

И.С. Цыбовский,
кандидат биологических наук,
С.А. Котова

кандидат химических наук

Государственное учреждение «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь»,
г. Минск, Республика Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СЛЕДОВ ДИКИХ ЖИВОТНЫХ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ ДЕЛ О НЕЗАКОННОЙ ОХОТЕ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Правонарушения в отношении объектов дикой природы (в частности, незаконная охота) наносит ущерб экономическим интересам государства и может быть причиной возникновения проблем экологического характера, поскольку приводит к неконтролируемым изменениям в естественных биоценозах. Незаконная охота на редких и находящихся под угрозой уничтожения животных обесценивает усилия специалистов и государств в целом, реализующих программы сохранения и размножения особо ценных и редких видов. Вызывает удивление, что при всеобщей информированности об особо охраняемом статусе зубра в Беларуси факты незаконного отстрела зубров имеют место и в настоящее время. Например, в 2012 году браконьерским образом были отстреляны 5 особей зубров: 3 особи в Воложинском районе, 1 зубр добыт и 1 тяжело ранен в Хойникском районе Республики Беларусь.

Данный факт убедительно свидетельствует, что только профилактических мер для обеспечения сохранности редких видов животных недостаточно. Законодательствами всех стран предусмотрен порядок наказания правонарушителей и система компенсации хотя бы материального ущерба, однако для их реализации необходимы убедительные и достоверные доказательства факта правонарушения.

Как правило, преступления против дикой фауны являются наиболее малочисленной группой среди правонарушений экологической направленности [1, 2]. Например, в Республике Беларусь в 2012 году зарегистрировано 261 преступление по ст.282 (Незаконная охота). Из них в результате действий правоохранительных органов только в 117 возбужденных делах были установлены подозреваемые лица (44,8%), и только 28% дел от зарегистрированных случаев браконьерства имели полную совокупность доказательств, позволившую обосновать обвинительный приговор в суде.

Высокий уровень латентности данного вида преступлений вполне понятен – сам образ жизни дикого животного предполагает максимальную скрытность и осторожность. Несомненно, играют свою роль и совершенствование материально-технического оснащения лиц, промысляющих незаконной охотой (транспорт, мобильная связь и т.п.), рост уровня адвокатского сопровождения дел данного рода в судах, и др. Тем не менее, основной первопричиной невысо-

кой эффективности расследования дел о незаконной охоте, на наш взгляд, является недостаточность экспертного сопровождения дел данного рода, несоответствие экспертных технологий требованиям настоящего момента.

Составляющие реальной системы преступления, а также закономерно существующие и функционирующие в ней системообразующие связи отражаются в объективно существующей материальной структуре преступления. Только полное представление всей материальной структуры преступления позволяет определить все информативные возможности каждого имеющегося на месте происшествия следа, объекта, взаимосвязей между ними [3]. Правоохранительные органы для расследования преступлений против дикой природы нуждаются в принципиально новой доказательственной информации, полученной новыми экспертными средствами исследования вещественных доказательств, до сих пор незадействованной в расследовании.

Информация подобного рода содержится в многочисленных объектах, присутствующих на разных этапах сценария реализации правонарушения. В основном это пятна и мазки крови, мышечные ткани и другие биологические следы на местах отстрела, инструментах и т.п. Как правило, они не имеют выраженных морфологических или физиологических характеристик; детальная информация для конкретизации каждого такого объекта может быть получена только молекулярно-генетическим исследованием особенностей ДНК-маркеров. Биологические следы, обнаруженные на месте отстрела животного, на месте разделки туши, на орудиях убийства или орудиях разделки, на транспортных средствах, использованных для перемещения туши, на поверхности одежды и обуви участников охоты (или разделки), а также в местах хранения мясопродуктов – в случае доказательства их происхождения от одной и той же особи животного – дают информацию, позволяющую восполнить существенную часть недостающих сведений о материальной структуре преступления – незаконной охоте.

