

Genotipizacija konja – utvrđivanje identiteta spornog ždrebeta

Horse genotyping - identification of the disputed foal



Lorber, M., K. Starčević, M. Maurić, M. Cotman, P. Džaja, K. Severin*

Sažetak

Korištenje visokospecifičnih mikrosatelitskih biljega od velikog je značenja u postupcima individualne identifikacije jedinke. U današnje vrijeme, kada se radi o visokovrijednim životinjama, nerijetko se traži provjera rodoslovlja putem DNA profila, tj. utvrđivanje istinitosti pedigrea (specijalno jamstvo kao preduvjet kupoprodaje, ustanovljenje prijevarne radnje kao preduvjet razvrgnuća kupoprodaje). Upravo je metoda genotipizacija temeljem 17 mikrosatelita, koji su dio standardizirane liste biljega za genetičko profiliranje konja Međunarodne udruge za animalnu genetiku (ISAG), postala temelj pouzdanog dokaza identiteta jedinke i njezina podrijetla. Premda je u prikazanom slučaju zahtjev za utvrđivanjem očinstva spornog ždrebeta proizašao iz zahtjeva suda, svrha njegova dokazivanja proizlazi iz obveze posjednika da u propisanom roku dostavi podatke o oždrebljenju kako bi se ispunile pretpostavke za registraciju odnosno izdavanje potvrde identiteta. Za potrebe vještačenja genotipizirana su dva sporna pastuha, kobilica i ždrijebe, te su kod svih utvrđeni potpuni DNA profili čime se nesporno utvrdilo podrijetlo ždrebeta, ali i nepodudarnost između kobila i pastuha za kojega se smatralo da je njezin otac.

Ključne riječi: genotipizacija konja, ISAG, identifikacija, sudski slučaj

Abstract

Using highly specific microsatellite markers is very important in procedures for the individual identification of individual animals. In modern times, in the case of highly valuable animals, very often verification of pedigree is requested using a DNA profile, that is, establishment of the veracity of the pedigree (a specific guarantee as a pre-requisite for a sale, or establishing fraud as a prerequisite for cancelling a sale). Precisely the method of genotyping based on 17 microsatellites which are part of the standardised list of markers for genetic profiling of horses of the International Society of Animal Genetics (the ISAG) has become the foundation for reliable proof of the identity of individual animals and their origin. Although in the case presented the request for establishing the paternity of the disputed foal was based on a court order, the purpose of the request stemmed from the obligation of the owner to furnish data on foaling within the prescribed period of time in order for the requirements to be met for registration or the issue of a certificate of identity. For the purposes of expertise two disputed stallions, the mare and the foal were

Mario LORBER, dr. med. vet., dr. sc. Kristina STARČEVIĆ, dipl. ing. kem. teh., viši znanstveni suradnik, dr. sc. Maja MAURIĆ, dr. med. vet., docentica, dr. sc. Petar DŽAJA, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Krešimir SERVERIN, dr. med. vet., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Marko COTMAN, dr. med. vet., Laboratorij za molekularnu biologiju i molekularnu genetiku, Instituta za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Ljubljani. *Autor za korespondenciju: severin@vef.hr

genotyped, and for all of them a full DNA profile was established, whereby the origin of the foal was established without doubt, but also the lack of a match between the mare and the stallion which was believed to be her father.

Key words: horse genotyping, ISAG, identification, court case

Uvod

Genotipizacija konja danas je rutinska metoda koja se provodi diljem svijeta u svrhu utvrđivanja očinstva, analize rodoslovlja te razne druge forenzičke svrhe (van de Goor i sur., 2009.). Za sam je postupak dovoljna mala količina DNK, koja može biti i u degradiranom obliku, što je i pridonijelo tako širokoj uporabi ove metode (Ruitberg i sur., 2001.).

