



Praca oryginalna
Original paper

Aneta Alama, Anna Jonkisz, Miron Tokarski, Małgorzata Małodobra-Mazur, Arleta Lebioda,
Elżbieta Kowalczyk, Tadeusz Dobosz

Wstępna analiza polimorfizmu markerów typu STR w populacji kotów domowych (*Felis catus*) na terenie Dolnego Śląska

Preliminary analysis of polymorphism of STR markers in the population of domestic cats (*Felis catus*) in Lower Silesia

Zakład Technik Molekularnych, Katedra Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska
Department of Molecular Techniques, Chair of Forensic Medicine, Wrocław Medical University, Poland

Streszczenie

Cel pracy: Badania genetyczne odgrywają niezwykle ważną rolę w procesie dochodzeniowym, stanowiąc często najistotniejszy dowód decydujący o rozstrzygnięciu sprawy. Mimo że większość analiz genetycznych przeprowadzanych w kryminalistyce dotyczy materiału ludzkiego, to identyfikacja genetyczna zwierząt staje się coraz powszechniejsza. Przebywające w otoczeniu człowieka zwierzęta domowe bywają niekiedy niemymi świadkami, a nawet obiektami działań przestępczych. Ich potencjalnie ograniczona rola dowodowa w takich sprawach może ulec zmianie dzięki możliwości wykorzystania zwierzęcych śladów pozostawionych na miejscu zbrodni. Tego rodzaju metody mogą stać się też wartościowym narzędziem w wielu innych dziedzinach. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania procesem ustalania wiarygodności pochodzenia zwierząt z określonej hodowli, przeciwdziałaniem kłusownictwu i nielegalnemu odstrzałowi zwierząt, np. chronionych żbików i rysi, a także nielegalnej sprzedaży zwierząt. Głównym celem przeprowadzonych badań była ocena stopnia polimorfizmu analizowanych markerów STR w kocim materiale genetycznym oraz określenie ich przydatności do stworzenia autorskiego testu na potrzeby identyfikacji genetycznej kotów.

Materiał i metody: Przeprowadzone badania obejmowały analizę populacji kotów, która liczyła 123 niespokrewnione ze sobą osobniki reprezentujące różne rasy kotów domowych zamieszkujących teren Dolnego Śląska. Materiał w postaci kropli krwi lub wymazu z wewnętrznej strony policzka danego osobnika został poddany analizie pod kątem pięciu markerów STR za pomocą jednego testu typu multipleks (FCA742, FCA744, F124, FCA732, FCA749).

Wyniki: Otrzymane wyniki dla każdego markera z osobna poddano analizie statystycznej i za pomocą testu χ^2 oceniono zgodność badanej populacji w zakresie danego markera z prawem Hardy'ego-Weinberga.

Wnioski: Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał analizowanych markerów, pozwalający na wykorzystanie ich w badaniach identyfikacyjnych.

Słowa kluczowe: medycyna sądowa, genetyczna identyfikacja zwierząt, markery STR.

Abstract

Aim of the study: Genetic tests play a crucial role in the crime investigation process and often provide the strongest evidence for case resolution. Although the majority of genetic analyses in the field of criminalistics focus on the human DNA, genetic identification of animals is becoming an increasingly common procedure. Domestic animals, which live around people, may be silent witnesses and even victims of criminal activity. Their typically limited value as evidence in such cases could radically change thanks to the possibility of using animal biological material present at the crime

scene. In addition to forensic medicine, genetic identification methods of this type may also become a valuable tool in many other areas of life. Recently, there has been an increase in public interest in verifying the pedigree of animals, investigating poaching and illegal shooting of animals, e.g. protected wildcats and lynx, as well as illegal trade in animals. The main aims of the studies reported in this paper were to assess the degree of polymorphism of the analyzed STR markers in feline genetic material, and to perform a preliminary evaluation of their suitability for developing an original feline genetic identification test.

Material and methods: The studies involved an analysis of genetic material samples obtained from a population consisting of 123 unrelated cats representing various domestic cat breeds, living in the Lower Silesia region. The material collected from individual cats in the form of blood drops or buccal swabs was subjected to an analysis of five STR markers forming a single multiplex assay (FCA742, FCA744, F124, FCA732, FCA749).

Results: The results obtained for each marker separately were analyzed statistically and, using the χ^2 test, the concordance of the study population with the Hardy-Weinberg principle was evaluated.

Conclusions: The findings demonstrate a significant potential of the analyzed markers for the development of genetic identification tests.

Key words: forensic medicine, genetic identification of animals, STR markers.

Wprowadzenie

Identyfikacja zwierząt na podstawie analizy materiału genetycznego staje się coraz powszechniejsza. Okazuje się, że tego rodzaju metody mogą mieć wartość w wielu dziedzinach życia, a zwłaszcza w medycynie sądowej. Wzrasta też społeczne zainteresowanie problemem ustalania wiarygodności pochodzenia zwierząt z określonej hodowli, przeciwdziałania kłusownictwu czy nielegalnemu odstrzałowi, np. chronionych żbików i rysi, a także nielegalnej sprzedaży zwierząt.

Zwierzęta domowe przebywające w bliskim otoczeniu człowieka bywają niekiedy niemymi świadkami, a nawet obiektami działań przestępczych. Ich potencjalnie ograniczona rola dowodowa w takich sprawach może ulec zmianie dzięki możliwości wykorzystania zwierzęcych śladów pozostawionych na miejscu zbrodni [1, 2]. Udokumentowane sprawy sądowe potwierdzają, że określenie pochodzenia pozostawionego na miejscu przestępstwa lub na odzieży podejrzanego biologicznego materiału zwierzęcego (sierści lub krwi) może stać się silnym dowodem w procesie dochodzeniowym. W takiej sytuacji ustalenie pochodzenia śladów biologicznych może ułatwić powiązanie danego przestępstwa z konkretną osobą, a nawet wskazać sprawcę [3–5]. Przeprowadzone symulacje kryminalistyczne z udziałem

Introduction

Identification of animals based on genetic material tests is becoming an increasingly common practice. It has been demonstrated that methods of this type could become a valuable instrument in many areas of life, particularly in forensic medicine. There has been an increase in public interest in verifying the pedigree of animals, investigating poaching and illegal shooting of animals, including protected wildcats and lynx, as well as illegal trade in animals.

