ForGen – Forensische Genetik und Rechtsmedizin am Institut für Hämatopathologie GmbH | Fangdieckstr. 75a | 22547 Hamburg

Stichting et Nationale Paek de Hoge Veluwe
Apeldoornweg 250
NL-7351 TA Haenderloo

[redacted]

ForGen - Forensische Genetik und Rechtsmedizin am Institut für Hämatopathologie GmbH

[redacted]

Fangdieckstr. 75a, 22547 Hamburg

Tel: +49 (0) 40 524 72 36-600
Fax: +49 (0) 40 524 72 36-610
Mail: info@forensik-hh.de
URL: http://www.forensik-hh.de

Hamburg, den 28.11.2022

Betreff: Molekulargenetische Analyse (SU0480-22)

Bezug:	**Speziesidentifikation Diverse Haare und Kotprobe**
Beschluss/Auftrag vom:	privat
Eingang des Auftrags an unserem Institut:	17.11.2022
Eingang des Spurenmaterials an unserem Institut:	17.11.2022

Gemäß schriftlicher Anforderung soll ein

forensisch-genetisches Spurengutachten

erstellt werden.

1. Frage- bzw. Aufgabenstellung

I. Bitte um molekulargenetische Analyse und - wenn möglich - Spezieszuordnung.

II. Befindet sich an den Spurenträgern genetisches Material, welche für eine Untersuchung geeignet ist?

III. Wenn ja, stammen die übersandten Proben von einem Hund oder einem anderen Vertreter der Canidae?

2. Zum Sachverhalt

---

3. Spuren- und Vergleichsmaterial:

Die Untersuchungen und statistischen Berechnungen bzw. Auswertungen fanden im folgenden Zeitraum statt:

18.11.2022	**bis**	22.11.2022

3.1 Spurenmaterial

Die im Folgenden beschriebenen Spurenträger wurden untersucht:

Bezeichnung	lfd. Nummer	Beschreibung	Durchgeführte Methoden	Foto
Spur 1 "Haar 05-11-2022/1"	1572-22	Abstrich Forensic Swab mit Haarbüschel, keine Wurzeln erkennbar: die gesamten Haare werden abgesammelt und aufgearbeitet.	Extraktion von Minimalspuren, Quantifizierung von DNA, Erstellung eines genetischen, autosomalen Merkmalsmusters, Geschlechtsbestimmung, Sequenzierung der mitochondrialen DNA	
Spur 2 "Haar 05-11-2022/2"	1573-22	s.o.	s.o.	
Spur 3 "Haar 05-11-2022/3"	1574-22	s.o.	s.o.	
Spur 4 "22-10-2022 Haar"	1575-22	s.o.	s.o.	
Spur 5 "Dreck/Mast"	1576-22	s.o. mit braunen Antragungen, vmtl. Kotprobe: die Spur wird komplett aufgearbeitet	s.o.	

3.2 Vergleichsmaterial (VM) bzw. –daten (VD)

Nicht untersucht.

4. Ergebnisse

4.1 Voruntersuchungen . -keine-

4.2 Molekulargenetische Untersuchungen

Tab. 1: DNA-Typisierungsergebnisse des Spuren- u. Vergleichsmaterials, hundespezifische STR-Merkmale (siehe 11). Angabe der spezifischen Fragmente nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung in Rohdaten.

Multiplex I/IIa:

Lfd. Nr.	PEZ1	FHC2054	FHC2010	PEZ20	PEZ12	PEZ6	PEZ8	FHC2079	SRY	FHC2087	FHC2137	PEZ03	PEZ15	WTF
1572-22	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
1573-22	(112)	148/(172)	(235)	k.E.	k.E.	178/182	k.E.	274/278	-	110/122/126	159/(177)	k.E.	202/(210)	178/192
1574-22	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	+	k.E.	(161)	k.E.	k.E.	k.E.
1575-22	(112)	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	+	(110)	k.E.	k.E.	k.E.	178/192
1576-22	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.