Tehnologija DNK genotipizacije koristi se postupkom lančane reakcije polimeraze (engl. polymerase chain reaction, PCR) za detekciju STR (engl. Short Tandem Repeat) biljega. To je postupak koji se temelji na analizi kratkih tandemskih ponavljajućih sekvencija unutar jezgrine DNK (Severin, 2014.). STR biljezi nazivaju se još i mikrosatelitima.

Mikrosateliti

Mikrosateliti su kratke ponavljajuće sekvencije dužine 2 - 6 baznih parova (bp) koje se na definiranom lokusu ponavljaju određen broj puta (Ruitberg i sur., 2001.). S obzirom na različit broj ponavljanja tih kratkih sekvencija, njihova ukupna dužina može biti od nekoliko desetaka do nekoliko stotina nukleotida. Razlika u broju ponavljanja tih parova baza ili njihove izmjene čini osnovu za utvrđivanje identiteta jedinke. Činjenica da u DNK postoje kraći ili duži sljedovi, čiji je broj ponavljanja različit među jedinkama iste vrste, osobito je važna sa stanovišta molekularne identifikacije (Severin, 2014.).

U diploidnih vrsta, poput kralježnjaka, dvije su kopije svakoga mikrosatelitskog biljega prisutne u svake jedinke. U homozigota te su kopije iste dužine (imaju identične alele na određenom lokusu u paru homolognih kromosoma) dok su različite dužine u heterozigota (imaju dva različita alela na određenom lokusu na paru homolognih kromosoma) (Severin, 2014.). Zahvaljujući visokoj razini polimorfizma i zakonima Mendelova nasljeđivanja, mikrosateliti su kao biljezi postali osnova za utvrđivanje očinstva u konja te identifikaciju jedinki (Anonymous, 2012.).

Svojstva koja su poželjna za mikrosatelitske biljege jesu:

1. Izražena učestalost heterozigotnosti
2. Jasno definirani ponavljajući nizovi
3. Jasno određene alelne varijante

4. Jednostavno i pouzdano umnažanje (Primorac i Marjanović, 2008.).

DNK profil

Utvrđivanje DNK profila neke jedinke provodi se analizom određenog broja mikrosatelitskih lokusa koji su karakteristični za tu vrstu. S obzirom na to da je vjerojatnost istog DNK profila u različitim jedinki manja što je broj promatranih lokusa veći, odabiru se genski lokusi koji su polimorfni i nisu smješteni na istom kromosomu. Ti se biljezi nasljeđuju s jedne generacije na drugu te se stoga DNK profil može upotrijebiti za potvrđivanje ili isključivanje roditeljstva, tj. podudarnosti između potomka i roditelja (Severin, 2014.).

Temeljem Mendelovih zakona u svrhu utvrđivanja očinstva sastavljena su četiri pravila:

1. Potomak, osim ako se ne radi o mutaciji, ne može imati biljeg (alel) koji nije prisutan kod jednog od roditelja.
2. Potomak mora naslijediti po jedan biljeg (alel) iz para genskih biljega od svakog roditelja.
3. Potomak ne može imati par istih genskih biljega, osim u slučaju da oba roditelja imaju isti biljeg.
4. Potomak mora imati genski biljeg koji je prisutan kao istovjetan par u oba roditelja (Primorac i Marjanović, 2008.).

Genotipizacija konja

Međunarodna udruga za animalnu genetiku (engl. International Society of Animal Genetics, ISAG) razvila je standardiziranu listu (panel) biljega za genetičko profiliranje konja kako bi se različita istraživanja mogla međusobno uspoređivati (Anonymous, 2018.). Na toj se listi nalazi 20 lokusa: AHT4, AHT5, HMS1, HMS2, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, VHL20, ASB2, HMS3, HTG10, ASB17, ASB23, LEX33, LEX3, CA425, UMO11 i AME. Trenutačno su na tržištu dostupni komercijalni kitovi koji umnažaju 17 (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3 i VHL20) od 20 preporučenih lokusa s liste ISAG-a. Primjenu navedenih 17 mikrosatelita u svrhu genotipizacije konja preporučuju i van de Goor i suradnici (2011.), a danas se oni naširoko rabe za utvrđivanje očinstva.