Domestic animals, which live around people, may be silent witnesses and even victims of criminal activity. Their typically limited value as evidence in such cases could radically change thanks to the possibility of using animal biological material present at the crime scene [1, 2]. Documented court cases show that determining the origin of biological animal material (coat or blood) identified at the crime scene or on the clothing of suspects might serve as strong evidence throughout the crime investigation process. In such situations, demonstrating the origin of biological traces may be helpful in linking the crime to a specific individual and even indicate the perpetrator [3–5]. Forensic simulations with domestic animals witnessing burglaries and as-

zwierząt domowych będących świadkami włamań i napaści wykazały, że spora ilość zwierzęcej sierści przenosi się nie tylko w obrębie miejsca zbrodni, ale i poza nim, np. na ubraniach przestępców [6]. Potwierdza to dobrze opisana kanadyjska sprawa z 1995 r., w której analiza genetyczna kociego materiału biologicznego zaważyła na ostatecznym rozstrzygnięciu postępowania sądowego. Był to jeden z pierwszych udokumentowanych przypadków, w których analiza zwierzęcego DNA miała tak duży wpływ na przebieg dochodzenia i ostatecznie przyczyniła się do rozwiązania sprawy [6].

W świetle prawa zwierzę może być nie tylko świadkiem działań przestępczych, ale i ofiarą przemocy czy kradzieży. Zdarza się również, że odgrywa ono niechlubną rolę sprawcy, np. w przypadkach pogryzień czy napaści na ludzi [1].

Do identyfikacji zarówno ludzkiego, jak i zwierzęcego materiału genetycznego najczęściej wykorzystuje się mikrosatelity STR (*short tandem repeats*), które w związku z szybkim tempem mutacji generują odpowiednio wysoki polimorfizm. Analiza zestawu sekwencji mikrosatelitarnych w badanym DNA umożliwia poznanie indywidualnego profilu genetycznego danego osobnika [7–10]. Tego typu markery są używane w systemach multipleksowych opartych na znakowaniu fluorescencyjnym, które zostały opracowane do szybkiego i pewnego uzyskiwania produktów równoczesnej amplifikacji kilku do kilkunastu *loci* DNA izolowanego z próbek biologicznych [11].

Testy identyfikacyjne służące do analizy materiału genetycznego pochodzenia zwierzęcego stają się coraz bardziej popularne i dostępne. Na rynku światowym pojawiły się gotowe testy do identyfikacji określonych grup zwierząt, np. koni, psów czy bydła [12]. Podjęto również próby wystandaryzowania i stworzenia kocich testów identyfikacyjnych. W 17 komercyjnych i naukowych laboratoriach na całym świecie odbyły się badania porównawcze pod patronatem ISAG (*International Society for Animal Genetic*) mające na celu ustalenie pochodzenia i identyfikację DNA kotów domowych. Badania oparte były na analizie 19 mikrosatelit STR. Na podstawie wyników analizy porównawczej 9 z nich zostało ostatecznie wybranych do stworzenia testu o parametrach pozwalających na przeprowadzenie identyfikacji [13]. Do tej pory opracowano także test składający się z 11 markerów STR, przeznaczo-

sa, have shown that a considerable amount of animal coat is transferred within the crime scene, and also carried away from the site, for example on the criminal's clothing [6]. The validity of such experiments was corroborated in a well-documented criminal case in Canada in 1995, in which genetic analysis of feline biological material provided key evidence determining the outcome of court proceedings. It was one of the first documented court cases where the analysis of animal biological material contributed to such a significant extent to the progress of the investigation and even led to its resolution [6].

In the light of the law, animals can be not only witnesses of criminal activities, but also victims of violence or objects of theft. They can even have the infamous role of perpetrators, e.g. in cases of bites or assaults on people [1].

The genetic markers which are most commonly used for identification of both human and animal genetic material are microsatellites (short tandem repeats, STRs). On account of their rapid mutation rate, STRs generate an appropriately high level of polymorphism. An analysis of a set of microsatellite sequences in the studied DNA offers a possibility to identify the unique genetic profile of a given individual [7–10]. Markers of this type are used in multiplex systems based on fluorescent labelling, which are designed to generate, in a rapid and reliable manner, products of simultaneous amplification of several to about a dozen loci of DNA isolated from biological samples [11].

Identification tests for the analysis of genetic material of animal origin are more readily available and increasingly popular. Ready-to-use assays for the identification of specific animal groups (e.g. horses, dogs or cattle) are now commercially available across the world [12]. Attempts have also been undertaken to standardize and develop feline identification tests. Under the patronage of ISAG (*International Society for Animal Genetic*) comparative studies have been carried out in 17 commercial and scientific laboratories around the world to determine the origin and identify material obtained from domestic cats. The research was based on analyzing 19 microsatellites (STRs). The findings of the comparative analysis enabled the final selection

ny głównie do analiz w zakresie medycyny sądowej [14]. W 2014 r. podjęto próbę wystandaryzowania multiplexu obejmującego 14 mikrosatelit. Stworzono również drabinki alleliczne dla analizowanych STR [15]. Jak wynika z danych literaturowych, liczba dostępnych wystandaryzowanych testów identyfikacyjnych dla kotów nadal jest ograniczona. Ma to ogromne znaczenie, jeśli wyniki badań są sprzeczne i wymagają analizy uzupełniającej z wykorzystaniem dostępnych testów o innym układzie mikrosatelit.