ДНК-анализ биологических следов диких животных является существенно более сложным экспертным направлением, чем ДНК-анализ биологических следов человека. В Научно-практическом центре Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь подходы к ДНК-идентификации объектов незаконной охоты разрабатывались в ходе проведения научно-исследовательских работ, при этом в основу разработок был положен постулат о максимальном соответствии разрабатываемых методов традиционным для молекулярно-генетических лабораторий технологиям и оборудованию. Объектами исследования были представители отряда Парнокопытные. Выбор объектов исследования определялся тем, что виды отряда Парнокопытные являются основными объектами незаконной охоты: из семейства Оленевые – Лось (лат. *Alces alces*), Олень благородный (лат. *Cervus elaphus*), Косуля европейская (лат. *Capreolus capreolus*); из семейства Свиные - Кабан европейский (лат. *Sus scrofa scrofa*). К этому же отряду относится и особо охраняемый вид - Зубр европейский (лат. *Bison bonasus*). Эффективность разрабатываемых технологий была апробирована в ходе решения экспертных задач различного уровня при произ-

водстве экспертиз по поручениям правоохранительных органов по фактам незаконной охоты.

В разрезе необходимости проведения экспертной ДНК-идентификации принципиальной генетической особенностью всех представителей отряда Парнокопытные является их филогенетическое родство. Филогения – эволюция вида, рода (и т.д.); их развитие в ряду последовательных поколений со времени образования [4]. Филогенетическое родство подразумевает историческое существование общего предка, что в свою очередь предполагает обязательное наличие общности ряда признаков, включая генетическое сходство, выраженное в той или иной степени. Ситуация с точки зрения практикующего эксперта осложняется тем, что к отряду Парнокопытные относится большинство одомашненных сельскохозяйственных животных (бык, коза, овца, свинья и др.), которые (и их дериваты) количественно доминируют в бытовом окружении человека.

Вторым принципиальным отличием от ДНК-анализа следов человеческого происхождения, вытекающего из филогенетического родства видов, является необходимость учета особенностей проявления феномена адресной перекрестной амплификации (cross-species amplification). Адресная перекрестная амплификация базируется на существовании консервативных праймер-связывающих участков генов, имеющих схожие последовательности среди близкородственных видов [5].

С одной стороны, перекрестная амплификация может быть эффективным подходом к исследованию широкой группы родственных видов, для которых отсутствуют детальные сведения о структуре геномов, поскольку позволяет перенос праймеров от вида-источника (вид, для которого микросателлитный маркер был изначально разработан) к целевому виду (вид, на котором апробируется указанный маркер). «Собственные» ДНК-маркеры известны для крупного рогатого скота, овцы, свиньи и некоторых видов оленей.

С другой стороны, при переносе праймеров нередко наблюдается смена статуса STR-локусов с полиморфного (у видов-источников) на мономорфный или неамплифицируемый (у целевых видов), связанная с филогенетическими отношениями между видами (таксонами), отраженными в общей систематической классификации живых организмов. Может также изменяться диапазон молекулярных размеров ПЦР-продуктов [6].

В практической работе адресная перекрестная амплификация позволяет, например, успешно использовать праймеры, разработанные для генотипирования крупного рогатого скота (локусы ETH225, TGLA126), оленя благородного (T26, T268), северного оленя (RT24, RT30) для исследования полиморфизма лося, геном которого не изучен. Однако при генотипировании неизвестного образца перекрестная амплификация становится источником ошибок, поскольку на матрице ДНК родственных видов могут быть получены различающиеся результаты. Например, locus RT5 северного оленя полиморфен у лося (4 аллеля), мономорфен (1 признак у всех особей) у оленя и не амплифицируется у косули. Неверная оценка выявленных генетических признаков (аллелей) станет источником экспертной ошибки.

Таким образом, обязательной стадией экспертного генотипирования ДНК диких животных становится решение дополнительных классификационных задач по принадлежности образца к виду животного или дифференциации по принадлежности к дикому или домашнему животному. В проекции на ДНК-анализ следов человеческого происхождения аналогичная ситуация наблюдалась бы при условии свободного существования в лесах высших приматов.