Svih 17 mikrosatelita u konja jesu dinukleotidni mikrosateliti (slijed ponavljanja sastoji se od dviju baza) (Anonymous, 2012.). Tako je u lokusu AHT5 sekvencirano 4 alela (16, 17, 19 i 20) pri čemu su oni očitivali dinukleotidnu ponavljajuću strukturu (GT)_n (n – broj ponavljanja određene sekvencije), dok je primjerice na lokusu ASB17 sekvencirano 6 alela (14, 18, 20, 21, 22 i 25) pri čemu je uočeno ponavljanje dinukleotidne sekvencije (AC)_n (van de Goor i sur., 2009.). Broj ponavljanja razlikuje se od jedinke do jedinke, no nije neuobičajeno da dvije jedinke imaju iste alelne varijante na promatranom lokusu, i da se čak poklapaju na dvama ili trima lokusima. Veliku vrijednost tipizacije mikrosatelita obilježava jednostavnost i brzina, kao i mogućnost istodobnog promatranja više od 10 mikrosatelita (Primorac i Marjanović, 2008.).

Na temelju njihove polimorfности, očekivane i testovima ustanovljene heterozigotnosti i vjerojatnosti identiteta, utvrđeno je da oni posjeduju dovoljnu snagu isključenja i stoga se mogu objektivno primijeniti u svrhu forenzičkih analiza u gotovo svih pasmina konja. Takav oblik DNK genotipizacijske tehnologije pretraživanog uzorka odnosno identifikacije jedinke STR tipizacijom te odgovarajućom statističkom analizom označuje iznimno pouzdanu metodu za ustanovljavanje očinstva u konja (Chen i sur., 2010.).

Materijali i metode

Zahtjev suda i podaci iz sudskog spisa

Temeljem rješenja jednog općinskog suda određeno je veterinarsko vještačenje u pravnoj stvari tužiteljice L. S. protiv tuženice L. B., radi naknade štete. Jedan od zadataka vještačenja bilo je utvrđivanje identiteta ždrebeta usporedbom uzoraka DNK od kobile, ždrebeta i svih pastuha koji su se tog dana nalazili na posjedu tužene na pansionu. Vještačenje se povjerilo Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, i to stalnim sudskim vještacima za veterinarsku medicinu, djelatnicima Zavoda za sudsko i upravno veterinarstvo.

U tužbi se navodi da je tužena L. B. u svom posjedu držala kobilu pasmine hrvatski kasač, koja je 7. kolovoza 2015. godine zadobila tjelesne ozljede glave, vrata i noge upetljavanjem u konop. Nakon oporavka od ozljede, koji je trajao pet mjeseci, tužiteljica je ustanovila da je kobilu ostala ždriježna tijekom svog boravka u pansionu tužene, iako je njezina izričita volja bila da kobilu nije za rasplod, ponajviše temeljem činjenice da je prva ždriježnost 2013. godine završila induciranim pobačajem mrtvog ždrebeta. Najme, tada je ustanovljeno da je kobilu bila

zaražena virusnom infekcijom – rinopneumonitisom konja. Prema navodu tužiteljice u oba je slučaja došlo do neplanirane gravidnosti radi nepažnje tužene. Nakon druge ždriježnosti rađa se živo ždriježbe, te je tužiteljica u obvezi da u propisanom roku od datuma ždriježljenja kobile prijavi ždriježljenje. Tužiteljici je potreban pripusni dnevnik pastuha u kojemu pastuhar mora prijaviti pripust pastuha na kobilu. Tužena odbija, kao i krajem 2013. g., predočiti tužiteljici pripusni dnevnik. Zbog toga tužiteljica inzistira da tužena imenuje pastuha koji je oplodio kobilu, odnosno ako to nije moguće, traži utvrđivanje identiteta spornog ždrebeta.