Głównym celem przeprowadzonej analizy była ocena stopnia polimorfizmu markerów typu STR w populacji kotów domowych zamieszkujących teren Dolnego Śląska. Poprzez wyliczenie odpowiednich parametrów statystycznych podjęliśmy również próbę określenia potencjalnej przydatności analizowanych markerów do stworzenia autorskiego testu na potrzeby identyfikacji genetycznej kotów. Ponadto badana populacja została oceniona pod kątem jej zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga (H-W) w obrębie analizowanych fragmentów DNA.

Materiały i metody

Materiał biologiczny

Materiał genetyczny wykorzystany w badaniu populacyjnym pochodził od 123 niespokrewnionych ze sobą osobników reprezentujących różne rasy kotów domowych. Materiałem biologicznym, z którego izolowano DNA, była krew (102 próbki) w postaci plamy na bibule, tak aby ilość i jakość próbek były zbliżone do tych, jakie zazwyczaj są dostępne przy analizie kryminalistycznej. Krew została pobrana bezpośrednio z żyły bądź przez nakłucie opuszki palcowej badanych osobników. Wśród analizowanych próbek było również 21 wymazów z wewnętrznej strony policzka – w tym przypadku materiał genetyczny został wyizolowany z komórek nabłonka.

Materiał genetyczny z materiału biologicznego (krew, komórki nabłonka) kotów został wyizolowany metodą cheleksową z wykorzystaniem 5-procentowej zawiesiny cheleksu R100. Podstawą tej techniki jest zastosowanie żywicy jonowymiennej Chelex (*Chelating Ion-Exchange Resin*). Ludzki materiał genetyczny został wyizolowany z krwi pobranej na EDTA (z użyciem antykoagulantu) za pomocą

of 9 STRs for the purpose of developing a test with parameters sufficient for identification [13]. A test comprising 11 STR markers, dedicated primarily to analyses in the field of forensic medicine, has also been developed [14]. In 2014, an attempt was made to standardize a multiplex consisting of 14 microsatellites. Studies have also been conducted to construct allelic ladders for the analyzed STRs [15]. According to the literature data, the number of available standardized feline identification tests is still limited. This fact is extremely important when tests yield conflicting results that require supplementary analysis based on available assays using a different microsatellite array.

The main aim of the study reported in this paper was to assess the degree of polymorphism of the analyzed STR markers in the population of domestic cats living in Lower Silesia. By evaluating appropriate statistical parameters, an attempt was also made to determine the potential suitability of the analyzed markers for developing an original feline identification test. In addition, the studied population was assessed for concordance with the Hardy-Weinberg (H-W) principle within the analyzed DNA fragments.

Material and methods

Biological material

Genetic material analyzed in the population study was obtained from 123 unrelated cats representing various domestic cat breeds. The biological material used for DNA isolation was blood (102 samples) in the form of a blot on tissue paper, so that the quantity and quality of the analyzed material would be similar to those usually available for forensic analysis. Blood samples from cats included in the study were collected directly from the vein or by puncturing the animal's digital pad. The test samples also included 21 buccal swabs. In such cases, genetic material was isolated from epithelial cells.

Genetic material was isolated from feline biological samples (blood, epithelial cells) by the Chelex method using 5% suspension of Chelex R100. The technique is based on the Chelex resin (*Chelating Ion-Exchange Resin*). Human genetic material was

zestawu do izolacji DNA QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

Charakterystyka miejsc polimorficznych

Analizowane mikrosatelity zostały wybrane na podstawie dostępnych danych literaturowych. Z początkowo wytypowanych siedmiu markerów pięć par starterów w odpowiednich stężeniach dobrze współpracowało we wspólnej mieszaninie reakcyjnej [16–18]. Startery *forward* (F) z każdej użytej do multiplexu PCR pary zostały wyznakowane odpowiednimi barwnikami fluorescencyjnymi, co umożliwiło wizualizację i odczyt wyników. Startery z par dających podobne wielkości produktów zostały wyznakowane różnymi barwnikami (5-FAM, TAMRA, YOY), tak aby piki nie nakładały się na siebie, a odczyt końcowych wyników za pomocą elektroforezy był możliwy. Charakterystykę wybranych regionów mikrosatelitarnych zestawiono w tabeli I.

Optymalizacja multiplexu PCR

Multiplexowa reakcja amplifikacji przeprowadzona została w termocyklerze S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). Całkowita objętość pojedynczej próbki wynosiła 10 µl. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły następujące składniki: 1 µl mieszaniny par starterów, 5 µl QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 4 µl matrycy DNA lub wody dla kontroli ujemnej. Końcowe stężenia starterów w mieszaninie reakcyjnej wynosiły odpowiednio: FCA742 – 2 µM, FCA744 – 1 µM, FCA732 – 0,6 µM, F124 – 0,8 µM, FCA749 – 2 µM, natomiast stężenie matrycy DNA: 0,1 ng/µl. Objętość każdego składnika, podobnie jak stężenia starterów, została dobrana doświadczalnie na etapie optymalizacji warunków reakcji przeprowadzonej przed przystąpieniem do właściwych badań. Sekwen-

isolated from blood taken into EDTA by means of a QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) for DNA isolation.

Characteristics of polymorphic sites

The microsatellites analyzed in the study were selected on the basis of available literature data. From the initially selected seven markers, five primer pairs at appropriate concentrations were found to be compatible in the common reaction mixture [16–18]. The forward (F) primers from each pair included in multiplex PCR were labelled with appropriate fluorescent dyes to allow visualization and interpretation of results. Primers of pairs yielding similar product sizes were labelled with different dyes (5-FAM, TAMRA, YOY) so that the peaks would not overlap and the final results could be determined by electrophoresis. The characteristics of selected microsatellite regions are shown in Table I.

