

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI
EGYETEM
ÁLLATTENYÉSZTÉSI,
TAKARMÁNYOZÁSTANI ÉS LABORÁLLAT-
TUDOMÁNYI TANSZÉK

**Vaddisznók (*Sus scrofa*) mitokondriális
haplotípusának igazságügyi célú vizsgálata**

TDK dolgozat

Készítette: Pintér Zita

V. évfolyam, állatorvos hallgató

Témavezető: Dr. Zenke Petra
tudományos munkatárs

Budapest

2018.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	2
1. Bevezetés, irodalmi áttekintés	3
1.1. Hazai vadsertésállomány	3
1.2. Vadgazdálkodás és orvvadászat.....	4
1.3. Igazságügyi genetika és vizsgáló módszerei	5
1.3.1. Igazságügyi állatgenetika.....	5
1.3.2. Molekuláris genetika.....	6
1.3.3. Mitokondriális DNS (mtDNS) vizsgálatok	7
1.3.4. Populációgenetikai vizsgálatok	9
1.4 Nemzetközi Genom Projektek: Sertés Genom Projekt.....	10
1.5. Esettanulmány	11
2. Célkitűzések	12
3. Anyag és Módszer	13
3.1. Populációgenetikai vizsgálatok	13
3.1.1. Mintagyűjtés	13
3.1.2. DNS preparálás és agarózgél elektroforézis	13
3.1.3. PCR amplifikáció	14
3.1.4. PCR termékek tisztítása és szekvenálása	15
3.1.5. Statisztikai számítások a mitokondriális genomszakasz alapján	16
3.2. A mitokondriális kontroll (CR) régió vizsgálata rövid átlapoló primerpárokkal	17
3.3. Eseti minta vizsgálata az új primerek segítségével.....	18
4. Eredmények	19
4.1. Mintagyűjtés és DNS preparálás	19
4.2. PCR amplifikálás és szekvenálási reakció.....	19
4.3. Mitokondriális CR régió vizsgálata rövid, átlapoló primerpárokkal.....	22
4.4. Esettanulmány	22
5. Megbeszélés/Következtetések	23
5.1. Populációgenetikai adatbázis kezdeményezése hazai vadsertésekre	23
5.2. Degradált minták vizsgálata rövid, átlapoló primerpárokkal	24
5.3. A kutatás értékelése, további lehetőségei	25
6. Összefoglalás	26
7. Summary	27
Irodalomjegyzék.....	28
Köszönetnyilvánítás	32

Rövidítések jegyzéke

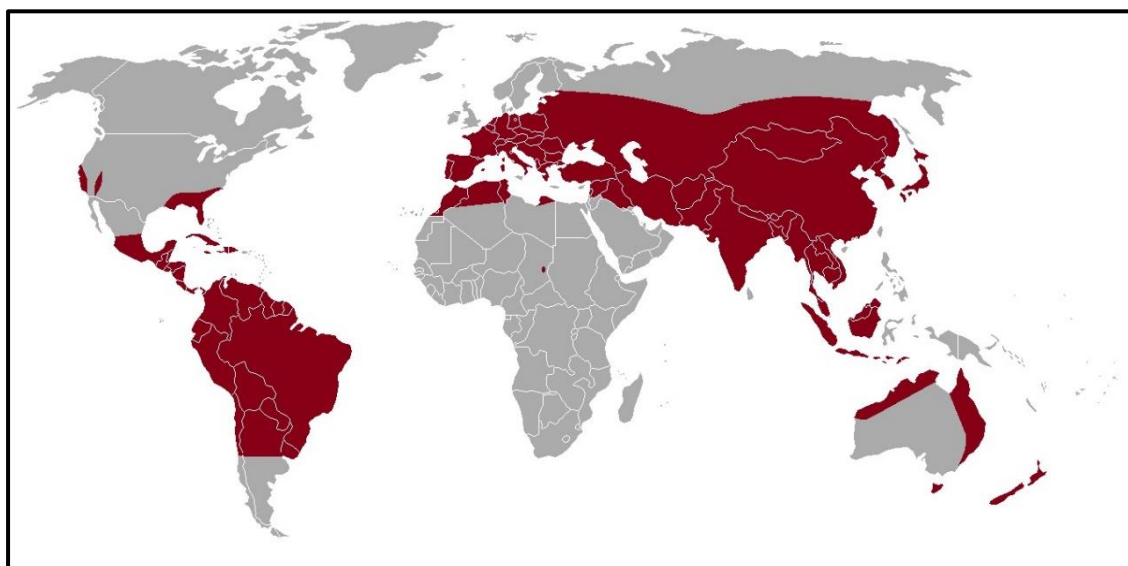
ASP	afrikai sertéspestis
BFK	brómfenolkék
bp	bázispár
BTK	Büntető Törvénykönyv
CO-1	citokróm-oxidáz 1
CR	kontroll
Cytb	citokóm-b
ddNTP	didezoxinukleotidok
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxinukleotidot
H	haplotípus
Hd	haplotípus diverzitás
mA	milliamper
mp	másodperc
mtDNS	mitokondriális dezoxiribonukleinsav
NGS	Next-Generation Sequencing (újgenerációs szekvenálás)
OH	hidroxilcsoport
PCR	Polymerase Chain Reaction (polimeráz-lánreakció)
RNS	ribonukleinsav
SD	standard deviáció
SGSC	Swine Genome Sequencing Consortium
STR/SSR	mikroszatellita
UV	ultraibolya-sugárzás
V	volt
μl	mikroliter
π	nukleotid diverzitás

Nukleotidok rövidítései:

A	adenin
C	citozin
G	guanin
T	timin

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés

A vaddisznó (*Sus scrofa*) szinte az összes kontinensen megtalálható, igen gyors terjedési képességgel rendelkező faj. Előfordulási alakja változatos, jelen lehet, mint őshonos állat, betelepített, vagy visszavadult házisertésekkel is lehet találkozni, illetve fellelhető vadsertések és házi sertések hibridjeként, amik még nagyobb alkalmazkodási képességgel rendelkeznek, így elősegítve rohamos terjedésüket (Groenen, 2016). Eurázsia majdnem minden részén megtalálható, az amerikai kontinensre betelepítés útján került. Elterjedési területének a nagysága miatt számos alfajjal rendelkezik, amiket négy nagyobb csoportba soroltak a külalakjukat és földrajzi elhelyezkedésüket figyelembe véve (Groves and Grubb, 1993). Elterjedésére legnagyobb hatással természetesen az emberek voltak, így az egyik leggyakrabban előforduló emlősök közé tartozik.



1. ábra- A vaddisznó (*Sus scrofa*) elterjedése

1.1. Hazai vadsertésállomány

Magyarország számos részén megtalálhatóak, leginkább az erdős részeket kedvelik. Legnagyobb számban az Északi-középhegységben, a Pilisben és a Dunántúlon fordulnak elő, de egyre gyakoribbak az ország többi részén is. 2017-es adatok alapján a vaddisznók létszáma 102.600 példány volt Magyarországon, melynek akár a 10%-a háztáji állatként lehet jelen (www.ova.info.hu). Mint Európa többi országában, itthon is eddig állománynövekedéssel lehetett számolni, köszönhetően a kiemelkedően jó alkalmazkodási képességüknek és a különböző erdősítési folyamatoknak. Ez a növekedés azonban most megállhat, illetve meg is fordulhat az afrikai sertéspestis (ASP) megjelenésével (www.nak.hu).

1.2. Vadgazdálkodás és orvvadászat

A vadvilág védelme egyre nagyobb figyelmet kap, mivel az emberiség növekedésével és terjeszkedésével egyes állatok élőhelye lecsökken, így veszélyeztetve egyes fajok túlélését (Nguyen et al., 2017), a nagyobb kereslet miatt nő az orvvadászatok száma, illetve egyes betelepített fajták kiszoríthatják a helyi állatokat vagy súlyos betegségeket terjeszthetnek (Fickel and Hohmann, 2006; García et al., 2011), így pusztítást okozva az adott élőhely faunájában és flórájában.

Vadgazdálkodás alatt olyan tevékenységeket értünk, ami folytán a hasznos vadállományt fejleszteni, a kártékonyt pedig csökkenteni szeretnénk. Magyarországon ennek a tevékenységnek működését és a vadászat ma elfogadott szabályait tartalmazza az 1996. évi LV. törvény és a földművelésügyi miniszter 24/2017. (V. 17.) FM rendelete a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadászatról (Magyar Közlöny, 2017. évi 70. szám: www.magyarokozlony.hu). Ezt a törvényt úgy hozták létre, hogy összhangban legyen másik két, ebben a témában meghatározó szereppel bíró és ugyanezen évben íródott törvénnyel, a természet védelméről (LIII/1996), az erdőről és az erdő védelméről (LIV/1996) (Fábián et. al., 2006).

Eddig hazánkban, mint ahogyan említettem is, a vadsertésállomány növekedése volt megfigyelhető, mivel remek bevételi forrást jelent a vadászatuk, és úgy gondolták, kordában tudják tartani az egyedszámot. Ez sajnos úgy tűnik, hogy tévesnek bizonyult, mert a túlzott szaporulat sokszor hatalmas mezőgazdasági károkat okoz (www.nak.hu). Ez nem csak Magyarországra jellemző, hanem sok más országban is küzdenek ezzel a nehézséggel (Hajji and Zachos, 2011; García et al., 2011; Aravena et al., 2015; Demirbas et al., 2016). Ezért a 2018-as éves vadgazdálkodási konferencián a Szent István Egyetem Vadvilág Megőrzési igazgatója bejelentette, hogy új vadgazdálkodási stratégiát terveznek bevezetni, ami folytán próbálnak egy mindenki számára elfogadható vaddisznó-állomány nagyságot fenntartani a jövőben (www.nak.hu).