Životinje

Za potrebe ovog vještačenja uzorkovana su 4 konja – pastuh 1 (njemački kasač; oznaka LB2), pastuh 2 (lipicanac; oznaka LB4), kobilu (oznaka LS1) i ždriježbe nepoznata očinstva (oznaka LS2). Pomoću čitača mikročipova (Mini Max II, Bayer) očitani su identifikacijski brojevi mikročipova svake pojedine životinje. Za potrebe DNK analize uzeti su uzorci krvi punkcijom vene.

Tijekom službenog prikupljanja uzoraka tužena, u čijem su se posjedu nalazili pastusi, dala je na uvid za pastuha 1 Pferdepass i Potvrdu o vlasništvu u kojoj su navedeni identifikacijski broj, broj mikročipa i ime vlasnika te Identifikacijski list kopitara i Potvrdu o vlasništvu za pastuha 2 u kojoj su navedeni identifikacijski broj, broj mikročipa i ime vlasnika. Isto tako, tužiteljica je dala na uvid Identifikacijski list kopitara i Potvrdu o vlasništvu u kojoj su navedeni identifikacijski broj, broj mikročipa i ime vlasnika kobile. Iz zbog objektivnih razloga, nepoznata očinstva, navedena dokumentacija ne postoji za ždriježbe. Iz priložene dokumentacije proizlazi da je pastuh 1 otac kobile, a time i djed ždrebetu.

Izolacija genomske DNK i umnažanje mikrosatelitskih biljega lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i detekcija mikrosatelita

Genomska DNK izolirana je primjenom kita za izolaciju DNK EZ-10 spin column genomic DNA (Bio Basic Inc., Canada) i primjenom postupka za izolaciju DNK iz pune krvi (EZ-10 spin column genomic DNA Handbook). Konačni volumen izolirane DNK bio je 30 µL. Koncentracija DNK uzoraka: LS1 – 145 ng/µL, LS2 – 248 ng/µL, LS3 – 10 ng/µL i LS4 – 8 ng/µL.

Nakon izolacije združenom PCR reakcijom umnoženo je 17 mikrosatelitskih lokusa komercijalnim kitom StockMarks for Horses Kit Equine (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. Korišteni lokusi bili su slijedeći: VHL20, HTG4, AHT4, HMS7,

Tablica 1. Rezultati genotipizacije jedinki LS1, LS2, LB2 i LB4.

	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	HTG10	HTG7	HMS3	HMS2	HTG6
LS1	N/R	F/M	I/M	N/O	K/R	N/O	N/P	L/M	O/P
LS2	N/Q	M/M	I/M	N/O	K/R	N/O	N/R	L/M	J/P
LB2	N/R	N/N	J/M	J/K	I/I	M/O	P/P	K/L	G/J
LB4	N/Q	M/M	M/M	N/N	I/R	K/N	R/R	L/L	J/O
	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	
LS1	K/N	J/K	J/K	K/Q	I/L	K/Q	K/K	L/N	
LS2	N/N	J/J	J/J	K/Q	I/M	M/Q	K/O	L/N	
LB2	L/O	P/P	I/S	O/P	M/R	K/N	K/O	L/L	
LB4	N/N	J/L	J/L	K/K	M/M	K/M	O/O	L/L	

HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1 i CA425. Združena PCR reakcija provedena je u volumenu od 10 µL. Osim umnažanja uzoraka napravljena je i po jedna pozitivna i negativna kontrola.

Umnoženi mikrosateliti detektirani su kapilarnom elektroforezom na uređaju ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Veličina fragmenata određena je na osnovi standarda poznate molekularne mase (GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard) programom ABI Prism GeneMapperID-X.

