

Az esetlegesen komplex motívumokat is tartalmazó allélok pontos meghatározása referencia-allélok és alternatív belső méretstandardok segítségével.

2.2.4. A félautomata kiértékelés

A detektált genetikai profilok kiértékelését segítő számítógépes alkalmazás adaptálása.

2.3. Populáció-statisztikai értékelés

Az igazságügyi hitelesítés, a statisztikai interpretáció – az egyediség mértékének pontosabb kalkulációja – lehetőségének megteremtése céljából végzett populációs felmérések elvégzése, az allélgyakorisági értékek meghatározása, a fajták és a populációk összehasonlítása.

2.3.1. Allélgyakoriságok meghatározása

2.3.2. Hardy–Weinberg és *linkage* egyensúly tesztelése

2.3.3. A genetikai strukturáltság megállapítása

2.4. Mintatípusok és a DNS extrakció vizsgálata

A kriminalisztikai szempontból jelentős, kutyától származó különféle biológiai anyagmaradvány DNS extrakciójának tesztelése.

2.5. A PCR reakció érzékenyítése, *monoplex screening*

Kevert faji eredetű – kutya/ember – minták vizsgálatánál is sikeresen alkalmazható érzékeny monoplex PCR reakciót kidolgozása.

2.6. Eseti alkalmazás

A szakértői segítség lehetőségének kiszélesítése a törvényszéki eljárások során, a módszer biztosította előnyök tenyésztésben – pl. alomellenőrzés – történő hasznosítása.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Minták és populációk

Populációs vizsgálatok céljára 673 – 79 azonosítható fajtába vagy fajtaváltozatba sorolható – egyed mintája került felhasználásra. Az extrakciós tesztelések során a vérminták mellett nyálminták, szőrminták, fagyasztott spermaminták és fagyasztott izomszövet minták vizsgálata történt meg. A *cytochrome b* vizsgálatokhoz vér és szőrszálak, a fajták közötti esetleges

szekvenciális különbségek vizsgálatához német juhász és rottweiler fajták 22-22 egyedének vérmintájából extrahált DNS szolgált. Származás ellenőrző vizsgálatokhoz vér- és szőrmintákat biztosítottunk, az igazságügyi célú vizsgálatok eseti mintákból – vér-, nyál-, szőrminta, vérrel keveredett nyálszennyeződés, biológiai szövetmaradványok – történtek.

3.2. A DNS kinyerése

A DNS feltárása homogén mintákból – folyékony vér, nyál, szőr, stb. – a nukleáris és mitokondriális vizsgálatokhoz standard protokoll szerint, a vérrel keveredett nyálszennyeződések extrakciója módosított differenciált lízissel (Pádár és mtsai, 1999), a szemikvantitatív mennyiségi meghatározás etidium-bromid fluorofór festés és agaróz gélelektroforézis alkalmazásával történt.

3.3. A vizsgálandó szakaszok felsokszorozása

A tíz autoszómás STR multiplex amplifikálása StockMarks[®] Canine I Ver 3 kittel standard protokoll, a *cytochrome b* génszakasz amplifikálása három primer-pár és három PCR protokoll variálásával történt. Az amplifikálás hatékonyságának ellenőrzése, és a fragmensek szeparálása poliakrilamid gélelektroforézis ezüsfestéses detektálásával történt.

3.4. A *cytochrome b* génszakasz szekvencia analízise

A sokszorozott fragmensek tisztítása során nyert termékek szekvenálása standard protokoll szerint történt, a szekvenciák szerkesztése és illesztése során kapott eredményeket az Interneten elérhető génbank szekvenciákhoz hasonlítottam.

3.5. Az STR fragmensek genotipizálása

Az STR lókuszok PCR-fragmenseinek analízise szelektált belső standard és hitelesített allélok segítségével történt.