Multiplex IIb/III:

Lfd. Nr.	FHC2508	FHC2361	AMG	FHC2613	FHC2611	FHC3241	PEZ5	vWFX	FHC2132	Assoziationsanalyse
1572-22	k.E.	k.E.	X	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Nicht möglich
1573-22	110	136/164	k.E.	96	k.E.	k.E.	k.E.	132/138	k.E.	Nicht möglich
1574-22	110/(112)	k.E.	**XY**	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Nicht möglich
1575-22	110	164	XY.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	132/138	k.E.	Nicht möglich
1576-22	106/110	k.E.	Y	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	132	k.E.	Nicht möglich

°: Angabe der spezifischen Merkmale in Basenpaareinheiten (Rohdaten) nach Auftrennung in einem ABI3130 Genetic Analyzer; ()=Merkmale, die eine geringe Amplitude aufweisen oder nicht reproduzierbar bestimmt werden konnten. Diese werden in die Assoziationsanalyse nicht einbezogen. Signale in Klammern: Signalstäre sehr gering, SRY: Geschlechtsmarker, Y-Chromosom

Zusätzlich wurden zwei Fragmente aus dem **hypervariablen Bereich der mitochondrialen DNA**. Mit diesen kann, bei erfolgreicher Analyse, zwischen Wolf und Hund unterschieden und eine Haplotypzuordnung durchgeführt werden.

lfd. Nummer	Sequenzierungserfolg*		Hits (1-3)	Haplotyp (lt. Thai et.al. 2017)
	740 bp	319 bp		
1572-22 (Spur 1)	k.E.	C1, C2, C3 - Teilfragment	HIT1: Canis lupus familiaris clone 2797 HIT2: Canis lupus familiaris cf_ws7 HIT3: Canis lupus familiaris cf_pl6	**B58 (Leehoei et.al., 2020)**
1573-22 (Spur 2)	k.E.	k.E.	Nicht möglich	**Nicht möglich**
1574-22 (Spur 3)	Komplette Sequenz	Komplette Sequenz	HIT1: Canis lupus DM1124 HIT2: Canis lupus W1-LT HIT3: Canis lupus X Canis lupus familiaris	**E1 (Savolainen et.al., 2002)**
1575-22 (Spur 4)	k.E.	k.E.	Nicht möglich	**Nicht möglich**
1576-22 (Spur 5)	k.E.	k.E.	Nicht möglich	**Nicht möglich**

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Canis lupus familiaris clone 2797 D-loop, partial sequence; mitochondrial	Canis lupus fami...	429	637	98%	2e-115	93.88%	582	KU647343.1
Canis lupus familiaris isolate Cf_ws7 mitochondrion, complete genome	Canis lupus fami...	429	637	98%	2e-115	93.88%	16730	KM061592.1
Canis lupus familiaris isolate Cf_pl6 mitochondrion, complete genome	Canis lupus fami...	429	637	98%	2e-115	93.88%	16730	KM061540.1
Canis lupus familiaris isolate Cf_cau1 mitochondrion, complete genome	Canis lupus fami...	429	637	98%	2e-115	93.88%	16730	KM061475.1
Canis lupus familiaris haplotype Dog_D27 control region, partial sequence; mitochondrial	Canis lupus fami...	429	631	98%	2e-115	93.88%	535	KC540943.1
Canis lupus familiaris haplotype Be58_1 mitochondrion, partial genome	Canis lupus fami...	429	637	98%	2e-115	93.88%	16530	KJ637144.1
Canis lupus familiaris isolate doberman2 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, co...	Canis lupus fami...	429	637	98%	2e-115	93.88%	1402	JN182114.1
Canis lupus familiaris haplotype HV1 C8 mitochondrion, partial genome	Canis lupus fami...	429	637	98%	2e-115	93.88%	16736	JF342821.1
Canis lupus familiaris mitochondrial gene for tRNA-Pro, D-loop, complete and partial sequence, isolate: Cf97	Canis lupus fami...	429	637	98%	2e-115	93.88%	710	AB605585.1
Canis lupus familiaris DNA, hypervariable region 1 (control region), partial sequence, haplotype: NVLU011	Canis lupus fami...	429	637	98%	2e-115	93.88%	659	AB622523.1

Abb. 1: Ergebnis der Blastanalyse für die Probe 1572-22, Spur 1.

Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Canis lupus isolate DM1124 mitochondrion, complete genome	Canis lu...	gray wolf	9612	1166	1166	99%	0.0	99.53%	16690	MT622509.1
Canis lupus haplotype W1-LT control region, partial sequence; mitochondrial	Canis lu...	gray wolf	9612	1166	1166	99%	0.0	99.53%	682	JX508634.1
Canis lupus x Canis lupus familiaris isolate ehy6 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tR...	Canis lu...	wolfdog	990119	1166	1166	99%	0.0	99.53%	1393	JN182126.1
Canis lupus isolate w32latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, co...	Canis lu...	gray wolf	9612	1166	1166	99%	0.0	99.53%	1402	JN182087.1
Canis lupus isolate w19latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, co...	Canis lu...	gray wolf	9612	1166	1166	99%	0.0	99.53%	1342	JN182074.1
Canis lupus isolate w5latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, com...	Canis lu...	gray wolf	9612	1166	1166	99%	0.0	99.53%	1372	JN182060.1
Canis lupus isolate w3latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, com...	Canis lu...	gray wolf	9612	1166	1166	99%	0.0	99.53%	1292	JN182058.1
Canis lupus isolate w36estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, c...	Canis lu...	gray wolf	9612	1166	1166	99%	0.0	99.53%	1442	JN182054.1
Canis lupus isolate w28estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, c...	Canis lu...	gray wolf	9612	1166	1166	99%	0.0	99.53%	1422	JN182046.1
Canis lupus isolate w31estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, c...	Canis lu...	gray wolf	9612	1166	1166	99%	0.0	99.53%	1392	JN182049.1

Abb. 2: Ergebnis der Blastanalyse für die Probe 1574-22, Spur 3.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und Begutachtung der vorgegebenen Beweisfragen

Aus allen fünf Spuren ließen sich jeweils nur wenige spezifische, autosomale und gonosomale Merkmale nachweisen und nur aus den **Spuren 1 (1572-22, Haare)** und **3 (1574-22, Haare)** konnte eine komplette bzw. auswertbare Sequenz der mitochondrialen DNA dargestellt werden.

Die Analyse 17 polymorpher **STR-Merkmale** ergab hier **für alle fünf Spuren**, ein schwaches, autosomales, canides Profil von maximal 5 Markern pro Multiplex-PCR. Entsprechend ist hier in allen Fällen eine Assoziationsanalyse nicht möglich.

Das Amelogeninmerkmal XY sowie der teilweise positive SRY-Test weisen dabei auf **männliche Canidae hin**. Eine weitere Eingrenzung (z.B. Wolf / Hund) ist hier jedoch nicht möglich.

Die Sequenzierung der **mitochondrialen DNA** der **Spur 1 (1572-22)** und **Spur 3 (1574-22)** führte zu einer auswertbaren Sequenz der HV1-Region. Dabei zeigt die **Spur 1 (1572-22)** die höchste genetische Übereinstimmung mit **Hunden aus dem südostasiatischen Bereich** (Amirighanatsaman et.al., 2016) mit dem eher **hundetypischen Haplotyp B58.** Hier konnte allerdings nur ein kurzes Fragment nachgewiesen werden. Die anderen Proben konnten nicht reproduzierbar analysiert werden.

Die **Spur 3 (1574-22)** zeigt die höchste genetische Übereinstimmung zu der maternalen Linie von **Wölfen aus Skandinavien** (Savolainen et.al., 2002) sowie einer bekannten osteuropäischen Hybridenlinie (Hindrickson et.al., 2011). Dies deckt sich mit dem für **Wölfe typischen Haplotypen E1**.