Rezultati

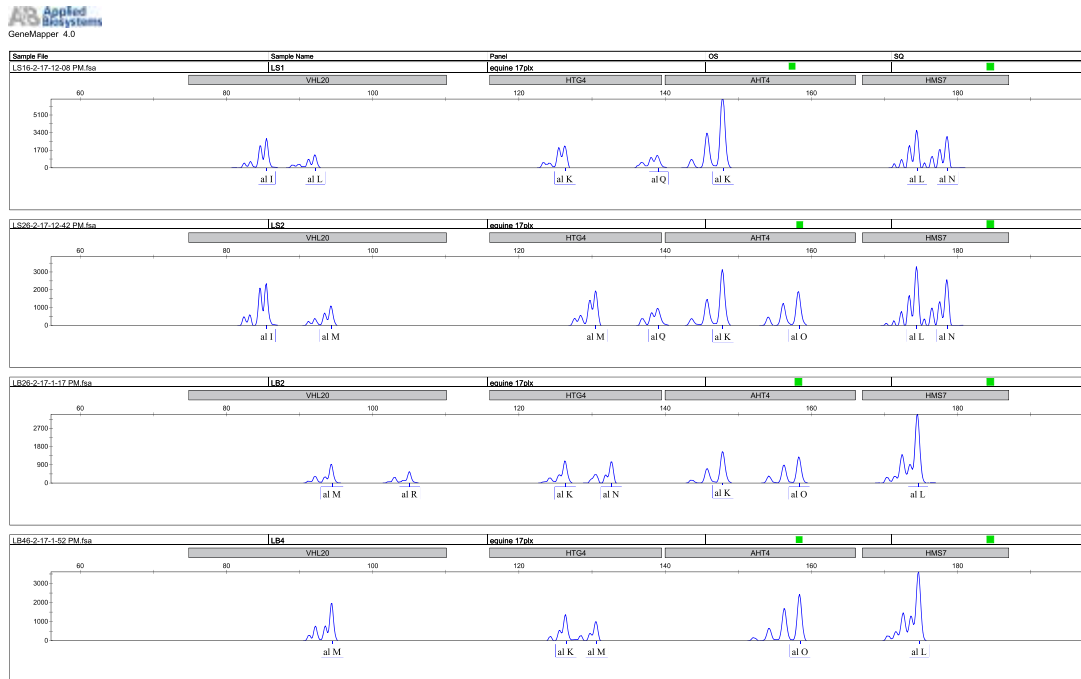
Rezultati genotipizacije spornih jedinki utvrđivanjem jedinstvenog DNK profila umnožavanjem seta mikrosatelita važnih za vrstu lančanom reakcijom polimeraze prikazani su u tablici 1 i na slici 1. Podudaranja mikrosatelitskog profila u uzorcima LS1, LS2 i LB4 pokazuju da za konje postoji srodnost (podebljana slova). Roditelji ždrebeta LS2 jesu pastuh LB4 i kobilica LS1. Također, potrebno je napomenuti da je iz prikazanih profila vidljivo da pastuh 1 zasigurno nije otac kobile, a time ni djed tog ždrebeta.

Prilikom tumačenja rezultata također je potrebno naglasiti da postoji mogućnost mutacija mikrosatelita. Udio mutacija koji je specifičan za određeni mikrosatelit (lokus) računa temeljem provedenih analiza učestalosti mutacija velikog broja DNK profila populacije. Ustanovi li se da se od desetak pretraživanih u dva mikrosatelitska lokusa uoče aleli koji

nisu prisutni u roditelja, roditeljstvo bi trebalo isključiti (Anonymous, 2014.).