Optimization of multiplex PCR

Multiplex polymerase chain reaction was conducted using an S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). The total volume of a single sample was 10 µl. The reaction mixture contained the following components: 1 µl of a primer pair mix, 5 µl of QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 4 µl of DNA matrix or water for negative control. The final primer concentrations in the reaction mixture were: FCA742 – 2 µM, FCA744 – 1 µM, FCA732 – 0.6 µM, F124 – 0.8 µM and FCA749 – 2 µM, respectively, and the DNA matrix concentration was 0.1 ng/µl. The volume of each component, as well as primer concentrations, were selected experimentally at the stage of optimization of reaction conditions performed prior to

Tabela I. Zestaw pięciu markerów STR wybranych do multiplexu PCR [16, 17]

Table I. Set of five STR markers selected for multiplex PCR [16, 17]

Marker STR/STR marker	FCA742	FCA744	FCA732	F124	FCA749
Chromosom/Chromosome	D4	D4	B2	E1	F2
Jednostka repetytywna/Repetitive unit	CTTT	GATA	ATCT	GAAA	GATA
Znacznik fluorescencyjny (barwa)/ Fluorescent dyes (colour)	5-FAM (niebieski) (blue)	TAMRA (żółty) (yellow)	YOY (zielony) (green)	5-FAM (niebieski) (blue)	TAMRA (żółty) (yellow)

Tabela II. Sekwencje starterów wykorzystanych w multipleksie PCR
Table II. Sequences of starters used in multiplex PCR

Regiony mikrosatelitarne Microsatellite regions	Starter <i>forward</i> (F) Forward primer (F)	Starter <i>reverse</i> (R) Reverse primer (R)	Źródło Source
FCA742	TCAATGTCTTGACAACGCATAA	AGGATTGCATGACCAGGAAC	[17]
FCA744	CATTGGGCTACAGCCTACT	TCAACACCCTCACACCAATG	[17]
FCA732	CCTGTGGGTCGCTTCTACTT	AGAATTGCAAGGAGGCCACT	[17]
F124	TGCTGGGTATGAAGCCTACT	ATTGCCTCAACTACCTAGGC	[16]
FCA749	CTGGGGGAGGAGCTTACTTA	GATTGAAAGAGGCCAGCAG	[17]

cje starterów wykorzystanych w reakcji zostały przedstawione w tabeli II.

Warunki temperaturowe dla multipleksu PCR:

95°C	15 min	1 cykl
94°C	0,5 min	} 32 cykle
62°C	1,5 min	
72°C	1,5 min	
72°C	10 min	1 cykl

W trakcie analizy przeprowadzono kontrolę ujemną wykluczającą powstawanie niespecyficznych produktów PCR oraz kontrolę swoistości testu przy użyciu próbek ludzkiego DNA pochodzących od trzech niespokrewnionych ze sobą osób.

Detekcja i analiza miejsc polimorficznych

Ostateczne produkty reakcji amplifikacji zostały rozdzielone metodą elektroforezy kapilarnej z wykorzystaniem sekwenatora ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Zastosowany przy rozdziale standard wielkości GeneScan 500 ROX Size Standard umożliwił określenie wielkości rozdzielanych fragmentów DNA w zakresie 35–500 PZ (zaobserwowany zakres wielkości), z dokładnością do 1 PZ. Otrzymane wyniki rozdziału elektroforetycznego w formie pików zostały przetworzone na dane liczbowe za pomocą oprogramowania GeneMapper v 3.2.1. Przykładowe elektroforegramy otrzymane w trakcie rozdziału analizowanych próbek zostały przedstawione na rycinie 1.

Analiza statystyczna

Wyniki każdego markera z osobną zostały podane analizie statystycznej i za pomocą testu χ^2 oce-

actual tests. The sequences of the primers used in the reaction are listed in Table II.

The temperature conditions for multiplex PCR were as follows:

95°C	15 min	1 cycle
94°C	0.5 min	} 32 cycles
62°C	1.5 min	
72°C	1.5 min	
72°C	10 min	1 cycle