В Научно-практическом центре Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь разработаны экспериментальные подходы для решения экспертных задач различных уровней:

- 1) идентификации вида животного (лось, олень, косуля, дикий кабан, зубр);
- 2) идентификации конкретной особи животного;
- 3) установления половой принадлежности животного;
- 4) дифференциации по принадлежности к дикому или домашнему животному (например, кабан дикий или свинья домашняя).

Идентификация вида животного отряда Парнокопытные

Молекулярно-генетическая идентификация вида животного, от которого произошли пятна крови или другие биологические следы, крайне важна в практической экспертной работе. Обобщение экспертной практики показало, что на личных вещах лиц, подозреваемых в незаконной охоте, других вещественных доказательствах, собранных по фактам незаконной охоты, в большинстве случаев выявляются следы крови (волосы и др.), происходящие от различных видов животных. Нередко они образуют смешанные наслоения, анализ которых требует высокого уровня профессионализма.

Для видовой идентификации образцов разработана методика и тест-система для ее реализации, основанная на исследовании полиморфизма микросателлитных локусов. Методика может быть реализована на стандартном лабораторном оборудовании, предназначенном для проведения ДНК-анализа, и охватывает полный круг задач, решаемых при установлении видовой принадлежности биологического образца от видов, входящих в отряд Парнокопытные, обитающих или содержащихся на территории Республики Беларусь независимо от того, это дикие или сельскохозяйственные животные.

Методика базируется на феномене адресной перекрестной амплификации, для чего разработана тест-система, которая включает 3 STR-локуса крупного рогатого скота, 2 локуса североамериканского оленя, 2 локуса северного оленя карибу, 1 локус овцы, 1 локус свиньи домашней. Тест-система предназначена для видовой ДНК-идентификации биологических образцов диких животных семейства Оленевые – Лось, Олень, Косуля, Лань (лат. *Dama dama*) и дифференциации представителей семейства Оленевые от других парнокопытных (домашний скот - бык, овца, коза, свинья; дикие – зубр и кабан). Тест-система состоит из 2 наборов по 6 локусов в каждом. Один из наборов предназначен для установления видовой принадлежности образцов лоса, оленя, косули, лани, зубра/крупного рогатого скота. Если при использовании данного

набора результат не получен, проводится генотипирование образца с набором №2, результаты которого позволяют установить принадлежность образца овце, козе или дикому кабану /свинье домашней.

Принадлежность исследуемого образца к определенному виду животного (видовая идентификация) устанавливается по совокупности качественных и количественных параметров продуктов ПЦР. К качественным параметрам относятся: невыявление фрагмента, мономорфное выявление фрагмента, полиморфное выявление фрагментов. Количественными параметрами является молекулярный размер фрагмента(ов), выраженный в парах нуклеотидов.

По результатам данной научной разработки в Евразийское патентное ведомство подана заявка на получение патента [7].

Методика видовой ПЦР-идентификации диких животных семейства Оленевые и их дифференциации от других парнокопытных семейств Полорогие и Свиные апробирована на практике и включена в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь.

Идентификация конкретной особи животного

Идентификация особи и ее биологических следов проводится в отношении образцов, происхождение которых заведомо известно, или после установления видовой принадлежности образца.

Идентификация биологических образцов Кабана европейского основана на использовании локусов, специфичных к ДНК свиньи домашней. В ходе исследований полиморфизма 20 микросателлитов у дикого кабана (719 образцов) и домашней свиньи (304 образца, 6 пород) было показано, что для большинства локусов (16) уровни полиморфизма у домашних и диких свиней сопоставимы [8]. Для 4 локусов наблюдалось «ассиметричное» проявление: у домашних свиней выявлялось полиморфное распределение аллелей, в то время как у дикого кабана данные 4 локуса были практически мономорфными.

При этом показано, что частоты встречаемости аллелей у дикого кабана и домашних свиней статистически достоверно различаются. Для судебно-экспертного использования необходимо формировать банки данных частот аллелей отдельно для диких и отдельно для домашних животных.