Magyarországon egész évben engedélyezett a vaddisznó kanok, süldők és malacok elejtése, ezzel szemben a kocák csak május 1. és január 31. között vadászhatók. Vaddisznó malacnak tekintik a szaporulat egyedeit 20 kg zsigerelt testtömegig, süldőnek 50 kg-ig, kocának pedig az 50 kg-ot elérő vagy azt meg is haladó súlyú nőivarú vaddisznót (www.omvk.hu). Az egész évben való vadászhatóságot számos vadászatszervező iroda is kihasználja, hiszen, ezért számos külföldről érkező vadász (kb. 20-22.000 fő/év) jelenik meg hazánkban, legfőképpen az EU tagországaiból, mivel más uniós országokban

rövidebb vadászati szezonok vannak meghatározva (Boumendjel et al., 2016). A vadászat típusa szerint 15-től akár a 100 egyed is elérő terítéssel lehet számolni egy nap, de utóbbi csak az igen exkluzív vadászatokra igaz, ott is az átlagos inkább 40-60 darab között mozog (www.hungarowild.hu, www.huntinghungary.hu)

Mint ahogyan a világ más tájain, így sajnálatos módon Magyarországon is számos esetben lehet találkozni orvvadászattal. A Büntető Törvénykönyv (BTK) szerint orvvadászatnak minősül, ha valaki nem rendelkezik megfelelő engedéllyel (fegyverhasználati- és vadászati engedély), ha nem vadászati idényben (azaz tilalmi időben), illetve nem engedélyezett napszakban folytat vadászatot, valamint ha tiltott eszközöket vagy módszereket alkalmaz a vad elejtése során (BTK 245. §: www.net.jogtar.hu). Számos ilyen jogosulatlan vadásztevékenységről adnak hírt évente, melyekben vadászíjjal, illetve illegálisan szerzett és tartott lőfegyverrel jutnak vadhúshoz az elkövetők (www.police.hu). Ezen cselekedetek akár 3 évig terjedő szabadságvesztéssel is büntethetőek.

1.3. Igazságügyi genetikai és vizsgáló módszerei

Manapság a különböző genetikai vizsgálatok egyre inkább elengedhetetlenek a bűntények megoldásában. Az igazságügyi genetikai egy alkalmazott tudományág, amely a biológiai anyagmaradványokat a molekuláris genetikai technikák alkalmazásával vizsgálja. Ezáltal egy olyan eszköz, melynek segítségével a kriminalisztikai hipotézisek megerősíthetők, vagy elvethetők, igazolva az adott bűncselekménnyel fennálló kapcsolatot.

1.3.1. Igazságügyi állatgenetika

Az igazságügyi állatgenetika majdnem olyan messzire visszanyúló múlttal rendelkezik, mint a humán igazságügyi genetikai. Az első állati eredetű kriminalisztikai DNS azonosítás 1994-ben történt, melyben a Kanadai rendőrség (Royal Canadian Mounted Police) nyomozói sikeresen igazolták egy Snowball nevű macska szőrzetének DNS tartalmát a feleségét meggyilkoló férj helyszínhez kötésére (a gyanúsított kabátján talált macskaszőrök DNS-ének kimutatásával). Az eredmények bemutatása közrejátszott abban, hogy a vádlottat bűnösnek találták a gyilkosságban. Az ügy jogi precedenst teremtett az állati eredetű minták igazságügyi genetikai felhasználásában, valamint rávilágított arra, hogy azonosításuk kulcsfontosságú lehet az emberek által elkövetett bűntények megoldásában (Menotti-Raymond et al., 1997).

Állati eredetű DNS vizsgálatok eredményeinek figyelembevételével azóta is egyre több megalapozott ítélet születik egy-egy bírósági eljárás során és ez alól hazánk sem kivétel (Pádár, 2001; Szabolcsi, 2014; Zenke, 2015; 2017). Témám szempontjából az igazságügyi genetikának a jogosulatlan vadászatok során előkerült biológiai minták (mint bizonyítékok) faji- és/vagy egyedazonosításában van a legfontosabb szerepe, amely esetekben a hagyományos, pl. fenotípus alapján történő meghatározás nem kivitelezhető, de emellett még fontos szereppel bír az illegális kereskedelem megfékezésében is (Alacs et al., 2009; Panday et al., 2014).

1.3.2. Molekuláris genetika

A molekuláris genetika a természettudományok egyik leggyorsabban fejlődő területe, amely molekuláris szinten foglalkozik az örökítőanyag felépítésével és funkciójával. Alapvető módszerei közé tartozik többek között a polimeráz-lánreakció (Polymerase Chain Reaction, PCR) technikája, amely Kary Banks Mullis amerikai vegyész elgondolásán alapul, és jelentősen fellendítette ezen tudományág fejlődését. Ez a reakció – megfelelő pufferközegben – képes mesterségesen bármiféle élő szervezet nélkül felsokszorozni egy rövidebb genomszakaszt DNS-polimeráz enzim, nukleotidok és primerek jelenlétében. A folyamat hőmérséklet ciklusok változásával valósul meg, minden ciklus három lépésből áll. Először a kettős szállal rendelkező DNS szétválik kb. 95°C-on (denaturálódik), utána alacsonyabb hőmérsékleten (40-60°C) a primerek kötődnek (annealing), végezetül 72°C-on a DNS-polimeráz létrehozza az új szálakat (elongáció). Kary Mullis hét évvel azután, hogy gyakorlatban is alkalmazta elgondolását, megkapta a kémiai Nobel-díjat 1993-ban (www.nobelprize.org). A módszer mai napig számos genetikai elemzés és kísérlet kulcslépése, így például az örökletes- és fertőző betegségek kimutatásában, egyedi azonosításban, származásellenőrzésben és élelmiszer vizsgálatokban.

Másik mérföldkőnek a DNS-szekvenálási technikák számítanak, melyeknek lényege az örökítőanyagot alkotó nukleotidok sorrendjének a meghatározása. Az első generációs szekvenálási módszerek az 1970-es években jelentek meg, közülük is a legmeghatározóbb a Sanger-féle szekvenálás lett. A folyamat során négy szekvenáló reakciót készítenek elő, amelyek tartalmazzák a DNS-templátot, a primert, a DNS-polimerázt és négy különböző dezoxinukleotidot (dNTP). A négy elegyhez még hozzáadnak egy-egy féle didezoxinukleotidot (ddNTP). A dNTP és a ddNTP között az a különbség, hogy az utóbbinál a 3'-szénatomhoz hidrogénatom kapcsolódik és nem

hidroxilcsoport (OH), aminek fontossága ott mutatkozik meg, hogy ha ddNTP épül be, akkor az új száznak a szintézise megáll. Ennek folyamán eltérő hosszúságú DNS-szálak képződnek, amelyek poliakrilamid gélen történő gélelektroforézis folyamán szétválaszthatóak és a bázissorrend leolvashatóvá válik. A technika kidolgozásáért Sanger megkapta második kémiai Nobel-díját 1980-ban Paul Berg és Walter Gilbert mellett (www.nobelprize.org).

Az úgynevezett második generációs szekvenálás az automata fluoreszcens szekvenálás. Ennek kidolgozása nagyban felgyorsította az eljárást, mivel nincs szükség négy elegyre, ugyanis négyféle fluoreszcens festékkel jelölt ddNTP-t alkalmaznak, illetve tovább gyorsítja a folyamatot az is, hogy PCR készülékben zajlik a reakció. A kapott DNS-szálakat kapilláris gélelektroforézis segítségével lehet méret szerint elkülöníteni. A folyamat során a különböző fénykibocsátású ddNTP-k detektálása történik. A detektálás végeredménye a kromatogram, amelyen a négy szín a négy különböző nukleotidot jelöli: zöld az adenint (A), a kék a citozint (C), a sárga a guanint (G) és a piros a timint (T). Ennek a technikának köszönhetően számos élőlénynek, így az embernek is sikerült a teljes genomját meghatározni.

Az ezredforduló folyamán újabb és hatékonyabb, úgynevezett új generációs szekvenálási eljárásokat (NGS) dolgoztak ki, amelyek segítségével több (akár millió) DNS-mintát tudnak egyszerre feldolgozni, így pár nap alatt szekvenálni lehet akár az emberi genomot is. Ezek a módszerek mind a láncszintézis, mind a detektálás terén lényegileg térnek el a hagyományos Sanger-féle szekvenálástól. A kapott DNS-szekvenciákat nagy kapacitású számítógépes feldolgozás után lehet azonosítani.

1.3.3. Mitokondriális DNS (mtDNS) vizsgálatok

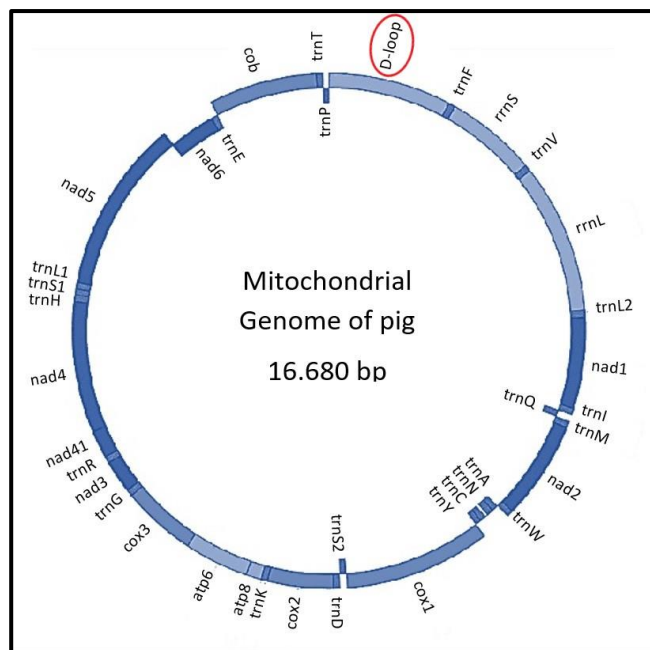
A mitokondriumot egy erős fehérje burok veszi körül, ami védi a benne lévő cirkuláris DNS-t. Öröklődése maternális, tehát csak anyai ágról kerülhet az utódba (Giles et al., 1980), mivel a petesejt citoplazmája tartalmazza. Egy mitokondrium 1 és 15 közötti számban tartalmaz másolatokat a DNS-ről és egy sejtben akár több száz, vagy több ezer mitokondrium is lehet (Sato and Kuroiwa, 1991; Chen et al., 1995). A nukleáris DNS-sel szemben a mtDNS-ben többször fordul elő mutáció, mivel a különböző hibákat kijavító mechanizmusok kisebb hatékonysággal működnek a mitokondriumban, mint a sejtmagban.