3.5.1. Alléllétrák készítése

A multiplex vizsgálatok után a szelektált fragmensek monoplex felsokszorozással, izolálással valamint klónozással nyert termékeit szekvencia vizsgálatokkal kell verifikálni, majd az összeállított allél-keverékeket – alléllétrákat – az azonosított genotípusú egyedek DNS-mintáiból koamplifikálással és reamplifikálással lehet előállítani. A szekvenciális adatok alapján az ismétlődő egységek számán alapuló allélszignálást kell kialakítani.

3.5.2. Az allélméret meghatározási pontosságának összehasonlítása

A méretmeghatározás pontosságának tesztelése fluoreszcens méretstandardokkal, az alléllétrák egyes alléljaira vonatkozó számított átlagméretek és szórás értékek elemzésével történt.

3.5.3. A tipizáló szoftver átalakítása

A méretmeghatározás adataira támaszkodva az alléltípusok szemiautomata meghatározásához a genotipizáló makrókat az alkalmazott belső méretstandarddal számított átlag-méretek és szórás értékek alapján kell megírni.

3.6. Populáció- és genetikai-statisztikai analízisek

A statisztikai vizsgálatok céljára kialakított hat csoportot populáción belüli – populáció-genetikai alapértékek, egyensúlyi állapotok (HWE, LD) – illetve összehasonlító variancia-elemzéseknek – G, F statisztika, AMOVA – vettem alá.

3.7. Vizsgálatok az eseti alkalmazás szempontjából

Az eseti alkalmazhatóságot eltérő illetve kevert mintatípusok, valamint a kimutathatósági érzékenység – különböző PCR kondíciók – szempontjából teszteltem. Az eltérő faji eredetű anyagmaradványok szimulációjához a *cytochrome b* génszakasz és a szűrővizsgálatra alkalmas rövid STR lókuszok esetében humán illetve kutya DNS keverékeit alkalmaztam, valamint valós eseteket vizsgáltam (Pádár, 2001, 2002, 2003).

4. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK (TÉZISEK)

4.1. Azonosítás – a faj azonosítása

Munkámat megelőzően az ismeretlen faji eredetű biológiai minták törvényszéki azonosításához a *cytochrome b* gén fajok között leginkább szekvenciális eléréseket mutató, jól körülhatárolható szakaszát használták fel, viszonylag konzervatív szekvencia-intervallumra – humán homológ szakaszra – illesztett primer párok alkalmazásával. A tisztán detektált pozicionális különbségek a GenBank adatbázisban található homológiák segítségével nagyrészt lehetővé teszik a taxon meghatározását, azonban a primer kötődési helyen – a relatív állandóság ellenére – előforduló nukleotid inkomplementaritások sokszor – többek között a Canidae esetében – zavaros, kevert, értékelhetetlen elektroferogrammmokkal járnak együtt.

4.1.1. Egyértelmű szekvenciák

Az általunk tervezett degenerált primerek és alkalmazott PCR kondíciók használatával a detektálási ambivalenciák – más fajoknál, pl. Cervidae is – megszüntethetők, az azonosítás konfirmálási biztonsággal megtörténhet.

4.1.2. Szekvenciális eltérés detektálása

A jellemző szakaszon belül egyetlen pozícióban nukleotid szubsztitúció is megfigyelhető, melynek okát – egyedi mutáció, esetleges SNP – további vizsgálatok tisztázhatják.

4.1.3. Új szekvencia detektálása

A korábbi referenciával rendelkező primerek módosított PCR körülmények közepette nukleáris genomban lokalizált, pszeudogénként definiálható *cytochrome b* analóg szakaszokat eredményeztek, melyek heteronukleotid pozíciói több kópiás, multiplikálódott előfordulást támasztanak alá. Az új szekvenciát DQ309764 katalógusszámon regisztráltam a GenBank-ban.