Частоты встречаемости аллелей между отдельными породами свиньи домашней так же различаются, что может быть использовано для определения породы. На примере свиньи домашней показано, что генотипы всех sibсов первого поколения в 7 семейных группах различаются. Это создает возможность решения задачи о генетическом родстве особей, как диких, так и домашних.

Также установлено, что популяции дикого кабана имеют выраженные региональные особенности: вид не образует единой популяции, выборки из различных территорий статистически достоверно различаются. Последнее означает, что адекватный расчет уровня достоверности экспертного вывода об

идентификации образца должен базироваться на научных данных о генетических характеристиках региональных популяций дикого кабана, наиболее близких к исследуемому образцу.

Методика судебно-экспертной идентификации образцов Кабана европейского и свиньи домашней, а так же информационно-справочное обеспечение экспертного исследования образцов данного вида в виде баз данных и программного средства для расчета уровня достоверности будут включены в Регистр судебно-экспертных методик в текущем году.

Для идентификации особей видов семейства Оленевые подобраны панели микросателлитных ДНК-маркеров и проводится исследование особенностей отдельных локусов и полиморфизма региональных популяций. Для генотипирования особей вида Олень благородный задействованы 15 локусов, описанных для североамериканских (лат. *Cervus elaphus canadensis*), муловых или чернохвостых (лат. *Odocoileus hemionus*) оленей, а также крупного рогатого скота.

Панели локусов для генотипирования особей вида Лось (18 ДНК-маркеров) и вида Косуля (14 ДНК-маркеров) включают праймеры, специфичные к ДНК овцы, северного оленя, североамериканского оленя и крупного рогатого скота.

По результатам исследования для каждого вида будут отобраны наиболее эффективные локусы для создания мультиплексных тест-систем, адаптированных к работе с «криминалистическими» образцами.

Идентификация зубра и его дифференциация от крупного рогатого скота

Экспертное исследование образцов зубра представляет для специалистов особую проблему, обусловленную крайне низким уровнем внутривидового полиморфизма. Восстановление вида на основе единичных особей, изъятых из зоопарков, привело к тому, что в конечном итоге все они являются биологическими родственниками. Например, если рассматривать строение D-петли митохондриальной ДНК из мирового ресурса GenBank [9], то для двух сотен зубров отмечается полное совпадение гаплотипа. Выделенная особенность (отсутствие внутривидового полиморфизма) была использована нами в качестве видового генетического маркера при определении происхождения неизвестного образца от зубра, крупного рогатого скота или других представителей семейства. Секвенирование D-петли митохондриальной ДНК быка, лося и косули выявило высокий уровень внутривидового полиморфизма у всех трех видов.

Для определения видовой принадлежности «экспертный гаплотип» был использован для поиска совпадающих последовательностей в GenBank. По результатам поиска было выявлено 10 последовательностей, имеющих 100% идентичность с искомой и 3 последовательности, имеющие 98-99% идентичность. Все они принадлежали Зубру европейскому. Остальные результаты поиска включали последовательности Яка – 88% идентичности, Быка и Зебу – 87% идентичности.

С использованием BLAST было построено дерево филогенетических отношений «экспертного гаплотипа» и наиболее идентичных ему гаплотипов. На полученном филогенетическом дереве искомым гаплотип группировался вместе с гаплотипами зубра и дистанцировался от гаплотипов Яка, Быка и Зебу. На основании проведенного исследования был сделан вывод о происхождении неизвестного образца от зубра европейского.

Задача идентификации отдельных особей зубра может быть проведена только в ряду представленных на исследование образцов: STR-полиморфизм зубра ограниченный и вероятность совпадения генотипов у двух различных особей очень высока.

Дифференциация образцов кабана европейского и свиньи домашней

Для установления происхождения образцов от дикого кабана или свиньи домашней требуется отдельная методика. Для экспертного решения задачи было проведено научное исследование полиморфизма гена меланокортинового рецептора *MC1R* (2 полиморфных сайта) и гена ядерного рецептора *NR6A1* (1 полиморфный сайт) [10]. Исследование проводили методом ПЦР-ПДРФ. Установлено, что для гена *MC1R* среди свободно живущих животных на территории Республики Беларусь $6,8 \pm 0,9\%$ представляют гибриды дикого кабана и домашней свиньи. Уровень интрогрессии домашних генов *NR6A1* в дикую популяцию составляет $1,5 \pm 0,5\%$.