Az igazságügyi genetikában is gyakran képezi a vizsgálat tárgyát, mivel számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, amelyek lehetővé teszik a sikeres analízist akkor is, amikor a nukleáris DNS-t nem lehet kimutatni. Hatalmas adatbázis áll rendelkezésre a

különböző fajok és fajták mtDNS-éből, így könnyítve a további kutatásokat és összehasonlításokat. A fehérje burok védő szerepe következtében erősen szennyezett vagy sérült minták esetén is kimutatható. Degradáló hatással bírhat a meleg, a nedvesség, a különböző mikroorganizmusokkal való találkozás, illetve meghatározó szerepet tulajdoníthatunk annak is, mennyi idő telt el az eredeti környezetéből való kikerülése óta. Anyai öröklődésének köszönhetően, az egy anyai ágról származó egyedek mtDNS-ének a haplotípusa megegyezik, illetve egyéb DNS típusokkal nem rekombinálódik (Howell, 1997), így generációról generációra sértetlen marad, és földrajzilag determinált lesz az haplotípusok eloszlása. Ezen tulajdonsága miatt csak fajazonosításra alkalmas, egyedi szinten nem lehet megkülönböztetni két mintát, viszont a populációk elkülöníthetővé válnak geológiai eredetük szerint. Továbbá a mutációk többszöri megjelenése miatt különböző variációk jöhetnek létre a más szempontból nézve azonos anyai vonalon belül, így növelve a haplotípusok számát.

A mtDNS alapú fajazonosításra többféle módszer is létezik (Johnson et al., 2014), mivel egyes szakaszai megfelelően konzervatívak, de a fajok között eltéréseket mutatnak. Ilyen a citokrómoxidáz 1 (CO-1) és a citokóm-b (Cytb) enzim génje (Tobe and Linacre, 2010), valamint a 12S rRNS gén (Melton and Holland, 2007) és a 16S rRNS (Imaizumi et al., 2007). Mivel a kontroll régió (D-loop) nem kódoló szakasz, nagyobb számban fordulnak benne elő eltérések, ezért a fajon ill. fajtán belüli egyes anyai leszármazási vonalak meghatározására is alkalmas. Ezen szakaszon belül mikroszatelliták (STR/SSR/VNTR) is megtalálhatóak – amelyek inaktív DNS-szakaszok, és nagy változatosságukat a 2-7 bázispárból felépülő egységek eltérő száma adja – és ugyanezen módon használhatóak az anyai rokonság megállapítására (Lee et. al., 2010).

A sertések mtDNS-ének teljes szekvenálását először két svéd kutató, Björn M. Ursing és Ulfur Arnason fejezte be 1998-ban. A mitokondriális genom 16.680 bázispár (bp) hosszúságú, aminek egy 1.246 bp hosszúságú D-loop szakasza van, ami a 15.434. bp-tól a 16.680-ig tart, így egy 15.434 bp hosszú kódoló szakasszal rendelkezik (2. ábra). A teljes mitokondriális genomnak a bázispár hosszúsága haplotípusonként eltérhet a kontroll régióban fellelhető ismétlődő motívum miatt. A kódoló szakaszon található 22 tRNS-t, 2 rRNS-t és 13 az anyagcsere folyamatokban szerepet játszó enzimeket meghatározó részek találhatóak.



2. ábra - Sertés mitokondriális DNS

A D-loop három darab *conserved sequence block* szekvenciát tartalmaz (CSB-1, CSB-2 és CSB-3), amiknek bázisösszetétele és pozíciója fajonként eltérő. A CSB-1 és a CSB-2 között egy 10 bázispárból (GTACACGTGC) álló, akár 14-29-szer ismétlődő szakasz helyezkedik el. A sertésekre, a többi párosujjú patással ellentétben jellemző, hogy a CSB-2 és a CSB-3 nem egymás mellett található, hanem távolság van közöttük (Ursing and Arnason, 1998).

1.3.4. Populációgenetikai vizsgálatok

Populáció alatt az élőlények azon csoportjait értjük, melyek közös génállománnyal rendelkeznek és tényleges szaporodási közösséget alkotnak.

A populációgenetika ezen csoportosulások genetikai összetételét, illetve az ezt megváltoztató mechanizmusokat tanulmányozza. Az elméleti populációgenetika alapjait a 19. sz. végén három tudós fektette le, Sewall Green Wright, Roland Fisher és John Haldane. Két fő területe alakult ki az idők folyamán, a kvantitatív és a kvalitatív populációgenetika.

A mennyiségi tulajdonságok poligénia útján jelentkeznek, tehát sok, kisebb hatással bíró gén együttesen határoz meg egy jelleget. Ezen tulajdonságokra a környezet is befolyással bír és jelentős állattenyésztési kutatások zajlanak az összefüggések megértése érdekében.

Ezzel szemben a minőségi tulajdonságok monogénia vagy oligogénia útján öröklődnek, vagyis egy vagy néhány nagy hatású gén szabályozza és gyakorlatilag nem hatnak rájuk a különböző környezeti tényezők. A kvalitatív populációgenetika ezeknek az

allélgyakoriságoknak az eloszlását, illetve tér- és időbeli változásait vizsgálja a populáción belül. Négy evolúciós hatás nagymértékben képes befolyásolni ezt a folyamatot, melyek a szelekció, a génáramlás, a mutáció és a genetikai sodródás.

A populációgenetika továbbá nézi egy adott területen a haplotípus szerinti eloszlást, ami megjelenhet a genotípus és a fenotípus eltérésében is, így földrajzi elhelyezkedés szerinti eltéréseket lehet kimutatni a populációk között. Ilyen vizsgálatot végeztek egy Chilei tanulmány folyamán is, hogy a Karukinka Nemzeti Parkban, a Tierra del Fuego szigeten megfelelő megoldási stratégiát dolgozzanak ki a vadsertés állomány további növekedésének a megállítására. A helyi vaddisznó állomány mtDNS-ének a vizsgálatát végezték, aminek eredményeként megállapították, hogy a szigeten található vadsertés populáció európai eredetű, de két különböző leszármazásból (Aravena et al., 2015).

1.4 Nemzetközi Genom Projektek: Sertés Genom Projekt

Az emberi genom feltérképezésének a haladásával egyes háziállatoknak a kromoszómális nukleotid sorrendjének a megállapítása is fejlődésnek indult, és 2003-ban megalapították a „*Swine Genome Sequencing Consortium*”-ot (SGSC), hogy nemzetközi együttműködést tudjanak biztosítani a teljes sertés genom feltérképezéséhez (Schook et al., 2005). Az SGSC céljai közé tartozik, hogy a kapott szekvenciákat az orvostudomány és az állattenyésztés területein felhasználják, épp ezért mindkét ágazat nagyban támogatja a projektet (www.comparativegenomics.illinois.edu). Számos maternális úton öröklődő betegséget felfedeztek, valamint kimutatták, hogy az egyes haplotípusok különböző kvalitatív tulajdonságokkal bírnak (pl. várható alomszám, szaporodási képesség), így segítve az egyre jobb termelési képességgel rendelkező hibridek előállítását (John and Tsai, 2018). 2012-ben már leközlötték több európai és ázsiai sertés genomszekvenciáját, valamint a publikációban szót ejtettek az európai és az ázsiai vadsertések közötti magas filogenetikai eltérésről is (Groenen et al., 2012). Négy évvel később további vizsgálatokat végeztek, melyek során több száz sertésnek újra szekvenálták a teljes genomját, így létrehozva egy majd 350 egyedből álló adatbázist (Groenen, 2016). Mivel a humán és a sertés genom sokban hasonlít, ezért számos átfedés született a két genom project között. Egyes emberi betegségeknek a genetikai hátterét és génjeiknek az elhelyezkedését csak a sertés genomjának a feltérképezése után sikerült meghatározni, így nem csak az állatorvoslásnál, de a humán gyógyászatban is nagy jelentőséggel bír.

Magyarországon 2009-ben a *Mangfood* kutatási konzorcium által létrehozott Mangalica Genom Projekt keretein belül a mangalica genomját hasonlították össze

különböző fajtájú sertések genomszekvenciájával. Az összehasonlítás útján sikerült fajtaspecifikus különbségeket kimutatni, amelyekkel olyan PCR módszereket dolgoztak ki, amik segítségével lehetővé vált a mangalicahús jelenlétének és mennyiségének a kimutatása különböző hústermékekben. Ezeket a módszereket próbálják tovább fejleszteni a többi sertésfajta, és a vaddisznó kimutatására is (www.abc.naik.hu). Számos ehhez hasonló vizsgálat zajlik, hogy különböző ételekből, húskészítményekből kimutathatóvá váljon a felhasznált állat faja, hiszen fontos szereppel bír a hús származásának faji megállapítása olyan esetekben, amikor orvvadászat gyanúja áll fenn, vagy vallási okok miatt nem fogyaszthatnak egy adott húsfélét. Ilyen irányú vizsgálatokat végeztek fajspecifikus mitokondriális markerekkel Tanzániában, ahol 14 állat (az egyik sertés) húskeverékéből állapították meg a felhasznált fajokat (Malisa et al., 2006). Egy évvel később fajspecifikus-PCR és Cytb marker felhasználásával dolgoztak ki egy módszert 4 állat (bölény, szarvasmarha, sertés, birka) elkülönítésére egy húskeverékéből, a kapott fragmentek különböző bp hosszúságai alapján (Ahmed et al., 2007). 2014-ben egy PCR-el elvégzett vizsgálatot publikáltak, amely a kontroll régióra koncentrált, így 24 faj, köztük a sertés elkülönítését tette lehetővé szintén az eltérő bp hosszúságú fragmentek segítségével (Karabasanavar et al., 2014), majd egy évre rá egy sertés specifikus primert terveztek, ami lehetővé tette, hogy akár 1% sertéshús mennyiséget is kimutasson egyes húskészítményekből (Ha et al., 2017).