4.1.4. A fajta megállapításának lehetősége

Az új szekvenciális elem vizsgálata egyes fajták – német juhászkutya/rottweiler – közötti különbségeket tártak fel, így jelenleg az sem zárható ki, hogy ezek a csak sejtmagi DNS-ből amplifikálható szakaszok fajta-jellegzetességet hordozhatnak, de ezt kiegészítő vizsgálatoknak kell megerősíteniük.

4.2. Individualizáció – az STR polimorfizmusok vizsgálata

Doktori munkám megkezdése előtt a vizsgált STR markerek a PEZ20 lókuszt kivételével tetramer ismétlődésként – FHC2010, FHC2054, FHC2079, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8, PEZ12 – valamint dimer ismétlődésként – PEZ1 – részben leírásra, illetve – kereskedelmi standardizálással rendelkező reagens kitként – forgalmazásba kerültek, mindezek azonban az igazságügyi célú alkalmazást lehetővé tevő alapvető követelményeket nem biztosították. Nem állt rendelkezésre egyértelmű, szerkezet alapú nevezéktan, az allélméret meghatározás mellett az allélok azonosításához szükséges referencia allélok, allélgyakorisági adatok nem voltak hozzáférhetők, az eseti jellegzetességekre vonatkozó technikai, módszertani ismeretek és tapasztalatok meglehetősen hiányosak voltak.

4.2.1. A PEZ20 lókuszt repetíciós szerkezetének leírása

A szekvencia analízisnek köszönhetően a lókuszt alléljainak molekuláris szerkezete ismertté vált (Pádár, 2002).

4.2.2. Az STR lókusztok repetíciós szerkezetének tisztázása

A vizsgálatok alapján a polimorfizmusok molekuláris szerkezete illetve a PEZ1 és PEZ3 lókusztok korábbi referenciáktól eltérő motívum-hossza tisztázhatóvá vált. A nem publikált típus-szekvenciákat a GenBank-ban AF454051, AF454052 (PEZ20), AY375154 (PEZ8), AY375155 (PEZ5), AY375153, AY375156 (PEZ6), AY536266 (PEZ3), AY672136 (PEZ1), AY758357, AY758358 (PEZ12) katalógusszámon regisztráltam.

4.2.3. Egységes nevezéktan kialakítása

Az allélek azonosítása céljából a repetíciós struktúra és a megfigyelt variánsok ismeretében egységes nevezéktant alakítottam ki, amely nemzetközi felhasználatra is alkalmas.

4.2.4. Alléllétrák összeállítása

A hitelesített referencia fragmensekből allélok előállítására nyílt lehetőség, melyek méretezési pontosságának tesztelése és szemiautomata tipizálása a markerek polimorfizmusának felmérését a magyarországi kutyapopulációban lehetővé teszi.

4.2.5. Allélgyakorisági adatok, populációgenetikai felmérések

Magyarországon elsőként az STR allélok megfigyelt gyakoriságából kiindulva populáció genetikai analíziseket végeztem. Habár a vizsgált állományok mintavételi

elégtelenségek okán nem feltétlenül reprezentatívak, az mindenképpen kijelenthető, hogy fajták illetve fajtacsoportok között szignifikáns genetikai különbségek fixálódhattak, statisztikai szempontból egymásnak megfeleltethető fajták, csoportok kialakulása nem valószínűsíthető.

4.2.6. Monoplex szűrővizsgálatok lehetőségének megteremtése

Nagyszámú bűnjelminta esetenkénti szűrővizsgálata a markerek monoplex formában történő felsokszorozásának érzékenyítésével és optimalizálásával sikeresen kivitelezhető.

4.2.7. Fajidegen DNS PCR erősítő hatásának igazolása

A kevert faji eredetű minták tesztelése a kutyák cytochrome b alapú azonosításának korlátozottsága és ambivalenciája mellett a fajidegen DNS nukleáris STR amplifikációra gyakorolt erősítő hatását igazolta.