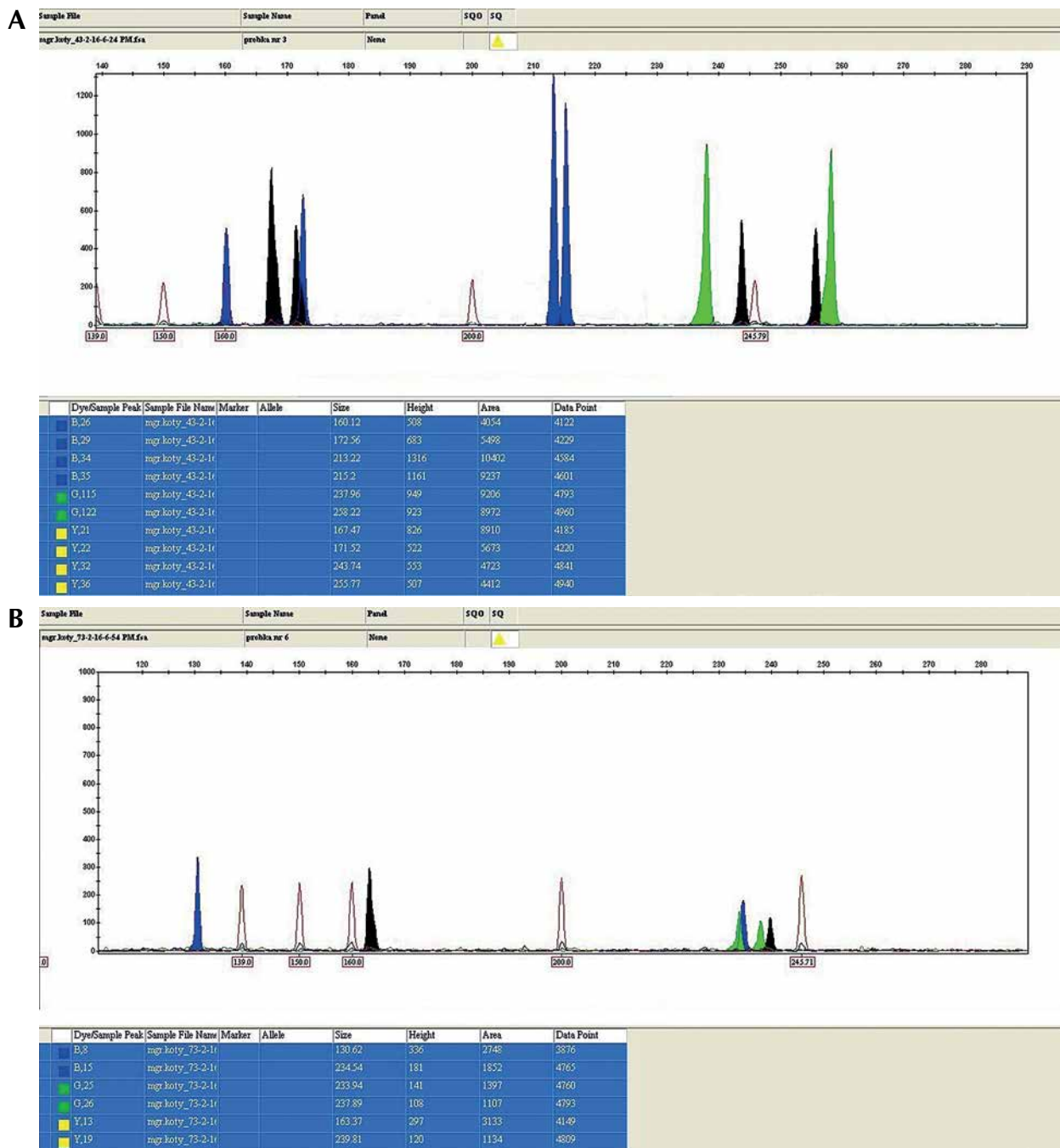
During the analysis, negative control was carried out to exclude the formation of non-specific PCR products. Also, test specificity was evaluated using human DNA samples from three unrelated persons.

Detection and analysis of polymorphic sites

The end products of the amplification reaction were separated by capillary electrophoresis using the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystem). The GeneScan 500 ROX Size Standard used for separation enabled determining the size of the separated DNA fragments in the range from 35 to 500 BP (observed range of magnitudes), with an accuracy of 1 BP. The results of electrophoretic separation in the form of peaks were processed into numerical data using GeneMapper v 3.2.1 software. Sample electropherograms obtained in the process of test sample separation are shown in Figure 1.

Statistical analysis

The results obtained for each marker separately were analyzed statistically and, using the χ^2 test,



Ryc. 1. Przykładowe elektroforegramy otrzymane w trakcie rozdzielania analizowanych próbek
Fig. 1. Sample electropherograms obtained in the process of test sample separation

niono zgodność badanej populacji z prawem H-W. Następnie dla każdego analizowanego markera na podstawie częstości alleli wyliczono następujące parametry: siłę dyskryminacji (*power of discrimination* – PD), zawartość informacji polimorficznej (*polymorphic information content* – PIC), prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności (*matching*

the concordance of the study population with the H-W principle was evaluated. Next, based on allelic frequencies, a number of parameters were calculated for each analyzed marker, including power of discrimination (PD), polymorphic information content (PIC), matching probability (pM), observed and expected heterozygosity (Het_{obs} and

probability – pM), heterozygotyczność obserwowaną (Het_{obs}) oraz oczekiwaną (Het_{ocze}), a także łączną wartość prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności. Obliczeń dokonano w programie Microsoft Office Excel 2007. Do wyliczenia wartości PIC wykorzystano internetowy kalkulator [19]. Analizę równowagi sprzężeń między markerami FCA742 i FCA744 przeprowadzono z użyciem oprogramowania R Project.

Wyniki

Pierwszym etapem analizy statystycznej była ocena zgodności badanej populacji z równowagą H-W. Wyniki zostały przedstawione w tabeli III. W przypadku markerów FCA732, F124 i FCA749 wykazano brak istotności statystycznej różnic pomiędzy wartościami oczekiwanymi a obserwacją, co wskazuje na zgodność z prawem H-W. Zależności tej nie wykazano natomiast dla markerów FCA742 i FCA744, nawet przy uwzględnieniu poprawki Bonferroni dla wielokrotnego testowania. Wartość prawdopodobieństwa dla tych markerów była poniżej poziomu istotności.

Kolejnym krokiem było przeprowadzenie analizy równowagi sprzężeń dla markerów FCA742 i FCA744 z uwagi na ich lokalizację w obrębie tej samej pary chromosomów (D4). Wartość $p > 0,05$ ($p = 0,3509$) wskazuje na brak podstaw do odrzucenia hipotezy o braku sprzężenia.

Następny etap obejmował ocenę polimorfizmu analizowanych markerów typu STR, a tym samym ich potencjalnej przydatności do celów identyfikacyjnych. Otrzymane wartości parametru PD mieściły się w zakresie od 0,850 (FCA744) do 0,967 (FCA742), natomiast PIC od 0,643 (FCA744) do 0,871 (FCA742). Najmniejsze prawdopodobieństwo

Het_{ocze}) and total value of matching probability. The calculations were performed in Microsoft Office Excel 2007. The PIC value was calculated using an online calculator [19]. The analysis of linkage equilibrium between the markers FCA742 and FCA744 was carried out with the R Project software.