1.5. Esettanulmány

A Siklói Rendőrkapitányság Egyházasharaszti Körzeti megbízottja 2017. január 26-án a gordisai erdőterületen tartott erdőbejárást, mely során hurkolás módszerével elejtett vaddisznó megnyúzott bőrét, fejét, bensőségeit találta meg. A gyanúsított személy előállítására, majd tanúként való kihallgatására került sor, ahol tagadta, hogy a bűncselekmény elkövetéséhez bármi köze lenne. A házkutatás során lefoglalásra került egy pár gumicsizma, melyen vérgyanús szennyeződés volt található.

Az eljárásban indokoltá vált annak megállapítása, hogy a helyszínen rögzített anyagmaradványok azonosak lehetnek-e a gyanúsítottól lefoglalt gumicsizmáról rögzített anyagmaradvánnyal. Első körben ezért lényeges volt annak megállapítása, hogy a gumicsizma vérgyanús szennyeződése milyen fajtól származik. A vaddisznó eredet alátámasztása után az egyedi, illetve az anyai vonal leszármazásának megállapítása volt szükséges összehasonlító genetikai vizsgálattal.

2. Célkitűzések

Munkánk során egy olyan vizsgálati módszer kifejlesztése volt a cél, amelyben a mitokondriális DNS kontroll régiójának rövid (kb. 150 bp hosszú), átlapoló szakaszokkal való vizsgálatával a minimális mennyiségű, degradált minta is alkalmassá válik az analízisre.

Célunk volt továbbá a magyarországi vadsertések DNS-adatbázisának megalapozása, amely a kontroll régió 675 bázispárnyi szakaszát tartalmazza.

A magyar vaddisznóállomány genetikai diverzitását a kapott szekvenciális különbségek (eltérő haplotípusok) alapján statisztikai elemzéssel terveztük felmérni.

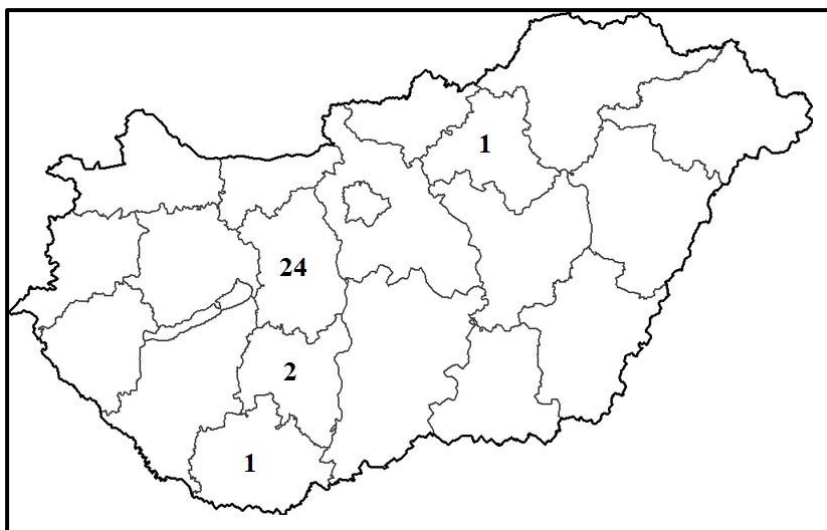
Az új módszer érzékenységét és alkalmazhatóságát egy korábbi eseti mintán – amely analízise nem járt sikerrel a korábbi vizsgálati stratégiákkal – kívántuk tesztelni.

3. Anyag és Módszer

3.1. Populációgenetikai vizsgálatok

3.1.1. Mintagyűjtés

A populációs adatbázis megalapozása céljából hús-, vér, illetve szőrmintákat vizsgáltunk, melyeket vadászok biztosítottak számunkra különböző magyarországi vadsertés állományokból. 28 minta genetikai vizsgálatát végeztük el, melyekből 24 db Fejér megyéből, 2 db Tolna megyéből, 1-1 pedig Baranya és Heves megyéből származott (3. ábra).



3. ábra - A minták származásának ábrázolása megyénként

A mintákat az Állatorvostudományi Egyetem Genetikai Laboratóriumában (Állattenyésztési, Takarmányozási és Laborállat-tudományi Tanszék) dolgoztuk fel.

3.1.2. DNS preparálás és agarózgél elektroforézis

A DNS kinyerését FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit segítségével, a leírás alapján végeztük el. A mintákból kis darabokat steril csipesz és olló segítségével mikrocentrifuga csövekbe tettük, majd hozzájuk adtunk 200 µl FATG1 puffert és 85 °C-on 10 percig inkubáltuk. Utána hozzájuk kevertünk 20-20 µl Proteináz K oldatot és visszatettük a csöveget inkubálni további 60 °C-on. Egy óra elteltével a keverékhez pipettáztunk még 200 µl FATG2 puffert, vortex segítségével összekevertük és 10 percig 70 °C-on tovább inkubáltuk. Ezek után még az oldatokhoz adtunk 200 µl 96%-os etanolt, majd a csöveget centrifuga segítségével lepörgettük, hogy az inkubálás alatt páraként a csövek tetejére került folyadék is lekerüljön azok aljába. Következő lépésként az oldatokat

gyűjtőcsövekbe helyezett oszlopokba pipettáztuk át és lecentrifugáltuk őket (1 perc, 13000g). A centrifugálás után az oszlopokat új gyűjtőcsövekbe helyeztük és az oszlopokra mértünk 400 µl W1 puffert, majd 750 µl mosó puffert. Mindkettő puffer után lecentrifugáltuk a csöveket (1 perc, 13000g) és elöntöttünk a gyűjtőcsövek alján lévő folyadékot, illetve a mosó puffer utáni elöntést követően még 3 perc centrifugálás következett (13000g), hogy az oszlopokat kiszárítsuk. Mindezek után az oszlopokat tiszta elúciós csövekbe helyeztük át, ahol 80 µl szobahőmérsékletű elúciós puffert mértünk az oszlopok közepére, majd 3 percig állni hagytuk őket. Végezetül 2 percig centrifugáltuk a csöveket (13000g), hogy leoldjuk az oszlopról a DNS-t.

A DNS kinyerésének a sikerességét és a kivont DNS minőségét és mennyiségének megbecsülését agarózgél elektroforézissel végeztük el.

A gélöntéshez felhasznált anyagok:

- 1 g agaróz (BioLine)
- 35 ml 0,5xTris-borátsav-EDTA puffer (TBE)
- GelRed TM Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)
- 5 µl tisztított DNS-minta
- 2 µl glicerines brómfenolkék (BFK) töltőpuffer/minta

Először elkészítettünk egy 3%-os agaróz oldatot, amit megdermedés után behelyeztük a futtatókádba. A zsebekbe 5 µl tisztított DNS mintát helyeztünk, amihez 2 µl BFK-t, mint töltőpuffer kevertünk. A folyamat 100 V-on, 100 mA áramerősséggel, 40 perc alatt ment végbe nanoPAC-300 (Cleaver Sci. Ltd.) készülék segítségével. Végezetül a gélt Glite 900BW Gel Scanner System berendezésbe helyeztük, ami kék fény segítségével átvilágította és detektálta a genomi DNS-t.

3.1.3. PCR amplifikáció

A mtDNS kontroll régiójának 675 bp szakaszát amplifikáltuk a L15433 (5'AGGCATTTTCAGTGCCTTG3') és a H16108 (5'GCACCTTGTTTGGATTGTCG3') primerek felhasználásával. Referencia szekvenciaként a génbankban lévő vadsertés (*Sus scrofa*) teljes mtDNS szerkezetét vettük (GenBank: AJ002189, www.ncbi.nlm.nih.gov).

Az amplifikáció a következő anyagok segítségével, 25µl térfogaton ment végbe:

- 5 µl DreamTaq™ Green DNS polimeráz tartalmú mestermix (Thermo Fisher Scientific)*
- 1-1 µl forward és reverz primer (10 µM)
- 1µlDNS minta
- ionmentes steril víz a térfogat kiegészítéshez

*A DreamTaq™ Green PCR Master Mix összetevői: DreamTaq DNS polimeráz, DreamTaq Green puffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, MgCl₂.

A PCR kivitelezése Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler (Life Sciences) készüléken történt a következő beállításokkal:

Kezdeti denaturáció	94 °C	30 mp				
Denaturáció	94 °C	30 mp		94 °C	30 mp	
Primer anelláció	58 °C	30 mp	15 ciklus	55 °C	30 mp	21 ciklus
Elongáció	72 °C	45 mp		72 °C	45 mp	
Végső elongáció	72 °C	5 perc				

Az anellációnál azért alkalmaztunk két hőmérsékletet (*touchdown PCR*), hogy a primerek bekötésének specifikusságát növeljük. A PCR-termékeket további feldolgozásig hűtőben (4°C) tároltuk.

A PCR eredményességét gélelektroforézissel ellenőriztük vissza, a 3.1.2. fejezetben már ismertetett módon. Az egyetlen eltérés csak annyi volt, hogy nem volt szükség BFK-re, mivel a használt mestermix összetétele lehetővé tette a direkt mintafelvitelt a géltre.