4.2.8. Szomatikus mutáció lehetőségének bemutatása

A kriminalisztikai szempontból a szőrminták genetikai profiljának meghatározása során nem hagyható figyelmen kívül egyedi mutációs események bekövetkezése sem (Pádár, 2002).

4.2.9. Azonos genetikai profil előfordulása különböző egyedeknél

Alomellenőrzés során szülő-kölyök vonatkozásában detektált – tíz lókuszra kiterjedő, nagymértékben homozigóta – azonos genetikai profilok bizonyos állományokban illetve tenyészcsoportokban az átlagosnál nagyobb mértékű beltenyésztést valószínűsítene, ami a közeli rokonok – esetlegesen kan és kölyke – egyedek megkülönböztetését az alkalmazott lókusz készlettel nem teszi lehetővé.

4.2.10. Igazságügyi genetikai szakvélemények készítése

A PhD munka eredményeit felhasználva elsőként nyílt lehetőség Magyarországon a kutyákat érintő bűncselekmények (Pádár, 2001, Pádár, 2002) valamint származásellenőrzés (Pádár, 2001) DNS alapú vizsgálatokkal alátámasztott szakértői véleményezésére, melyek tapasztalata külföldi bíróságok hasonló eseteinek tisztázásához is hozzájárult.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. A faji eredet meghatározása

Az igazságügyi gyakorlatban a *cytochrome b* gén viszonylag konzervatív szekvencia-intervallumára illesztett primer párok a módosítások ellenére is emberi *cytochrome b* komplementaritással rendelkeznek, ugyanakkor a kutyák esetében a *forward* és a *reverse* primerek is több pozícióban deviálnak. Az általunk tervezett degenerált primer szekvenciák ezeket az eltéréseket mindkét primer esetében jelentősen redukálják. Az inkomplementaritásból fakadó anellációs elégtelenségek csökkentésének, kiküszöbölésének köszönhetően a degenerált primerekkel egyértelmű, verifikálásra alkalmas szekvenciák nyerhetők, melyek a génbankban kutya

cytochrome b gén homológiával, mitokondriális genomként azonosíthatók és esetlegesen polimorf – SNP – pozícióval bírnak.

Habár a konzervatív primerekkel és módosított PCR körülményekkel kapott szekvenciák homológiája is a *Canidae* taxon vonatkozásában a legnagyobb, tisztán mitokondriális genomból – szőrszálak száli része – nem vizsgálhatók. Fentiek alapján ezen szakaszok a nukleáris genom részét képezik, ami inszercióval – transzpozíciós elemként – a genom számos helyére, esetleg polimorf jellegként fixálódva multiplikálódhat. A többkópiás előfordulás valószínűségét támasztják alá az azonos pozícióban együttesen detektálható különböző nukleotid-pozíciók, melyek bizonyos mértékben fajtaspecifikus jelleggel is rendelkezhetnek. Az eredmények alapján nem zárható ki, hogy a mitokondriális *cytochrome b* gén konzervatív jellegének gyengülése valamint multiplikálódása a nukleáris genomban fajta- vagy fajtacsoport kizárására, esetleges valószínűsítésére alkalmas kiegészítő információt is szolgáltat, azonban a feltételezés megerősítéséhez további vizsgálatokra van szükség.

5.2. Az egyed azonosságának megállapítása

Az igazságügyi célra alkalmazott polimorf STR markereknek speciális kritériumoknak is meg kell felelniük. Jól definiáltaknak, egyértelműen és reprodukálhatóan meghatározhatóaknak, azonosíthatóknak kell lenniük. Magas fokú polimorfizmussal rendelkezzenek, genetikai kapcsoltság nélkül. Vizsgálati módszereik technikai szempontból érzékenyek és standardizálhatók legyenek, az eredmények interpretálását populáció genetikai elemzésekkel kell alátámasztani.