Results

The first stage of statistical analysis was the assessment of concordance of the studied population with the H-W principle. The results of the statistical analysis are given in Table III. With respect to the markers FCA732, F124 and FCA749, no statistical significance was found between expected and observed values, which indicates concordance with the H-W principle. However, no such relationship was shown for the FCA742 and FCA744 markers, even after Bonferroni correction for multiple testing was applied. The probability value for these markers was below the level of significance.

The next step involved an evaluation of linkage equilibrium for the markers FCA742 and FCA744 because of their location in the same chromosome pair (D4). The value of $p > 0.05$ ($p = 0.3509$) demonstrates that there are no grounds to reject the hypothesis of no linkage.

The next step involved evaluation of polymorphism of the studied STR markers, and hence their potential suitability for identification purposes. PD values were found to vary in the range from 0.850 (FCA744) to 0.967 (FCA742), and PIC values from 0.643 (FCA744) to 0.871 (FCA742). The lowest matching probability (pM), equal to 0.033, was demonstrated for the marker FCA742, and the highest pM value, 0.150, was obtained for

Tabela III. Wyniki analizy statystycznej χ^2
Table III. Results of statistical analysis of χ^2

Parametr Parameter	FCA742	FCA744	FCA732	F124	FCA749
χ^2	264,10 264.10	143,94 143.94	86,66 86.66	241,306 241.306	158,11 158.11
DF	168	48	80	255	288
p	< 0,001 < 0.001	< 0,001 < 0.001	0,2860 0.2860	0,7217 0.7217	1,0000 1.0000

DF – stopnie swobody, p – wartość prawdopodobieństwa
DF – degrees of freedom, p – probability value

Tabela IV. Wartości obliczonych parametrów statystycznych dla analizowanych markerów STR
Table IV. Values of statistical parameters calculated for the studied STR markers

Parametr Parameter	FCA742	FCA744	FCA732	F124	FCA749
Zaobserwowany zakres wielkości (PZ)/ Observed range of magnitudes (BP)	128–180	148–268	224–260	204–312	192–288
PD	0,967 0.967	0,850 0.850	0,897 0.897	0,962 0.962	0,947 0.947
PIC	0,871 0.871	0,643 0.643	0,735 0.735	0,855 0.855	0,805 0.805
pM	0,033 0.033	0,150 0.150	0,106 0.106	0,038 0.038	0,053 0.053
Het _{obs}	0,756 0.756	0,642 0.642	0,537 0.537	0,780 0.780	0,715 0.715
Het _{ocze}	0,882 0.882	0,699 0.699	0,766 0.766	0,868 0.868	0,820 0.820

PZ – pary zasad, PD – siła dyskryminacji, PIC – zawartość informacji polimorficznej, PM – prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności, Het_{obs} – heterozygotyczność obserwowana, Het_{ocze} – heterozygotyczność oczekiwana
 BP – base pairs, PD – power of discrimination, PIC – polymorphic information content, PM – matching probability, Het_{obs} – observed heterozygosity, Het_{ocze} – expected heterozygosity

pM wystąpiło dla markera FCA742 i wyniosło 0,033, natomiast największe dla markera FCA744 i wyniosło 0,150. Łączna wartość prawdopodobieństwa pM dla analizowanych markerów wynosiła $1,0877 \times 10^{-6}$. Najwyższą Het_{obs} równą 0,780 wykazał marker F124, natomiast najniższą FCA732 – 0,537. Wartości Het_{obs} w przypadku każdego analizowanego markera STR były niższe niż wyliczone dla nich Het_{ocze}. Największą różnicę (0,229) między tymi wartościami zaobserwowano w przypadku markera FCA732. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli IV.

Kontrola z ludzkim materiałem genetycznym uwzględniona w przeprowadzonych badaniach potwierdziła swoistość testu. Kontrola negatywna wykluczyła możliwość powstawania niespecyficznych produktów PCR w trakcie całego cyklu analizy.

Dyskusja

Głównym celem badań była ocena stopnia polimorfizmu wybranych markerów w populacji kotów domowych na terenie Dolnego Śląska. Analiza statystyczna otrzymanych wyników i wyliczenie odpowiednich parametrów pozwoliły na określenie potencjalnej przydatności tych markerów do celów identyfikacyjnych, co pozwoliłoby w przyszłości na próbę konstrukcji własnego testu identyfikacyjnego.

Analiza statystyczna z użyciem testu χ^2 wykazała, że populacja w obrębie markerów FCA732,

FCA744. The total value of pM established for the markers under study was 1.0877×10^{-6} . The highest Het_{obs}, equal to 0.780, was associated with the marker F124, and the lowest, amounting to 0.537, with FCA732. The values of Het_{obs} in each analyzed STR marker were lower than the corresponding calculated values of Het_{ocze}. The greatest difference (0.229) between these values was observed in the marker FCA732. The results are listed in Table IV.

The control with human genetic material incorporated into the studies confirmed the specificity of the test. The negative control excluded the possibility of formation of non-specific PCR products throughout the entire analysis cycle.

Discussion

The main goal of the study was to assess the degree of polymorphism of selected markers in the population of domestic cats in the Lower Silesia region. By performing a statistical analysis of results and calculating appropriate parameters, it was possible to evaluate the potential suitability of the analyzed markers for identification purposes. Based on the evaluation results, an attempt might be made in the future to design an original identification test.