3.1.4. PCR termékek tisztítása és szekvenálása

A PCR után kapott termékeket GenElute™ PCR Clean-Up Kit-el (Sigma-Aldrich) tisztítottuk a megadott utasítások szerint. A gyűjtőcsövekbe oszlopokat helyeztünk, majd erre ráértünk 0,5 ml Column Preparation Solution-t. Centrifugálást követően (1 perc, 12000g) a csövek alján lévő folyadékokat elöntöttük. A PCR termékből 20 µl-t összekevertünk 100 µl Binding Solution-nal, majd a kapott elegyet felvittük az oszlopokra. Ezután újból elvégeztük a centrifugálást (1 perc, 16000g) és a folyadékok elöntését. A következő lépésben 0,5 ml Wash Solution-t adtunk hozzájuk, majd harmadszorra is lecentrifugáltuk (1 perc, 16000g) és elöntöttük a keletkezett folyadékokat. Ezek után az

oszlopokat visszahelyeztük a gyűjtő csövekbe és újból lecentrifugáltuk őket (2 perc, 16000g), majd új gyűjtőcsövekbe helyeztük őket. Mindezek után az oszlopokra mértünk 50 µl Elution Solutiont és 1 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk őket. Az utolsó és végső centrifugálás után (1 perc, 16000g) már a megtisztított PCR termékek maradtak a csövek alján.

A tisztított PCR-termékeket visszaellenőriztük egy újabb agarózgél elektroforézissel (ld. 3.1.2. fejezet), majd további felhasználásig hűtőben tároltuk (4°C).

A kontroll régió szakasz bázissorrendjének meghatározását (szekvenálását) a mórhalmi SeqOmics Biotechnológiai Kft. végezte el számunkra (www.seqomics.hu). A kapott szekvencia adatokat a Sequencher™ 4.1.2 (Gene Codes Corp) szoftverrel illesztettük a referencia szekvenciához (GenBank Acc. No: NC_002189) és így határoztuk meg az egyedi haplotípusokat.

3.1.5. Statisztikai számítások a mitokondriális genomszakasz alapján

A vizsgálatokkal kapott haplotípusok konszenzus szekvenciáinak alapján az Arlequin v3.5. program segítségével kiszámoltuk a hazai felmért vadsertés állomány haplotípus- és nukleotid diverzitását (Excoffier and Lischer, 2010).

Az összes minta DNS szekvenciájának a beimportálása után a következő diverzitási paraméterek voltak megfigyelhetőek:

- **Polimorf nukleotidok:** a kontroll régióban az AJ002189 referencia szekvenciához viszonyítva megfigyelt polimorf nukleotid pozíciók összessége.
- **Deléció:** a DNS által hordozott genetikai információ egy része elvész.
- **Szubsztitúció:** egy pontmutáció megy végbe, tehát egy bázis egy másikra cserélődik ki. Két formája van:
 - **Tranzíció:** egy purinbázis egy másik purinbázisra (pl. A → G), vagy egy pirimidin bázis egy másik pirimidin bázisra (pl. T → C) cserélődik ki.
 - **Transzverzió:** egy purinbázis helyett egy pirimidin bázis lesz (pl. C → A), vagy fordítva.
- **Megfigyelt/Egyedi haplotípusok:** a populációban észlelhető összes haplotípus, ebből mennyit lehet csak egyszeri alkalommal megfigyelni.

3.2. A mitokondriális kontroll (CR) régió vizsgálata rövid átlapoló primerpárokkal

A primerek tervezését a Primer Designer 4 program (www.scied.com) segítségével végeztük az AJ002189 GenBank azonosítójú szekvencia alapján. Az volt a célunk, hogy a vizsgálni kívánt genomrészt lehetőség szerint kb. 150 bázispár hosszú, de mindenképpen 200 bp alatti átlapoló szakaszokkal fedjük le (1. táblázat). A tervezésnél figyelembe vettük a képződő PCR termék hossza mellett annak stabilitását (G/C arány), a primerek más DNS-szakasszal (*fals priming*), egymással (*primer dimer*) illetve önmagával (*hairpin*) való összetapadásának lehetőségét, A primer szekvenciájában az egymást követő azonos bázisok (3 vagy több) szintén megzavarhatják a primer pontos kötődését. A tervezés végén készítettünk egy jelentést (*PrimerPair Report*) a primer párojainkról, amin az összes előbb felsorolt adat megtalálható.

Primer	Pozíció	Szekvencia (5' – 3')	PCR-termék mérete (bp)
CR I.	H15605 L15424	GACGTACATAGGGTTATAGT ACTATTCCCTGCAACCAA	182
CR II.	H15747 L15595	GATCTAGTGGTGGTGATATG CTATGTACGTCGTGCATT	153
CR III.	H15883 L15728	GATGGTCCTGAAGTAAGAAC CATATCACCACCACTAGA	156
CR IV.	H16022 L15867	CATGGCTGAGTCTAAGCATC CTTACTTCAGGACCATCT	156
CR V.	H16158 L16000	ACGTGTACGCACGTGTATGT GGGGATGCTTAGACTCAG	159

1. táblázat - A mitokondriális CR régió vizsgálatára tervezett rövid, átlapoló primerek

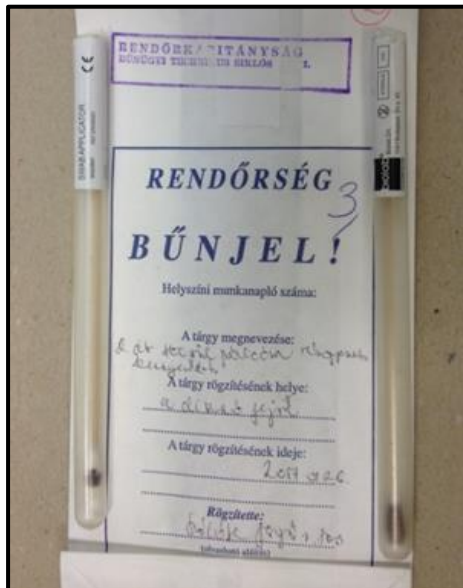
A primerek tesztelésére alkalmazott PCR program:

Kezdeti denaturáció	94 °C	30 mp				
Denaturáció	94 °C	30 mp		94 °C	30 mp	
Primer anelláció	54 °C	20 mp	15 ciklus	52 °C	20 mp	21 ciklus
Elongáció	72 °C	20 mp		72 °C	20 mp	
Végső elongáció	72 °C	2 perc				

A PCR eredményességét gélelektroforézissel ellenőriztük vissza, a 3.1.2. fejezetben már ismertetett módon (BFK-re szintén nem volt már szükség).

3.3. Eseti minta vizsgálata az új primerek segítségével

Korábbi, orvadászat kapcsán lefoglalásra került bűnjelekből (4., 5. ábra) tisztított DNS-mintákon vizsgáltuk a tervezett primerek alkalmazhatóságát a 3.2. fejezetben ismertetett protokoll alapján.



4. ábra - Helyszínen gyűjtött anyagmaradványok a tetemből



5. ábra - A gyanúsítottól lefoglalt gumicsizma vérszennyeződéssel

4. Eredmények

4.1. Mintagyűjtés és DNS preparálás

A vaddisznó mintákat az ország több részéről szereztük be, így segítve a populációgenetikai felmérést és a már eddig meglévő populációs adatbázis bővítését. Mind a 28 mintából sikerült a további kutatásokhoz szükséges mennyiségű és tisztaságú DNS-t kinyerni, amit szemikvantitatív agarózgél elektroforézis segítségével ellenőriztünk.

4.2. PCR amplifikálás és szekvenálási reakció

A feldolgozott hús-, szőr- illetve vérminták amplifikálása során specifikus PCR-termékeket kaptunk. Szekvenca-analízissel mind a 28 vaddisznó mitokondriális kontroll régió szakaszának minimum 660 bázispárnyi szekvenciáját sikerült meghatározni (6. ábra).



6. ábra – Két vaddisznó kontroll régió szekvenciájának egy-egy szakasza öt pontmutációs eltéréssel

4.3. A DNS-profilok populációstatisztikai elemzése

A statisztikai számításokat a kontroll régió 660 bázispárnyi szakasza (15.445-16.105) alapján végeztük. Eredményeinket összevetettük a GenBankból letöltött referencia szekvenciával, ezen eltéréseket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

Pozíció:	15.543	15.565	15.572	15.579	15.587	15.592	15.615	15.648	15.675	15.706	15.714	15.729	15.741	15.758	15.825	15.878	15.887	15.995	16.010	Minták száma (db)	
Ref. AJ002189	T	G	C	C	C	A	T	T	T	C	T	A	C	T	C	A	C	T	A		
H1										del	C			C							15
H2										del											7
H3	C	del	A	T	T	G	C		C	del	C	G	T		T	G	T	C	G		2
H4								C		del	C										1
H5										del	C										1
H6										del	Y				Y						1
H7										del					C						1

2. táblázat - A vizsgált vaddisznók mitokondriális DNS-ének eltérései a referencia szekvenciától

Vizsgálatainkkal hazánkban hét eltérő haplotípust (H1-7) sikerült kimutatni. A megvizsgált minták több, mint fele (53,57%) a H1 haplotípusba, 25%-a a H2, 7,14%-a pedig a H3 haplotípusba tartozik. A többi vaddisznóban (14,29%) megfigyelt haplotípus (H4-H7) csak egyszer fordult elő, tehát „egyedi” haplotípusokról beszélhetünk.

A szekvenciák bázisösszetétele 19 helyen (polimorf nukleotid-pozíciók) különbözött a referencia szekvenciától. Legtöbbször három helyen figyeltünk meg eltérést: deléciót a 15.706-os bázispozícióban, szubsztitúciót pedig a 15.714-es (tranzíció) és a 15.758-as (tranzíció) pozícióban (ezeket pirossal jelöltük a 2. táblázatban). Ezekkel együtt 17 helyen figyelhető meg szubsztitúció, amik közül 16 tranzíció és 1 transzverzió, valamint két helyen észleltünk deléciót.