A vizsgált STR lókuszok repetíciós szerkezetük alapján három csoportba sorolhatók. A trimer PEZ3 lókusz kivételével az összes lókuszt tetramer ismétlődések strukturálják. Köztes allélok manifestációja részben a flanking régiók deléciós és addíciós mutációjának részben a flanking- és repetitív régiókban együttesen megnyilvánuló deléciós, inszerció változatoknak köszönhető, mely legnagyobb számban a PEZ6 lókuszon figyelhető meg. Azonos hossz mellett megnyilvánuló szekvenciális változékonyság a határoló illetve az ismétlődő régióban egyaránt előfordul. A szekvenciák alapján egyértelmű, a szakmai ajánlásoknak megfelelő laboratóriumok közötti adatcserére és összehasonlításra alkalmas allél-nevezéktan alakítható ki, ami nemzetközi törvényszéki alkalmazásra javasolható.

A StockMarks® Canine I Ver 3 kit alapvetően alomellenőrzési került kereskedelmi forgalomba. A 20 db primer keveréke nem tökéletesen optimalizált az annealing hőmérsékletre, a sokszorozási egyenetlenségek allél- és lókusz kieséssel, termék-kiegyensúlyozatlansággal járnak, melyek a tipikus preferenciális amplifikálódástól eltérően nem korrelálnak a fragmensmérettel. A nem adekvát primer kötődés nem allélikus eredetű fragmensek megjelenéséhez vezethet. A nem tökéletes adenilálódás miatti kettős detektálási csúcsok egy bázispárnyi különbséggel rendelkező interallélok megkülönböztetését rendkívül megnehezíthetik, akár téves genotipizáláshoz is

vezethetnek. Monoplex formában a lókuszek megfelelően beállított reakciómix használatával touchdown jelleg nélkül, lényegesen kevesebb kiindulási DNS szükséglettel és alacsonyabb ciklusszámmal is sikeresen sokszorozhatók. A fragmensek méretmeghatározása során az abszolút hosszakhoz viszonyított mérethűség leginkább GS400HD illetve GS500 méretstandardokat jellemezte, ugyanakkor a relatív méretek szórása szignifikáns módon az ILS600 standard alkalmazásával adódott legkisebbnek, használatával a köztes allélok is biztonságosan tipizálhatók.

A markerek közül leginkább polimorfnek a PEZ6 lókuszbizonyult. Ez feltehetően szerkezetbeli komplexitásának, nagyszámú intermedier alléljának is köszönhető, ugyanakkor valószínűsíthető, hogy az intermedier allélok megjelenése a polimorfizmus fokát általánosságban nem számottevően befolyásolja, annak mértékében megnyilvánuló eltérések sokkal inkább a szaporodás-közösségekben végbemenő genetikai drift illetve fixálódás következményeképp jönnek létre. Az allélgyakorisági értékek megoszlási adatai a befolyásolt, irányított szaporodásközösségek sajátosságait, egymással szemben fennálló különbségeit támasztják alá. A populációk deviálása az egyensúlyi állapottól esetenként csak összetett oksági összefüggésekkel magyarázható, melyek pontos tisztázásához a fajták hiteles pedigrével rendelkező, nagyobb számú mintacsoportjának vizsgálata szükséges. A populációs minták genetikai strukturáltsága, varianciája fenotípusos és molekuláris szinten egyaránt jól definiált heterogenitással jellemezhető, a panmixis ellenében ható irányított és korlátozott szaporodás a megnövekedett homozigóta aránnyal rendelkező beltenyészetek kialakulását segíti elő. A különbségek nemcsak a fajták között, hanem esetlegesen azonos fajták szubpopulációi, tenyészvonalai között is kifejeződnek, így azok egymásnak való statisztikai megfeleltetése, helyettesítése nem célravezető. Kizárólagos fajta-jellegzetességet marker szinten az eddigi vizsgálatok nem tártak fel. A jogalkalmazói szempontok hatékonyabb érvényesülése valamint a hiteles tenyésztői érdekek egyaránt a tenyésztői szervezetekkel kollaboráló, további populációs vizsgálatok igényét támasztják alá.