Zaključci

Utvrđivanje očinstva provodi se vrlo uspješno i pouzdano zahvaljujući razvoju DNK tehnologije. Kako bi rezultati provedenih DNK analiza bili relevantni, iznimno je važno brižljivo prikupljanje uzoraka prema načelima zaštite dokaznog materijala, što uključuje i uspostavu nadzora kretanja. Stoga su uzorci prikupljeni od službenih osoba, o čemu je sastavljen zapisnik te su do okončanja analize bili pod nadzorom jednog od vještaka. U konačnici treba imati na umu da će svaki rezultat identifikacijskog postupka biti pomno razmotren od stranke u, primjerice, sudskom postupku, te će se tražiti jamstvo vjerodostojnosti. Pri testiranju roditeljstva to se čini tako da se odredi obvezni alel pa se testira nosi li navodni ili pretpostavljeni otac taj alel. U konkretnom slučaju utvrđen je identitet ždrebeta nepoznatog oca primjenom 17 odabranih biljega za genetičko profiliranje konja prema preporuci ISAG-a. Ovim načinom identifikacije nesporno je utvrđen otac ždrebeta. Isto tako, premda je jedan od spornih očeva (pastuh 2) ujedno bio i djed ždrebeta, bilo je za očekivati podudaranje jednoga od alela na istraživanim lokusima između njega i kobile (majke ždrebeta). No upravo suprotno, u ovom je postupku utvrđena nepodudarnost kobile i njezina oca čime je dovedena u pitanje vjerodostojnost dokumentacije kojom se jamči podrijetlo kobile,



Slika 1. Usporedni prikaz elektroferograma jedinka LS1, LS2, LB2 i LB4 na lokusi VHL20, HTG4, AHT4 i HMS7 obilježeni plavom bojom 6-FAM.

a time i potomaka. Nadalje, u ovakvim je slučajevima nužno ispuniti preduvjete kao što je validacija i standardizacija metode te osigurati sustav kvalitete u laboratorijima u kojima će se postupci identifikacije izvoditi (Severin, 2013.). Osim ispunjenja navedenog, provedenim postupkom osigurana je ponovljivost analiza jer su istraživani uzorci, po različitim fazama provedbe, sačuvani i pohranjeni ako bi se posumnjalo u istinitost rezultata.

Literatura

- ANONYMOUS (2012): Thermo Scientific equine genotypes panel 1. 1 technical manual. Thermo Scientific Inc. Waltham.
- ANONYMOUS (2014): Stockmarks for horse, cattle, and dog genotyping kit user guide. Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham.
- ANONYMOUS (2018): The ISAG Profile for Canine and Equine DNA Testing. [citirano 16. travnja 2018.]. Dostupno na: <https://animalgenetics.us/wordpress/2013/11/the-isag-profile-for-canine-and-equine-dna-testing/>
- CHEN, J – W., C. E. UBOH, L. R. SOMA, X. LI, F. GUAN, Y. YOU, Y. LIU (2010): Identification of racehorse and sample contamination by novel 24 – plex STR system. *Forensic Sci. Int-Gen.* 4, 158-167.
- DIMSOSKI, P. (2003): Development of a 17 – plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. *Croat. Med. J.* 44, 332–335.
- PRIMORAC, D., D. MARJANOVIĆ (2008): Analize DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Medicinska naklada. Zagreb.
- SEVERIN, K., P. DŽAJA, M. NOVOKMET, D. KONJEVIĆ, S. KUŽIR, A. GUDAN KURILJ, N. ZDOLEC, I. FURAČ, M. KUBAT, E. ŠATROVIĆ, B. MIOČ, Ž. GRABAREVIĆ (2013): Značenje identifikacije kralježnjaka u sudskom veterinarstvu. *Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis.* 44, 119-133.
- SEVERIN, K. (2014): Odabrane tematske cjeline: prepoznavanje bioloških tragova u sudskom veterinarstvu; primjeri iz sudske prakse. Nastavni materijal za obvezni predmet Sudsko veterinarstvo i izborni predmet Biološki tragovi i dokazi u sudskom veterinarstvu integriranog preddiplomskog i diplomskog studija Veterinarske medicine. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
- VAN DE GOOR, L. H. P., H. PANNERMAN, W. A. van HAERINGEN (2009): A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 – specifi STR loci. *Anim. Genet.* 41, 122-127.
- VAN DE GOOR, L. H. P., W. A. van HAERINGEN, J. A. LENSTRA (2011): Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis. *Anim. Genet.* 42, 627-633.