A haplotípusok közül a H3-asban van a legtöbb eltérés a referencia szakaszhoz képest (18 helyen). A H2 haplotípusnál csak a 15.706-os pozícióban találtunk eltérést (deléció), ami gyakorlatilag minden felmért mintában jelen van. A H6 haplotípusnál két bázispozícióban (15.714 és 15.748) figyeltünk meg pont-heteroplazmiát (ezeket zölddel jelöltük a 2. táblázatban), amit két különböző nukleotid azonos pozícióban való (esetünkben timin és citozin) megjelenése okoz.

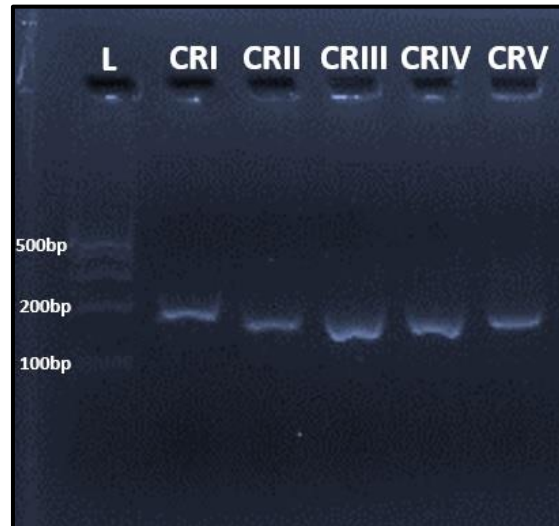
Az Arlequin v3.5 szoftver segítségével végzett diverzitási eredmények a 3. táblázatban láthatóak:

Haplotípus diverzitás	Nukleotid diverzitás
$Hd = 0,6640 \pm SD = 0,0786$	$\pi = 0,0043 \pm SD = 0,0026$

3. táblázat – Haplotípus (Hd) és nukleotid (π) diverzitás adatok a felmért vaddisznóállomány (n = 28) kontroll régió szakasza alapján

4.3. Mitokondriális CR régió vizsgálata rövid, átlapoló primerpárokkal

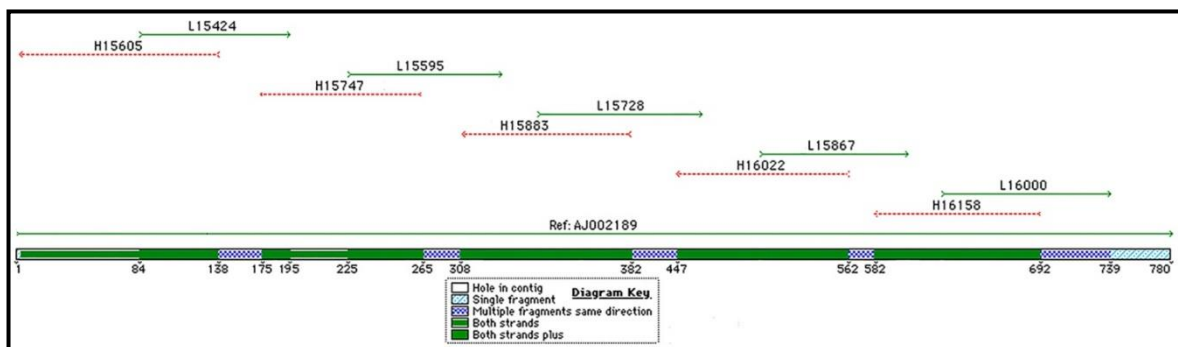
A tervezett primerpárokat egy vaddisznó vérmintájának tisztított DNS-én teszteltük PCR-el és specifikus, a várt méretnek megfelelő hosszúságú termékeket kaptunk (7. ábra).



7. ábra - A tervezett primerek tesztelése és PCR eredményének visszaellenőrzése agaróz gélen.

4.4. Esettanulmány

A bűnjelek vérszennyeződéséből tisztított DNS-minták PCR amplifikációja és szekvenálása sikerrel járt az új, rövid szakaszok vizsgálatával. Az öt primerpárral (CR I-V.) összesen a mitokondriális kontroll régió 739 bp hosszú szakaszát (15.424-16.158) sikerült analizálni (8. ábra).



8. ábra - Az eseti minta tervezett primerpárok általi lefedettségének ábrázolása a szekvenálási reakciók után

5. Megbeszélés/Következtetések

5.1. Populációgenetikai adatbázis kezdeményezése hazai vadsertésekre

Létrehoztunk egy kezdetleges genetikai adatbázist ($n=28$ minta), amely a kontroll régió 660 bázispárnyi szakaszát tartalmazza. A szekvenciális különbségek alapján megállapítottuk az eltérő haplotípusokat és statisztikai elemzést végeztünk a magyar vaddisznóállomány diverzitásának felmérésére.

Mivel a mintáink több, mint fele a H1-es haplotípusba került, azt feltételezzük, hogy ez a haplotípus több kisebb egyedszámmal rendelkező haplotípusra osztható szét, ha kiterjesztett vizsgálatokat végzünk a kontroll régió teljes szakaszán további varibialitások után kutatva. Bár eltérő területekről szereztünk mintákat, földrajzi eltéréssel összefüggő haplotípus eloszlást nem tudtunk meghatározni, mivel mintáink zöme azonos megyéből származott. Ezen felül az előzetes vizsgálatok során megállapításra került, hogy a hazai vaddisznó állomány genetikai felépítése igen nagy hasonlóságot mutat a spanyol vadsertésekkel, így tovább növelve a geográfiai átfedést (Glowacz, 2013). A felmért hazai vadsertésekben kimutatott haplotípus diverzitást ($H_d = 0,664$) összehasonlítva pár, a közel múltban elvégzett vizsgálatokkal, az általunk kapott diverzitás nagyságrendileg megegyezik a Balkán észak-dinári részein megfigyelttel ($H_d = 0,691$; Veličković et al., 2015), de alacsonyabb, mint Ázsiában ($H_d = 0,967$; Veličković et al., 2015), Európában ($H_d = 0,947$; Alexandri et al., 2012), a Közel-Keleten ($H_d = 0,892$; Veličković et al., 2015), a Balkán-félszigeten ($H_d = 0,892$; Alexandri et al., 2012) és Törökországban ($H_d = 0,723$; Demirbas et al., 2016). Tunéziához ($H_d = 0,550$; Hajji and Zachos, 2011) és Tajvan Lanyu-szigetéhez képest ($H_d = 0,384$; Jiang et al., 2008) viszont magasabb a diverzitás.

Ezzel szemben Magyarország nukleotid diverzitása ($\pi = 0,004$) közel megegyezik Európa többi részén ($\pi = 0,005$; Alexandri et al., 2012), Tajvanon ($\pi = 0,004$; Jiang et al., 2008) és a Balkán észak-dinári részén ($\pi = 0,003$; Veličković et al., 2015) mértékkel. A haplotípus diverzitásnál felsorolt többi részen pedig kétszer-háromszor is nagyobb a diverzitás, Ázsiában ($\pi = 0,024$; Veličković et al., 2015), Törökországban és Közel-Keleten ($\pi = 0,012$; Demirbas et al., 2016; Veličković et al., 2015) és Tunéziában ($\pi = 0,011$; Hajji and Zachos, 2011).

A felsorolt diverzitások alapján számos következtetést lehet levonni és meglátást tenni. A török vadsertések mind a haplotípus, mind a nukleotid diverzitásai magasabbak voltak, mint a kutatásunk során megállapított hazai adatok. Erre két magyarázatot is feltételezhetünk, hiszen a törökországi vizsgálatok során majd háromszor annyi mintát

dolgoztak fel (70 db), valamint a második meghatározó rész, hogy a kutatásaik során ők is egy hosszabb szakaszt vizsgálták a mtDNS kontroll régiójának (413 bp) (Demirbas et al., 2016). Ezzel szemben a Lanyu-szigeten mért mindkettő diverzitás alacsony volt, a fentebb említett többi régióhoz képest, aminek legfőbb okai, hogy a szigeten található és megvizsgált populáció igen alacsony egyedszámmal bírt a vizsgálat során (44 db), továbbá ezek a vadsertések egy szigeten találhatóak, így a populáció genetikai összetétele beszűkült (Jiang et al., 2008). Ez a beszűkülés veszélyes lehet a populáció fennmaradása szempontjából, hiszen a nagyobb genetikai változatossággal rendelkező állományok nagyobb eséllyel tudnak alkalmazkodni például a megváltozott környezeti tényezőkhöz. Konzervációgenetikai szempontból is nagyon fontos az egyes állományok genetikai felmérése, illetve az adatbázisok kiépítése. Ilyen célú kutatások zajlanak a Lanyu-szigeteki és a vietnámi vadsertések megmentésére (Jiang et al., 2008; Nguyen et al., 2017), illetve a túlszaporodás elleni megfékező stratégiák kidolgozására (Hajii and Zachos, 2011; García et al., 2011; Aravena et al., 2015; Demirbas et al., 2016).

5.2. Degradált minták vizsgálata rövid, átlapoló primerpárokkal

Mint ahogyan dolgozatom elején említettem, egyre gyakoribbak az orrvadászatok és velük együtt a jogtalanul elejtett vagy védett állatokkal, valamint azok részeivel való illegális kereskedelem. Ezen bűncselekmények felderítése során sokszor nem áll rendelkezésünkre egy jól felismerhető tetem, hanem csak az állat egy része (hús, toll, agyar stb.), így nagy szükség van egy megbízható és gyors fajazonosításra alkalmas vizsgálati módszerre. Az általunk kidolgozott rövid, átlapoló szakaszokat sokszorosító PCR módszer alkalmasnak bizonyult csekély mennyiségű eseti minta CR régiójának sokszorosítására és annak eredményes szekvenálására. A fajspecifikusság mellett a kontroll régió nukleotid sorrendje alapján a kérdéses minta anyai leszármazási vonala (haplotípusa) is meghatározható, amely tovább segíti a minta eredetének megállapítását.