Statistical analysis with the χ^2 test showed the population to exhibit genetic equilibrium ac-

F124 i FCA749 wykazuje równowagę genetyczną zgodną z prawem H-W. Zależności tej nie wykazano dla FCA742 i FCA744. Biorąc pod uwagę lokalizację obu markerów na parze chromosomów D4, przeprowadzono analizę ich równowagi sprzężeń. Potencjalne sprzężenie mogłoby wyjaśniać zaobserwowaną niezgodność z prawem H-W. Otrzymane wyniki ($p > 0,05$) wykluczają jednak możliwość występowania sprzężenia między analizowanymi loci. Brak równowagi genetycznej markerów FCA742 i FCA744 może wynikać z procesów demograficznych zachodzących w badanej populacji, które mogłyby zaburzać frekwencje i rozkład alleli w obrębie tych fragmentów DNA, ale także z niewystarczającej liczby próbek poddanych analizie (tzn. badana populacja nie była wystarczająco liczna, co wpłynęło na wyniki analizy statystycznej). Ponadto należy mieć na uwadze fakt, że badane zwierzęta reprezentowały różne, głównie bliżej nieokreślone rasy kotów domowych, łącznie z tymi, u których kojarzenie zwierząt, szczególnie w hodowlach, odbywa się poprzez chów wsobny. Kojarzenie ze sobą zwierząt mających wspólnych przodków nie odbywa się w sposób losowy, zakładany przez prawo H-W, więc taki sposób rozmnażania się zwierząt w obrębie gatunku generuje rozbieżności między częstością genotypów obserwowanych a przewidywanych w danej populacji [20].

Ocena uzyskanych wyników odnoszących się do parametrów statystycznych istotnych dla celów identyfikacyjnych wykazała, że najsilniejszym markerem w analizowanym multipleksie jest FCA742, ale nie spełnia on założenia o zachowaniu równowagi genetycznej populacji. W przypadku markera F124, który okazał się tak samo silny, nie tylko zaobserwowano równie wysokie wartości parametrów PD, PIC oraz najwyższą Het_{obs} , ale i potwierdzono wystarczająco niską wartość pM. Co więcej, wykazuje on także zgodność z prawem H-W. Najsłabsze wyniki analizy statystycznej uzyskał marker FCA744.

W przypadku każdego markera otrzymane zakresy wielkości fragmentów, podane w PZ, wykroczały poza dane zaczerpnięte z literatury [16–18]. Rozbieżność ta wynika najprawdopodobniej z różnorodności genetycznej populacji wykorzystanej do badań. W efekcie zakres wielkości fragmentów dla każdego markera został odpowiednio rozszerzony.

Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał analizowanych markerów, pozwalający na wykorzy-

zując do the H-W principle with respect for the markers FCA732, F124 and FCA749. No such relationship was found for the markers FCA742 and FCA744. Taking into account the fact that both markers are located on the chromosome pair D4, they were evaluated for linkage equilibrium. Potential linkage could explain the observed lack of concordance with the H-W principle. However, the obtained results ($p > 0.05$) rule out the possibility of linkage between the analyzed loci. Genetic disequilibrium observed in the markers FCA742 and FCA744 may be due to demographic processes in the studied population, potentially interfering with the frequencies and distributions of alleles within these DNA fragments, but may also be a consequence of an insufficient number of analyzed samples (i.e. the study population was not sufficiently large, which affected the values of statistical analysis). Moreover, it should be duly noted that the studied cats represented various, mostly unspecified, domestic cat breeds, including those in which mating strategies used by breeders involve inbreeding. The mating of animals related by common ancestors does not take place in a random fashion assumed in the H-W principle, so this manner of animal reproduction within a species generates discrepancies between the frequency of genotypes observed and predicted in a given population [20].

An assessment of the study results with respect to statistical parameters that are relevant for identification purposes showed FCA742 to be the strongest marker in the analyzed multiplex, however it failed to meet the assumption of maintenance of genetic equilibrium in the population. The marker F124, which turned out to be an equally strong element of the test, was associated not only with high values of PD and PIC, and the Het_{obs} , but also had a sufficiently low pM value. In addition, the marker exhibits concordance with the HW principle. The weakest results of statistical analysis were obtained for the marker FCA744.

For each marker, the identified fragment size ranges given in BP exceeded those available in the literature data [16–18]. This discrepancy is most likely attributable to the genetic diversity of the population evaluated in the study. As a consequence, the range of fragment size for each marker was appropriately expanded.

stanie ich do badań identyfikacyjnych kociego materiału genetycznego. Należy jednak uwzględnić konieczność przeprowadzenia dodatkowych badań na liczniejszej populacji w celu zweryfikowania braku zgodności markerów FCA742 i FCA744 z prawem H-W oraz podjąć próbę standaryzacji testu, np. w zakresie stworzenia drabinki allelicznej dla każdego analizowanego STR.

Mimo że materiał genetyczny pochodzenia zwierzęcego można analizować przy użyciu takich samych narzędzi jak w przypadku ludzkiego DNA, ograniczenia wynikające z braku standaryzacji tego rodzaju badań utrudniają ich wykorzystanie w codziennej pracy laboratoryjnej. Poważnym problemem ograniczającym rutynowe stosowanie takich testów identyfikacyjnych jest również brak drabinki allelicznej dla badanych markerów STR, co znacznie utrudnia analizę rozdzielonych produktów PCR [21]. Ocena markerów STR opiera się przede wszystkim na określeniu polimorfizmu wynikającego z różnej liczby powtórzeń danego motywu repetytywnego, a nie wielkości produktu podanej jako liczba par zasad [22].

Wnioski

Możliwe zastosowanie analizy identyfikacyjnej DNA pochodzenia zwierzęcego, zarówno w przypadku zwierząt udomowionych, jak i dzikich, dotyczy wielu różnych dziedzin życia. Na gruncie kryminalistyki może ułatwić proces dochodzeniowy, a nawet zaważyć na ostatecznym wyniku śledztwa, np. w sprawach, w których zwierzęta domowe występują w roli świadka. Inne możliwości wykorzystania testów DNA to badanie czystości ras czy kontrola rodowodów w przypadku hodowli albo po prostu badanie pokrewieństwa między danymi osobnikami. Tego typu analizy mogą być również wykorzystywane w sprawach związanych z kłusownictwem [23].