Показано, что на основе проведенного изучения SNP-полиморфизма генов *MC1R* и *NR6A1* можно дифференцировать биологические образцы по происхождению. С точностью $98,83 \pm 0,33\%$ при заявленном уровне статистической значимости $p < 0,01$ для дифференциации дикого кабана от домашней свиньи методом ПЦР-ПДРФ достаточно исследования полиморфных вариантов двух сайтов – с.367A>G (ген *MC1R*) и g.299084751_C/T (ген *NR6A1*).

Показано, что принадлежность неизвестного генотипа к массиву диких или домашних животных также можно устанавливать с использованием STR-локусов. Для этого массивы генотипов диких кабанов и домашних свиней попарно сравнивали методом ROC-анализа (Receiver Operator Characteristic – операционная характеристика приёмника). Необходимым условием установления принадлежности генотипа к диким или домашним животным является наличие баз данных. Для автоматизации вероятностных расчетов экспертного вывода в судебно-экспертных исследованиях разработано программное средство на основе MS Excel, содержащее функцию идентификации биологических образцов животных вида Кабан европейский (свиньи домашней) и функцию их дифференциации по происхождению от диких или домашних животных данного вида на основе STR-профиля образца.

Таким образом, проведенными в Научно-практическом центре Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь научными исследованиями показана возможность создания методического инструментария для судебно-экспертного генотипирования ДНК животного происхождения при решении экспертных задач различного уровня на основе STR-маркеров, что

позволяет осуществлять производство экспертиз с использованием универсальных подходов и общепринятого для молекулярно-генетических лабораторий оборудования.

При этом ДНК-анализ образцов животного происхождения остается сложной проблемой, требующего высокого уровня профессионализма. Отсутствие специализированных тест-систем и высокий уровень вариабельности популяций, обитающих в различных регионах Европы, составляют одну сторону проблемы. Другая сторона заключена в природе ПЦР-реакции и физической природе локусов. Значительная часть используемых ДНК-маркеров имеет динуклеотидную природу, а значит и свойственный данному типу ДНК-маркеров высокий уровень образования «статтер»-продуктов и неконтролируемый процесс дополнительного аденилирования амплифицированных фрагментов ДНК. Вариабельность качества «криминалистических» ДНК изменяет условия протекания ПЦР, что может выявляться изменениями интенсивности амплификации тех или иных локусов от одного образца к другому или различной степени ингибированием ПЦР в целом. К тому же часть исследуемых образцов могут нести смеси ДНК различных, в том числе генетически родственных, видов животных.

Совокупность указанных факторов предъявляет достаточно жесткие требования к реализации любой из стадий экспертного исследования вещественных доказательств по делам о незаконной охоте, которые могут быть обеспечены дальнейшим проведением научных исследований в данной сфере.

Вместе с тем, высокий уровень востребованности данного рода экспертиз в правоохранительной сфере на сегодняшний день неоспорим. В Научно-практическом центре Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь проведено около 200 экспертиз, в которых исследовались образцы лося, оленя, косули, дикого кабана, зубра, медведя, бобра, собаки, гиеновидной собаки, лисы, быка, лошади, овцы, свиньи. Только за январь-март 2017 года поступило более 40 постановлений о назначении экспертиз, в части из которых стоят вопросы уже в отношении дериватов - технологически переработанных мясопродуктов из диких животных (колбаса, тушенка и др.). Для экспертного исследования такого рода вещественных доказательств потребуются собственные методики, учитывающие специфику именно этих объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Цыбовский И.С., Бородич А.В., Котова С.А. Новые экспертные технологии для экспертного сопровождения уголовных и административных дел о незаконной охоте в Республике Беларусь. / Вопросы криминологии, криминалистики и судебной экспертизы: сборник научных трудов. Минск, Право и экономика. – 2013. – № 2 (34). - С. 157-162.
2. Гулевская В.В. Актуальность формирования, предмет, объекты и задачи судебной экспертизы дикой флоры и фауны. / Теория и практика судебной экспертизы. – М. – 2015. -№3 (39). - С. 10-16.