A nem-humán genetikai vizsgálatok igen sokat fejlődtek az utóbbi évtizedben, valamint a bírósági eljárások folyamán egyre többször fogadják el a vizsgálatok során kapott eredményeket bizonyítékként. Például egy olasz embert több farkas elejtésével vádoltak meg, és talán az esete kapcsán először sikerült DNS-minta alapján bebizonyítani a farkasok elleni orrvadászatot (nyakláncon lévő fogak és talált farkastetem közötti kapcsolat), valamint az eset kapcsán begyűjtött bizonyítékokat összekötni a vádlottal (Caniglia et al., 2010). Az igazságügyi állatgenetika módszereinek előrehaladásával a fenotípusosan nem felismerhető állati eredetű tárgyak vagy élelmiszerek összetétele is

egyre hatékonyabban elvégezhető. A mitokondriális citokróm-b génszekvencia alapján 24 állatfajra specifikus PCR és szekvenálási eljárást dolgoztak ki, ami lehetővé teszi kevert mintákból is egy-egy faj specifikus meghatározását, így elkobozhatóvá válnak az illegális kereskedelem egyes elemei (Morf et al., 2013). Az illegálisan megszerzett vaddisznó hús kimutatása élelmiszerekből egyre nagyobb figyelmet fog kapni a közel jövőben az ASP megjelenésével hazánkban is, mivel ez a vírus nem csak állatról állatra terjed testvadászok vagy vér útján, hanem kezeletlen fertőzött hússal vagy ilyen húsból készült élelmiszerekkel is, ezért fontos az ismeretlen húsok bevizsgálása, hogy milyen állatból származnak, főleg ha feltételezhetően egy fertőzött területen elejtett vadból eredeztethetőek. Az emberi terjesztés akár meg is kétszerezheti a járvány évenkénti terjedési sebességét, ami még nagyobb károkat okozhat nem csak a vadsertés állományban, hanem a háztájiban is, így súlyos gazdasági veszteségeket okozva.

5.3. A kutatás értékelése, további lehetőségei

Összegezve, a vizsgálatok során mindkettő célkitűzésünket sikerült teljesíteni, hiszen megalapoztuk egy populációgenetikai adatbázis kiépítését, illetve sikeresen tudtuk alkalmazni a kidolgozott új módszert a mtDNS kontroll régiójának analíziséhez egy olyan bűnügyi mintán, aminek előző vizsgálataiban ezt nem sikerült megtenni.

A vizsgálatainkat majd szeretnénk tovább folytatni oly módon, hogy a most meglévő populációgenetikai adatbázist tovább bővítjük, valamint a H1 haplotípus magas egyedszáma miatt felmerült, hogy a CR vizsgált szakaszának megnövelésével esetleg több haplotípust találhatunk a hazai vaddisznó populáción belül, mint amennyit eddigi kutatásunk során sikerült.

Ezen felül az általunk fejlesztett rövid primerpárokkal való mtDNS kimutatást szeretnénk validálni mesterségesen degradált, különböző hígítású és faji eredetű DNS-mintákra, hogy megállapítsuk a módszer szenzitivitását és fajspecifikusságát.

6. Összefoglalás

A vaddisznók genetikai változatosságának ismerete nemcsak populációgenetikai szempontból fontos, hanem az orvvadászatok nagy száma miatt igazságügyi jelentőséggel is bír. Számos ilyen esetben a helyszíni minta (tetem maradvány), illetve a feltételezett elkövető használati tárgyain található állati eredetű anyagmaradványok összehasonlító genetikai vizsgálata szükséges. A mitokondriális DNS kontroll régiójának (D-loop) rövid, átlapoló szakaszokkal való vizsgálatával minimális mennyiségű, degradált minta is alkalmassá válik az analízisre. A kontroll régió szekvenciájának (mutációinak) specifikus primerpárral történő meghatározásával nemcsak a faji eredet, hanem az anyai leszármazási vonal (haplotípus) is megállapítható egy ismeretlen eredetű mintából. Az eredmények helyes interpretálása azonban csak akkor végezhető el nagy biztonsággal, ha rendelkezésre áll az adott populáció genetikai adatbázisa.

Saját vizsgálatainkat egy genetikai adatbázis létrehozásával (n=28 minta) kezdtük, amely a kontroll régió 660 bázispárnyi szakaszát tartalmazza. A szekvenciális különbségek alapján megállapítottuk az eltérő haplotípusokat és statisztikai elemzést végeztünk a magyar vaddisznóállomány diverzitásának felmérésére.

Kutatásunk második részében kidolgoztunk egy új módszert csekély mennyiségű, töredezett DNS-minták vizsgálatára. Öt új primerpár tervezésével rövid (kb. 150 bp hosszú) átlapoló szakaszokkal sokszorosítottuk fel ugyanezen mitokondriális régiót. Egy korábbi eseti mintán – amely vizsgálata nem járt sikerrel az eddigi, rendelkezésre álló vizsgálati stratégiákkal – teszteltük a módszer érzékenységét és alkalmazhatóságát az igazságügyi genetikai területén.

7. Summary

The revealed genetic diversity of wild boars is important both for conservation genetic as well as for forensic aspects, providing informative tool for investigation high number of poaching cases. In such type cases, comparative genetic examination of residues at the crime scene (e.g. carcass) and belongings of the alleged offender is often necessary. Examination of the mtDNA control region (D-loop) by short overlapping sequences, even degraded and/or minimal amount of samples can be analysed successfully. Determination of sequence variance in maternal haplotypes by specific primers can identify the species origin and maternal lineage of unknown specimen in parallel. However, the correct interpretation of matching requires statistical evaluation of results based on genetic database of the given population when is available.

As initial establishment of our genetic database 28 wild boar samples were collected and sequenced, including 660 bp length of the mtDNA control region. Based on sequential variances different haplotypes were identified and statistically analysed to estimate the diversity of the Hungarian wild boar population.

In parallel we developed a new conventional sequencing strategy for examination of small amount and fragmented DNA samples. Five new primer pairs were designed to amplify short (about 150 bp long) overlapping sections of the target control region. Case related DNA samples, which were analysed earlier insufficiently were applied for the sensitivity test, and for estimation of putative applicability of this method in the field of forensic genetics.

Irodalomjegyzék

A. L. Malisa, P. S. Gwakisa, S. T. Balthazary, S. K. Wasser and B. M. Mutayoba (2006) The potential of mitochondrial DNA markers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for domestic and wild species identification. In: African Journal of Biotechnology, 5(18): 1588-1593

B. M. Ursing and U. Arnason (1998) The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Pig (*Sus scrofa*). In: Journal of Molecular Evolution, 47: 302-306

C. P. Groves. and P. Grubb (1993) The Eurasian suids (*Sus* and *Babyrousa*). Taxonomy and description. In: *Pigs, Peccaries, and Hippos: Status Survey and Conservation Action Plan* – Oliver W.L.R. (ed), International Union for the Conservation of Nature, Gland, Switzerland, 107-111

Comparative Genomics, URL: <http://comparativegenomics.illinois.edu/swine-genome-project>

D. Glowacz (2013) A mitkondriális DNS kontroll régiójának szekvencia variabilitása vaddisznókban. Szakdolgozat

E. A. Alacs, A. Georges, N. N. FitzSimmons and J. Robertson (2009) DNA detective - a review of molecular approaches to wildlife. In: Forensic Science Medicine and Pathology, 6(3): 180-94

F. Z. Boumendjel, G. E. M. Hajji and J. V. Z. Bouslama (2016) The Hunting Trends of Wild Boar (*Sus scrofa*) Hunters in Northeastern Algeria. In: Wildlife Biology in Practice, 12(2)

G. E. M. Hajji and F. E. Zachos (2011) Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal pronounced genetic structuring in Tunisian wild boar. In: European Journal of Wildlife Research, 57: 449-456

G. García, J. Vergara and R. Lombardi (2011) Genetic characterization and phylogeography of the wild boar *Sus scrofa* introduced into Uruguay. In: Genetics and Molecular Biology, 34(2): 329-337

GenBank, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9732457>

Gy. Fábrián, G. Rácz Fodor and J. Kelemen (2006) A hazai vadgazdálkodás helyzete és kilátásai. In: Gazdálkodás. - 50. évfolyam 15. külökiadás, 124-137

H. D. Nguyen, T. A. Bui, P. T. Nguyen, O. T. P. Kim, and T. T. B. Vo (2017) The complete mitochondrial genome sequence of the indigenous I pig (*Sus scrofa*) in Vietnam. In: Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 30(7): 930-937

