

Использование двухлокусных SNP-систем для дифференциации в семействе Свиные при проведении судебно-экспертных исследований

Кипень В.Н.¹, Рябцева А.О.¹, Котова С.А.¹, Журина Н.В.², Ганджа А.И.², Цыбовский И.С.¹

¹ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь

²РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству», Жодино, Республика Беларусь

Наиболее распространенным объектом, в отношении которого фиксируются факты незаконной охоты на территории Республики Беларусь, является кабан европейский (*Sus scrofa scrofa*). В то же время, в стране активно ведется разведение домашних свиней высококачественных пород, в отношении которых совершаются преступления имущественного характера, связанные с кражами животных или мясопродуктов. Наконец, в пищевой промышленности актуальны вопросы разработки современных и высокоточных методик проверки соответствия продукции и, как следствие, исключения мошенничества с составом и истинным происхождением мяса и продуктов его переработки (фарш, колбасы и др.). На данный момент в экспертной практике задача по дифференциации дикого кабана от домашней свиньи может быть решена с помощью анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в белок-кодирующих генах, полиморфизм в которых напрямую связан с фенотипом животных – *MC1R*, идентификационный номер в базе данных NCBI_Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 494018 (Fajardo V., 2007) и *NR6A1* – 100038028 (Fontanesi L., 2014).

Цель и задачи – оценить дифференцирующий потенциал полиморфных вариантов с.367G>A (*MC1R*), с.729G>A (*MC1R*) и g.299084751_C/T (*NR6A1*) для решения экспертной задачи по различению особей дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) и домашней свиньи (*Sus scrofa domestica*) в Республике Беларусь. В исследование были включены следующие группы: выборка образцов биологического материала (ушная раковина или мясная вырезка) дикого кабана общей численностью 719 шт. (в Гомельской области количество отобранных образцов дикого кабана составило 67 шт., в Минской обл. – 98, в Витебской обл. – 133, в Могилевской обл. – 141, в Гродненской обл. – 132, в Брестской обл. – 148); выборка образцов ДНК домашней свиньи – 304 шт. (50 – породы «Белорусская крупная белая», 53 – «Белорусская мясная», 20 – «Белорусская черно-пестрая», 72 – «Дюрок», 54 – «Ландрас», 55 – «Йоркшир»). Определение генотипа было произведено с использованием метода ПЦР-ПДРФ (использованы три эндонуклеазы рестрикции – *VspHI* для полиморфного варианта с.367_G>A (*MC1R*), *BstUI* – для с.729_G>A (*MC1R*) и *MspI* – для g.299084751_C>T (*NR6A1*). Поиск значимых комбинаций генотипов, способных с высокой точностью дифференцировать дикого кабана от домашней свиньи, проводили с использованием программы MDR (Multifactor-Dimensionality Reduction) (Ritchie M.D., 2001). На основании результатов генотипирования трех полиморфных вариантов: с.367_A/G (*MC1R*), с.729_A/G (*MC1R*) и g.299084751_C/T (*NR6A1*), – в двух выборках – «Дикий кабан» (n=719) и «Домашняя свинья» (n=304), – с использованием MDR-анализа был проведен сравнительный анализ характеристик моделей по дифференциации дикого кабана от домашней свиньи. Если принять уровень допустимых ложноотрицательных заключений (т.е. когда происхождение неизвестного образца будет отнесено к домашней свинье, в то время как он принадлежит дикому кабану) не более 1,0%, то наиболее оптимальной по времени схемой проведения SNP-генотипирования образцов к материальным затратам будет модель «с.367_A/G (*MC1R*) / g.299084751_C/T (*NR6A1*)».