3. Гучок А.Е. Основы криминалистического учения о материальной структуре преступления - Минск: Тесей, 2012. – 228 С.
4. Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика. Энциклопедический словарь – Минск: Тэхналогія, 1999. – 446 С.
5. Sun H.S. , Kirkpatrick B.W. Exploiting dinucleotide microsatellites conserved among mammalian species / *Mammalian Genome*. – 1996. – Vol. 7. – P. 128-132.
6. Koskinen, M.T., Primmer C.R. Cross-species amplification of salmonid microsatellites, which reveal polymorphism in European and Arctic grayling, *Salmonidae: Thymallus* spp. / *Hereditas*. – 1999. – Vol. 131. – P. 171-176.
7. Способ и тест-система для видовой идентификации оленевых и их дифференциации от других парнокопытных. Заявка № 201600045/26, Евразийское патентное ведомство.
8. Rębala K., Rabtsava A.A., Kotova S.A., Kipen V.N., Zhurina N.V., Gandzha A.I., Tsybovsky I.S. STR Profiling for Discrimination between Wild and Domestic Swine Specimens and between Main Breeds of Domestic Pigs Reared in Belarus // *PLoS ONE* 11(11). - p. 1-14: e0166563. doi:10.1371/journal
9. www.ncbi.nlm.nih.gov
10. Fontanesi L., Ribani A., Scotti E., Utzeri V.J., Veličković N., Dall'Olio S. Differentiation of meat from European wild boars and domestic pigs using polymorphisms in the *MC1R* and *NR6A1* genes / *Meat Science*. – 2014. – Vol. 98, № 4. – P. 781–784.

И.С. Цыбовский, С.А. Котова

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СЛЕДОВ ДИКИХ ЖИВОТНЫХ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ ДЕЛ О НЕЗАКОННОЙ ОХОТЕ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Аннотация

В статье рассмотрены подходы к молекулярно-генетической идентификации биологических следов диких животных при расследовании дел о незаконной охоте на представителей отряда Парнокопытные – лося, оленя благородного, косули, дикого кабана, зубра. На основе опыта научных и судебно-экспертных исследований обсуждается обязательность стадии видовой дифференциации следов для их корректной идентификации на уровне особей. Анализируются особенности генотипирования образцов с использованием адресного переноса праймеров от одного вида к другому и применения переноса праймеров в криминалистических исследованиях. Приведены результаты исследования популяций Кабана европейского, подходы к экспертной дифференциации дикого кабана и свиньи домашней, а так же образцов зубра и крупного рогатого скота.

I.S. Tsybovsky, S.A. Kotova

DNA-IDENTIFICATION BIOLOGICAL TRACES IN FORENSIC CASEWORK FOR INVESTIGATION OF ILLEGAL HUNTING IN BELARUS

Summary

The article discusses the molecular genetic identification of biological traces of wild animals, which used in forensic casework of illegal hunting of representatives of the order *Artiodactyla* – moose, red deer, roe deer, wild boar, and European bison. Recently, in scientific and forensic studies, the question of the species identification of biological objects becomes relevant. This paper describes one of the modern methods of identification of species, which consists of cross-species amplification. The results of the study of European boar population, approaches to the expert differentiation of wild boar and domestic pig, as well as samples of European bison and cattle.

Заявка на участие в научно-практической конференции

Фамилия, имя, отчество	Цыбовский Иосиф Станиславович
Должность, место работы	Ученый секретарь, ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь»
Ученая степень, ученое звание	Кандидат биологических наук
Почтовый адрес с указанием индекса	220114 г. Минск, ул. Филимонова, 25
Код города и номер контактного телефона и факса	375 17 3166384
E-mail	nrc@sudexpertiza.by
Форма участия в конференции (очная/заочная)	очная
Название доклада или сообщения	Молекулярно-генетическая идентификация биологических следов диких животных при расследовании дел о незаконной охоте в Республике Беларусь