5.3. Törvényszéki alkalmazás

Az állati polimorfizmusok alapvetően származásellenőrzési céllal végzett molekuláris genetikai vizsgálatát jelenleg gyakran saját fejlesztésű marker-készlet, analitikai- és viszonyítási körülmények, azonosító kódok, elnevezés, és adatbázis jellemzi. Az egyedi vizsgálórendszerek összevethetlenségük mellett az ellenőrizhetőség hiányát is magukban foglalják. A törvényszéki igényekhez adaptált megfelelést jóval szigorúbb elvárások szabályozzák.

A kereskedelmi forgalomból nem beszerezhető alléllétrák kifejlesztése és hitelesítése jelentős ráfordításokat igényel, de segítségükkel megbízható allél meghatározás érhető el. A profil-egyezési valószínűség mértéke az adott populáció sajátosságaitól függhet, így a statisztikai kiértékelést az allélgyakorisági adatbázisok alapvetően befolyásolják. Kriminálisztikai tapasztalatoknak megfelelően a valószínűségi értékek kalkulációja során a genetikai korreláció

hatását kifejező közös leszármazási együttható valamint a nem véletlenszerű párválasztást reprezentáló populáción belüli beltenyésztési együttható alkalmazása egyaránt megkövetelt. A beltenyésztettség az egyenes ági leszármazás során a viszonylag magas kombinált megkülönböztetési erő ellenére azonos DNS-profilokat eredményezhet. A közeli rokonságból illetve leszármazásból fakadó hatások felerősödése a fajta vonatkozásában nemcsak a megkülönböztetési erő törvényszéki interpretálását módosítja, hanem – a tenyésztői kennelek genetikai adatbázisának, profil-nyilvántartásának hiányában – inkorrekt, esetleg valótlan származás-igazolást tesz lehetővé. Mivel a csekély mennyiségű, heterogén mintákból nyerhető DNS-célszakaszok kutya-specifikus kvantálására alkalmas teszt jelenleg nem áll rendelkezésre, a fajspecifikus STR lókuszok érzékeny de alacsony PCR-műtermék kockázattal járó monoplex amplifikálása a törvényszéki esetekben legalább részleges genetikai profil kimutatására, statisztikai mintavétel esetén szűrővizsgálatokra alkalmas. A változó eseti mintatípusokból sikeres profilmeghatározás végezhető, melyet természetesen a nyomképződés, az anyagtranszfer és a mintavétel jelentősen befolyásolhat.

A kutya eredetű biológiai anyagmaradványokkal kapcsolatban, a fentiekben leírt eredményeknek és következtetéseknek megfelelően törvényszéki és tenyésztési célra megalapozott szakértői vélemények adhatók. A faj azonosítására konfirmáló vélemény-kategória alkalmazható, de a potenciális keveredés illetve szennyezés körültekintő mérlegelést tesz szükségessé. Az egyed azonosságát valószínűsítő kategóriákban lehet deklarálni, de a technikai megvalósítás során a hitelesített alléllétrák nélkül történő genotipizálás nagy kockázati tényezőt jelent az eredmények helytálló véleményi konkludálásában. A reprezentatív populációgenetikai adatbázisok hiányában korrekt, numerikus, származási- valamint leszármazási valószínűsítés nem adható, korrekciós faktorok nem építhetők be. A magyarországi kutyapopuláció nagymértékben feltételezhető heterogenitása miatt egymással analóg, a statisztikai tesztelésnél egymást helyettesítő referencia adatok felhasználhatóságát az eddigi vizsgálatok nem támasztják alá, a helyi fajta-állományokra és tenyésztői vonalakra extrapolálható allélgyakorisági értékek csak tenyésztői szervezetek közreműködésével biztosíthatók. A megbízható állományfelmérések nemcsak az egyed azonosságának kriminalisztikai célú megállapításához, hanem a professzionális tenyésztők, klubok kutyáinak regisztrált leszármazásához, genetikailag determinált betegségének kiszűréséhez is nagyban hozzájárulhatnak.