Hungarowild vadászatszervező iroda, URL: <http://www.hungarowild.hu>

Hunting in Hungary, URL: <http://www.huntinghungary.hu>

- J, Ha, S, Kim, J, Lee, S, Lee, H, Lee, Y, Choi, H, Oh and Y, Yoon (2017) Identification of Pork Adulteration in Processed Meat Products Using the Developed Mitochondrial DNA-Based Primers. In: Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 37(3): 464-468
- J. C. Lee, L. Tsai, S. Liao, A. Linacre and H. Hsieh (2010) Evaluation of the polymorphic D-loop of *Columbia liviain* forensic applications. In: Electrophoresis, 31(23-24): 3889-3894
- J. C. St. John and T. Tsai (2018) The association of mitochondrial DNA haplotypes and phenotypic traits in pigs. In: BMC Genetics, 19(1): 41
- J. Fickel and U. Hohmann (2006) A methodological approach for non-invasive sampling for population size estimates in wild boars (*Sus scrofa*). In: European Journal of Wildlife Research, 52: 28-33
- K. Imaizumi, T. Akutsu, S. Miyasaka and M. Yoshino (2007) Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA. In: International Journal of Legal Medicine, 121(3): 184-191
- L. B. Schook, J. E. Beever, J. Rogers, S. Humphray, A. Archibald, P. Chardon, D. Milan, G. Rohrer and K. Eversole (2005) Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC): a strategic roadmap for sequencing the pig genome. In: Comparative Functional Genomics, 6: 251-255
- L. Excoffier and H. E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. In: Molecular Ecology Resources, 10(3): 564–567
- M. A. M. Groenen (2016) A decade of pig genome sequencing: a window on pig domestication and evolution. In: Genetics Selection Evolution, 48:23
- M. A. M. Groenen, A. L. Archibald, H. Uenishi, C. K. Tuggle, Y. Takeuchi, M. F. Rothschild, C. Rogel-Gaillard, C. Park, D. Milan, H. Megens, et al., (2012) Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. In: Nature, 491(7424): 393-398
- M. A. Menotti-Raymond, V. A. David. and S. J. O'Brien (1997) Pet cat hair implicates murder suspect. In: Nature, 386(6627): 774
- M. M. M. Ahmed, S. M. Abdel-Rahman and A. A. El-Hanafy (2007) Application of Species-Specific Polymerase Chain Reaction and Cytocrome b Gene for Different Meat Species Authentication: Biotechnology, 6(3): 426-430
- M. Satoh and T. Kuroiwa (1991) Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of human cell. In: Experimental Cell Research, 196(1): 137-140

Magyar Közlöny, 2017. évi 70.szám URL: <http://www.magyarkozlony.hu/dokumentumok/476eac71068faf5882d6b485dac715122eafab3f/megtekintes#13;2017.%20C3%A9vi%2070>.

Magyar Rendőrség hivatalos honlapja, URL: <http://www.police.hu/hu/hirek-es-informaciok/legfrissebb-hireink/bunugyek/orizetben-az-orvvadasz>

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet - Genomikai Főosztály Alkalmazott Vad és Haszonállat Genomikai Csoport, URL: <https://abc.naik.hu/szervezeti-egysegek/mbk-genomikai-foosztaly-alkalmazott-vad-es-haszonallat-genomikai-csoport>

N. Howell (1997) mtDNA Recombination: What do in vitro data mean? – Invited Correspondence. In: American Journal of Human Genetics, 61(1): 18-22

N. S. Karabasanavar, S. P. Singh, D. Kumar and S. N. Shebannavar (2014) Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop. In: Food Chemistry, 145: 530-534

N. V. Morf, K.L. Wood, R. Köppel, N. Felderer, M. Daniels, B. Tenger and A. Kratzer (2013) A multiplex PCR method to identify bushmeat species in wildlife forensics. In: Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 4(1): 202-203

N. Veličković, M. Djan, E. Ferreira, M. Stergar, D. Obreht, V. Maletić and C. Fonseca (2015) From north to south and back: the role of the Balkans and other southern peninsulas in the recolonization of Europe by wild boar. In: Journal of Biogeography, 42(4): 716-728

Nemzeti Agrárgazdasági Kamara, URL: <https://www.nak.hu/agazati-hirek/mezogazdasag/148-erdo-es-vadgazdalkodas/96148-uj-foallatorvosi-hatarozat-keszul-az-asp-megelozese-erdekeben>

Netjogtár, BTK 245. §, URL: <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=A1200100.TV>

Országos Magyar Vadászkamara, URL: <http://omvk.hu>

Országos Vadgazdálkodási Adattár, URL: <http://www.ova.info.hu>

P. Alexandri, A. Triantafyllidis, S. Papakostas, E. Chatzinikos, P. Platis, N. Papageorgiou, G. Larson, T. J. Abatzopoulos and C. Triantaphyllidis (2012) The Balkans and the colonization of Europe: the post-glacial range expansion of the wild boar, *Sus scrofa*. In: Journal of Biogeography, 39(4): 713-723

P. Aravena, O. Skewes and N. Gouin (2015) Mitochondrial DNA diversity of feral pigs from Karukinka Natural Park, Tierra del Fuego Island, Chile. In: Genetics and Molecular Research, 14(2): 4245-4257

P. Zenke, B. Egyed, Zs. Pádár (2017) Wildlife protection: demonstrability of wildlife crime with forensic DNA analysis - Casework applications. In: Hungarian Veterinary Journal, 139(10): 631-639

P. Zenke, B. Egyed, Zs. Pádár, G. Kovacs (2015) Increasing relevance of non-human genetics in Hungarian forensic practice. In: Forensic Science International: Genetics Supplement Series 5: 250-252

Primer Designer 4.00 Scientific and educational software, URL: <http://www.scied.com>

R. Caniglia, E. Fabbri, C. Greco, M. Galaverni and E. Randi (2010) Forensic DNA against wildlife poaching: Identification of a serialwolf killing in Italy. In: Forensic Science International: Genetics, 4: 334-338

R. E. Giles., H. Blanc, H. M. Cann and D. C. Wallace (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 77(11): 6715-6719

R. N. Johnson, L. Wilson-Wilde and A. Linacre (2014) Current and future directions of DNA in wildlife forensic science. In: Forensic Science International: Genetics, 10(1): 1-11

R. Panday, D. K. Jha, N. Thapa, B. R. Pokharel and N. K. Aryal (2014) Forensic Wildlife Parts and their Product Identification and Individualization Using DNA Barcoding. In: The Open Forensic Science Journal, 7: 6-13

S. S. Tobe and A. Linacre (2010) DNA typing in wildlife crime: recent developments in species identification. In: Forensic Science, Medicine and Pathology, 6(3): 195-206

SeqOmics Biotechnológiai Kft., URL: <http://www.seqomics.hu>

T. Melton and C. Holland (2007) Routine Forensic Use of the Mitochondrial 12S Ribosomal RNA Gene for Species Identification. In: Journal of Forensic Sciences, 52(6): 1305-1307

The Nobel Prize, URL: <https://www.nobelprize.org>

X. Chen, R. Prosser, S. Simonetti, J. Sadlock, G. Jagiello and E. A. Schon (1995) Rearranged Mitochondrial Genomes Are Present in Human Oocytes. In: American Journal of Human Genetics, 57(2): 239-247

Y. Demirbaş, A. Ö. Koca, N. Pamukoğlu, H. Sert and F. Suchentrunk (2016) Mitochondrial DNA control region variability of wild boar *Sus scrofa* with various external phenotypes in Turkey. In: Turkish Journal of Zoology, 40: 957-971

Y. N. Jiang, C. Y. Wu, C. Y. Huang, H. P. Chu, M. W. Ke, M. S. Kung, K. Y. Li, C. H. Wang, S. H. Li, Y. Wang, and Y. T. Ju (2008) Interpopulation and intrapopulation maternal lineage genetics of the Lanyu pig (*Sus scrofa*) by analysis of mitochondrial cytochrome b and control region sequences. In: Journal of Animal Science, 86(10): 2461-2470

Z. Szabolcsi, B. Egyed, P. Zenke, Zs. Padar, A. Borsy, et al. (2014) Constructing STR multiplexes for individual identification of Hungarian Red Deer. In: Journal of Forensic Sciences, 59(4): 1090-1099

Zs. Padar, M. Angyal, B. Egyed, S. Füredi, J. Woller, L. Zöldág, S. Gy. Fekete (2001) Canine microsatellite polymorphisms as the resolution of an illegal animal death case in a Hungarian Zoological Gardens. In: International Journal of Legal Medicine, 115(2): 79-81

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Zenke Petrának a dolgozat elkészítéséhez nyújtott rengeteg segítségéért és a hasznos tanácsokért mind a munka laboratóriumi részében mind pedig a kutatás megírásának folyamatában.

Emellett köszönet illeti az Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállattudományi Tanszékről Dr. Gáspárdy András tanszékvezető urat, hogy bekapcsolódhattam a tanszék egyik kutatásába és Keindl Ágnes, amiért bevezetett a laboratóriumi munka világába és türelemmel válaszolt a kérdéseimre (a nyári hőség viszontagságai ellenére is).

Szeretnék köszönetet mondani minden vadásznak, aki mintákkal látott el, így segítve a munkám létrejöttét.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom a családomnak és a barátaimnak, akik a nap huszonnégy órájában támogatnak, és mindig ott vannak nekem, ha szükségem van egy kis lelkesítésre vagy egy segítő kézre.

A dolgozat az Állatorvostudományi Egyetem (ÁTE) normatív kutatásfinanszírozás (NKB) címen 2017. évben meghirdetett belső pályázat támogatásával készült.

1. melléklet **Konzulensi ellenjegyzés**

Alulírott **Dr. Zenke Petra**, igazolom, hogy **Pintér Zita** (hallgató neve),
**Vaddisznók (Sus scrofa) mitokondriális haplotípusának igazságügyi célú
vizsgálata** című diplomamunkát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak
tartom.

Budapest, 2020.11.04.



.....
a témavezető neve és aláírása

Állattenyésztési, Takarmányozástani és

Laborállat-tudományi tanszék

NYILATKOZAT

Alulírott **Pintér Zita** nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe **Vaddisznók (Sus scrofa) mitokondriális haplotípusának igazságügyi célú vizsgálata** tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2018. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2020.11.04.

.....
Pintér Zita

a hallgató neve és aláírása

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI
NYILATKOZAT*

Név: Pintér Zita

Elérhetőség (e-mail cím): pinzita@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Vaddisznók (Sus scrofa) mitokondriális haplotípusának igazságügyi célú vizsgálata

A mű megjelenési adatai: Diplomamunka, 2020

Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtől PDF formára konvertálja és szolgáltassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyv- tárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott, illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2020. év 11. hó 04. nap

Pinter Zita

aláírás
szerző/a szerzői jog
tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és

-történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*