Podziękowania

Projekt badawczy w ramach działalności statutowej: „Opracowanie zestawu multipleks PCR mającego zastosowanie w indywidualnej identyfikacji materiału genetycznego kotów”.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

The findings of the study show that the analyzed markers have a high potential for application in identification tests using feline genetic material. However, further research should be conducted in a larger population in order to verify the lack of concordance with the H-W principle noted in the markers FCA742 and FCA744, and make an attempt to standardize the test, for example by constructing an allelic ladder for each analyzed STR.

Despite the fact that genetic material of animal origin can be analyzed using the same instruments as those employed in human DNA analysis, limitations arising from the lack of standardization of such tests prevent their adoption into regular laboratory practice. Another major problem restricting the routine use of identification tests of this type is the lack of allelic ladder for the STR markers used, which significantly hinders the analysis of separated PCR products [21]. The assessment of STR markers is based primarily on the determination of polymorphism resulting from different numbers of repetitions of a given repetitive motif, and not product size expressed as the number of base pairs [22].

Conclusions

Possible applications for identification analysis of animal-derived DNA, both in domesticated and wild animals, cover a wide range of areas of life. In the field of criminalistics, it may facilitate the investigative process and even determine the final outcome of investigation, for example in cases involving domestic animals as crime witnesses. Other prospective applications of such identification tests include evaluation of breed purity or pedigree verification in animal breeding, or simply investigation of genetic relationship between studied animals. Such analyses can also be used in investigations into poaching activity [23].

Acknowledgements

The research project entitled “Development of multiplex PCR set for application in individual identification of feline genetic material” has been conducted within the statutory activity.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo**References**

1. Butler JM. Forensic DNA Typing – Biology, Technology, and Genetics of STR Markers (2nd ed.). Elsevier, USA 2005.
2. Butler JM. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology, Elsevier, USA 2011.
3. Brooks A, Creighton EK, Gandolfi B. SNP Miniplexes for Individual Identification of Random-Bred Domestic Cats. *J Forensic Sci* 2016; 61: 594-606.
4. Muller K, Brugger C, Klein R, Miltner E, Reuther F, Wiegand P. STR typing of hairs from domestic cats, *Forensic Sci Int-Gen* 2008; 1: 607-609.
5. Menotti-Raymond MA, David VA, O'Brien SJ. Pet cat hair implicates murder suspect. *Nature* 1997; 386: 774.
6. D'Andrea E, Fridez F, Coquoz R. Preliminary experiments on the transfer of animal hair during simulated criminal behavior. *J Forensic Sci* 1998; 43: 1257-1258.
7. Golik P, Stankowicz A, Baca M, Molak M. Analiza naturalnych populacji – ekologia molekularna. Analiza DNA w archeologii. Genetyka w kryminalistyce. Skrypt do ćwiczeń z genetyki. Uniwersytet Warszawski. Instytut Genetyki i Biotechnologii, Warszawa 2010.
8. Bal J. Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013.
9. Carracedo A. Methods in molecular biology. Forensic DNA Typing Protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey 2005.
10. Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques* 2007; 43: 2-5.
11. Słomski R. Analiza DNA. Teoria i praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008.
12. StockMarks®. Horse, Cattle, and Dog Genotyping Kits Protocol, Applied Biosystems, 2010.
13. Lipinski MJ, Amigues Y, Blasi M, et al. An international parentage and identification panel for the domestic cat (*Felis catus*). *Anim Genet* 2007; 38: 371-377.
14. Menotti-Raymond MA, David VA, Wachter LL, Butler JM, O'Brien SJ. An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. *J Forensic Sci* 2005; 50: 1061-1070.
15. Schury N, Schleenbecker U, Hellmann AP. Forensic animal DNA Typing: Allele nomenclature and standardization of 14 feline STR markers. *Forensic Sci Int-Gen* 2014; 12: 42-59.
16. Menotti-Raymond M, David VA, Lyons LA, Schaffer AA, Tomlin JF, Hutton MK, O'Brien JS. A Genetic Linkage Map of Microsatellites in the Domestic Cat (*Felis catus*). *Genomics* 1999, 57: 9-23.
17. Menotti-Raymond M, David VA, Wachter LL, Butler BS, O'Brien SJ. An STR Forensic Typing System for Genetic Individualization of Domestic Cat (*Felis catus*) Samples. *J Forensic Sci* 2005; 50: 1061-1070.
18. Menotti-Raymond M, David VA, Weir BS, O'Brien SJ. A Population Genetic Database of Cat Breeds Developed in Coordination with a Domestic Cat STR Multiplex. *Forensic Sci* 2012; 57: 596-601.
19. Nagy S, Poczaí P, Cernák I, Gorji AM, Hegedűs G, Tallér. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochem Genet* 2012; 50: 670- 672.
20. Futuyma D. Ewolucja. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2008.
21. Linacre A, Gusmao L, Hecht W, et al. ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Sci Int-Gen* 2011; 5: 501-505.
22. Butler JM. Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. Central Police University Press, USA 2003.
23. Dębska M. Bieżące kierunki w kryminalistycznych badaniach dotyczących identyfikacji zwierząt należących do gatunków zagrożonych wyginięciem. *Probl Krym* 2008; 280: 28-38.

Adres do korespondencji

Aneta Alama
Zakład Technik Molekularnych
Katedra Medycyny Sądowej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ul. M. Curie-Skłodowskiej 52
50-369 Wrocław, Polska
e-mail: aneta.alama@gmail.com

Nadesłano: 19.02.2018

Zaakceptowano: 11.05.2018

Address for correspondence

Aneta Alama
Department of Molecular Techniques
Chair of Forensic Medicine
Wrocław Medical University
52 M. Curie-Skłodowskiej St.
50-369 Wrocław, Poland
e-mail: aneta.alama@gmail.com

Submitted: 19.02.2018

Accepted: 11.05.2018