6. PUBLIKÁCIÓK

- Budowle, B., Woller, J., Koons, B.W., Füredi, S., Errera, JD., Pádár, Zs. (1996) Hungarian population data on seven PCR-based loci. *J Forensic Sci* 41:667-70
- Egyed, B., Füredi, S., Angyal, M., Boutrand, L., Vandenberghe, A., Woller, J., Pádár, Zs. (2000) Analysis of eight STR loci in two Hungarian populations. *Int J Legal Med* 113:272-75
- Egyed, B., Füredi, S., Angyal, M., Boutrand, L., Vandenberghe, A., Woller, J., Pádár, Zs. (2000) Analysis of eight STR loci in two Hungarian populations. *Forensic Sci Int* 113:25-27
- Egyed, B., Csikai, M., Füredi, S., Pádár, Zs. (2005) Population genetic data on the STR loci D2S1338, D19S433 and SE33 in Hungary. *J Forensic Sci* 50:720-21.
- Egyed, B., Füredi, S., Pádár, Zs. (2005) Population genetic study in two Transylvanian populations using forensically informative autosomal and Y-chromosomal STR markers. *Forensic Sci Int* Doi: 10.1016/j.forsciint.2005.10.020
- Egyed, B., Füredi, S., Angyal, M., Balogh, I., Kalmár, L., Pádár, Zs. (2006) Analysis of the population heterogeneity in Hungary using fifteen forensically informative STR markers. *Forensic Sci Int* 158(2-3):244-9.
- Füredi, S., Woller, J., Pádár, Zs. (1995) Hungarian population data for the STR systems TH01 and VWA. *Int J Legal Med* 108:48-49
- Füredi, S., Budowle, B., Woller, J., Pádár, Zs. (1996) Hungarian population data on six STR loci - HumVWFA31, HumTH01, HumCSF1PO, HumFES/FPS, HumTPOX, and Hum HPRTB - derived using multiplex PCR amplification and manual typing. *Int J Legal Med* 109: 100-01
- Füredi, S., Woller, J., Pádár, Zs. (1997) A population study of the STR loci HumLPL, HumF13B and HumF13A01 in Hungary. *Int J Legal Med* 110:107-08
- Füredi, S., Angyal, M., Kozma, Zs., Sétáló, J., Woller, J., Pádár, Zs. (1997) Semi-automatic DNA profiling in a Hungarian Romany population using the STR loci HumVWFA31, HumTH01, HumTPOX and HumCSF1PO. *Int J Legal Med* 110:184-87
- Füredi, S., Kozma, Zs., Woller, J., Pádár, Zs., Angyal, M., Bajnóczki, I., Nishi, K. (1998) Population genetic data on four STR loci in a Hungarian Romany population. *Int J Legal Med* 112:72-74
- Füredi, S., Angyal, M., Woller, J., Pádár, Zs. (1999) Y-STR haplotyping in two Hungarian populations. *Int J Legal Med* 113:38-42
- Füredi, S., Egyed, B., Vandenberghe, A., Angyal, M., Woller, J., Pádár Zs. (2000) Population genetic data on 5 autosomal and 8 Y-chromosomal STR loci in 2 Hungarian populations. *Progress in Forensic Genetics* (8) ICS 1193. Elsevier, ISBN 044450303X:151-53