В результате, при наличии следующих генетических профилей: g.299084751_CC (*NR6A1*) / с.367_AG (*MC1R*); g.299084751_CC (*NR6A1*) / с.367_GG (*MC1R*); g.299084751_TC (*NR6A1*) / с.367_GG (*MC1R*), – происхождение неизвестного образца с точностью не менее 99,99% (уровень статистической значимости $p < 0,01$) должно быть отнесено к дикому кабану

(*Sus scrofa scrofa*). При наличии генетических профилей: g.299084751_TT (*NR6A1*) / c.367_AA (*MC1R*); g.299084751_TT (*NR6A1*) / c.367_GG (*MC1R*), – происхождение неизвестного образца с точностью не менее 99,99% (уровень статистической значимости $p < 0,01$) должно быть отнесено к домашней свинье (*Sus scrofa domesticus*). При наличии других генетических профилей должен быть сделан вывод о невозможности дать заключение, используя только методы SNP-генотипирования по предложенной схеме. Для точного решения задачи по дифференциации дикого кабана и домашней свиньи методом SNP-генотипирования необходимо определить генотип по двум полиморфным вариантам: c.367_A/G (*MC1R*) и g.299084751_C/T (*NR6A1*), – сбалансированная точность предсказания в этом случае составит не менее – 98,5% ($p < 0,001$).

The use of two-locus SNP-systems for differentiation of species in the family of Swine in conducting forensic expert examinations

Kipen V.N.¹, Rabtsava A.A.¹, Kotova S.A.¹, Zhurina N.V.², Gandzha A.I.², Tsybovsky I.S.¹
¹*Scientific and Practical Centre of the State Committee of Forensic Expertises, Minsk, Belarus*
²*Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences on Animal Husbandry, Zhodino, Belarus*

The most common object of illegal hunting on the territory of Belarus is the European wild boar (*Sus scrofa scrofa*). At the moment, in expert practice the task to differentiate wild boar from domestic pigs can be solved through the analysis of single nucleotide polymorphism (SNP) in *MC1R* and *NR6A1* genes. The study included the following groups: «Wild boar» – total number 719 (in the Gomel region the number of samples of wild boar was 67, in Minsk reg. – 98, in Vitebsk reg. – 133, in Mogilev reg. – 141, in Grodno reg. – 132, in Brest reg. – 148); «Domestic swine» – 304 (50 – to breed «Belarusian large white», 53 – «Belarusian meat», 20 – «Belarusian black-motley», 72 – «Duroc», 54 – «Landrace», 55 – «Yorkshire»). Genotyping was performed using PCR-RFLP (used three restriction enzymes – BspHI for the polymorphic variant c.367_G>A (*MC1R*), BstUI – c.729_G>A (*MC1R*) and MspI – g.299084751_C>T (*NR6A1*). Search for significant combinations of genotypes capable of high accuracy to differentiate wild boar from domestic pig was carried out using the program MDR (Multifactor-Dimensionality Reduction) (M. D. Ritchie, 2001).

In the presence of the following genetic profiles: g.299084751_CC (*NR6A1*) / c.367_AG (*MC1R*); g.299084751_CC (*NR6A1*) / c.367_GG (*MC1R*); g.299084751_TC (*NR6A1*) / c.367_GG (*MC1R*), – the origin of an unknown sample with an accuracy of not less than 99.99% (the level of statistical significance $p < 0.01$) should be assigned to the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). In the presence of genetic profiles: g.299084751_TT (*NR6A1*) / c.367_AA (*MC1R*); g.299084751_TT (*NR6A1*) / c.367_GG (*MC1R*), – the origin of an unknown sample with an accuracy of not less than 99.99% (the level of statistical significance $p < 0.01$) should be attributed to the domestic pig (*Sus scrofa domesticus*). In the presence of other genetic profiles it must be concluded that it is impossible to give an opinion using only methods of SNP genotyping by the proposed scheme.

For the exact solution for differentiation of wild boar and domestic swine by the method of SNP genotyping is necessary to determine the genotype of two polymorphic variants: c.367_A/G (*MC1R*) and g.299084751_C/T (*NR6A1*), is a balanced prediction accuracy in this case will be not less than 98,5% ($p < 0.001$).