- Pádár, Zs., Füredi, S., Woller, J. (1997) Polimorf DNS lókuszok PCR amplifikációja. Molekuláris Medicina, (Kopper, L., Marcsek, Z., Kovalszky, I. szerk). Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, ISBN 963 242 345 3:112-18
- Pádár, Zs., Barta, A., Egyed, B., Füredi, S., Kemény, G., Woller, J. (2000) Hungarian experience of examination of the fingernails in violent crime. Progress in Forensic Genetics (8) ICS 1193. Elsevier, ISBN 044450303X:492-94
- Pádár, Zs., Füredi, S., Angyal, M. (2001) Kriminálisztikai (DNS-) vizsgálati lehetőségek újszülöttmegőlésekben. Belügyi Szemle (1):69-72.
- Pádár, Zs., Egyed, B., Kontadakis, K., Zöldág, L., Fekete, S. (2001) Resolution of parentage in dogs by examination of microsatellites after death of putative sire. Acta Vet Sci Hung 49(3):269-73
- Pádár, Zs., Angyal, M., Egyed, B., Füredi, S., Woller, J., Zöldág, L., Fekete, S. (2001) Canine microsatellite polymorphism as a resolution of an illegal animal death case in a Hungarian Zoological Garden. Int J Legal Med 115:79-81
- Pádár, Zs., Kontadakis, K., Egyed, B., Füredi, S., Woller, J., Zöldág, L., Fekete, S. (2002) Canine STR analyses in forensic practice – observation of possible mutation of a catagen doghair. Int J Legal Med 116:286-88
- Pádár, Zs., Egyed, B., Kontadakis, K., Füredi, S., Woller, J., Zöldág, L., Fekete S. (2003) Importance of canine identification in the Hungarian forensic practice. Progress in Forensic Genetics (9) ICS 1239. Elsevier, ISBN 0444507175 :897-900
- Pádár, Zs., Zenke, P., Egyed, B., Ósz, K., Kontadakis, K., Zöldág, L., Fekete, S. (2004) STR-analyse bei Hunden – Forensische Anwendung und Erfahrungen. Rechtsmedizin 4:342
- Pádár, Zs., (2004) Kriminálisztikai célú DNS-vizsgálatok Magyarországon. Kriminálisztika (Bócz, E. szerk) BM Duna Kiadó, Budapest, ISBN 963 836 83 4 ö:598-606
- Pádár Zs. (2005) A DNS-vizsgálatok szerepe és szakértői problémái emberölési ügyekben. Belügyi Szemle (1):13-29
- Sótonyi, P., Járny, J., Pádár, Zs., Woller, J., Füredi, S., Gál, T. (1996) Comparative study on reused haemodialysis membranes. Int J Artificial Organs 19:387-92
- Woller, J., Füredi, S., Pádár, Zs. (1995) AMPFLP analysis of the VNTR loci D1S80 and ApoB in Hungary. Int J Legal Med 107:273-74
- Woller, J., Füredi, S., Pádár, Zs. (1996) Hungarian population data for 11 PCR-based polymorphisms. Advances in Forensic Haemogenetics (6) Springer, ISBN 3540604928:647-49
- Woller, J., Budowle, B., Füredi, S., Pádár, Zs. (1996) Hungarian population data on the loci HLA-DQ α , LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and GC. Int J Legal Med 108:280-82

- Woller, J., Füredi, S., Pádár, Zs. (1997) Polimeráz láncreakción alapuló DNS vizsgálatok a magyar igazságügyi gyakorlatban. Orvosi Hetilap 138:3223-28
- Woller, J., Budowle, B., Angyal, M., Füredi, S., Pádár, Zs. (1998) Population data on the loci HLA-DQ α , LDLR, GYPA, HBBG, D7S8, GC and D1S80 in a Hungarian Romany population. Progress in Forensic Genetics (7) ICS 1167. Elsevier, ISBN 0444829652:381-83
- Zöldág, L., Albert, M., Fodor, Zs., Pádár, Zs., Kontadakis, K., Eszes, F. (2001) Az általános vízkór (anasarca) öröklődéskórtani vizsgálata magyarországi angol bulldog fajtájú kutya populációban. Hung Vet Journal (6):335-41