Damit kann zusammengefasst werden, dass an den genannten übersandten Spurenträgern jeweils sicher DNA mindestens eines **Vertreters aus der Familie der Canidae** nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich dabei in allen Spuren wahrscheinlich um ein **männliches Individuum**. Insgesamt wurden mindestens zwei verschiedene Tiere nachgewiesen.

Dabei weist die mitochondriale bei der **Spur 1 (1572-22) auf einen Haushund** und bei **Spur 3 (1574-22) auf einen Wolf** hin, wobei aus forensischer Sicht in beiden Fällen auch ein Wolf-Hund-Mischling nicht ausgeschlossen werden kann, da mit der mitochondrialen Analyse nur die maternale Seite zugeordnet werden kann.

Abschließend muss bemerkt werden, dass die hier untersuchte DNA aufgrund der Umstände (Stichwort: Minimalspur, Untergrund/Herkunft) in schlechter Qualität und Quantität vorliegt, was zu Veränderungen (Degradierung) führen kann. Daher könnten sowohl Allelverluste als auch –gewinne auftreten, die (geringen) Einfluss auf die oben angegebene Beurteilung haben könnten.

[redacted]

6. Methoden und Technisches

6.1 Methoden und Hintergrund

Die folgenden Methoden wurden vom Labor für die Spurenuntersuchung eingesetzt. Alle Methoden und Verfahren sind dabei verifiziert und validiert, in einem laufenden Qualitätsmanagementsystem eingebettet und aktuell akkreditiert (wenn nicht anders beschrieben):

(7) DNA-Extraktion (SAA_009v002):

Die DNA-Isolierung erfolgt durch Aufschluss der kernhaltigen Zellen in mehreren Inkubations- und Waschschritten und der Zugabe sogenannter Magnetic beads. Diese binden die DNA-Moleküle, die dann erneut durch verschiedene Schritte gewaschen und eluiert werden können. Die Aufarbeitung wird dabei mit einem Extraktionsgerät von ThermoFisher durchgeführt.

(8) Generelles zur DNA-Analyse, Darstellung, Auswertung:

Die DNA oder DNS (Desoxyribonukleinsäure) ist der Träger der Erbsubstanz, die in den Zellkernen auf langen Molekülfäden spiralig angeordnet ist. Sie besteht aus Einzelbausteinen, die 4 Basen enthalten (Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin). Die Anordnung entspricht dem genetischen Code.

An bestimmten Orten im Genom befinden sich sogenannte short tandem repeats (STRs), Bereiche der DNA, die sich durch spezifische Abfolgen von 2 bis 4 Basenpaaren Länge auszeichnen, die in Wiederholungen von 10 bis 40 vorkommen. Diese Wiederholungsanzahl ist individuell unterschiedlich und wird als Merkmal für jeden Genort kodominant vererbt. Bei Mischerbigkeit sind zwei unterschiedliche Fragmente (=Allele) nachweisbar. Bei Reinerbigkeit liegen zwei identische Fragmente (Allele) vor. Diese short tandem repeats sind sämtlich in den sogenannten nicht-kodierenden Bereichen der DNA lokalisiert, so dass mit keinem Genort Rückschlüsse auf eventuelle Erkrankungen oder Fehlbildungen geschlossen werden können. Dabei werden 16 bis 23 dieser STR-Merkmale analysiert (SAA_12v001 und 13v001). Immer ein Merkmal wird von der Mutter, eines vom Vater vererbt, so dass über den Nachweis der STRs und mit Wissen der Frequenz der einzelnen genetischen Merkmale Abstammungsgutachten durchgeführt werden können (SAA_015v001). Zusätzlich ist auch eine Identitätsüberprüfung möglich. Da die verschiedenen Merkmale unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten aufweisen (d.h. unterschiedlich häufig in der Bevölkerung vorkommen), kann berechnet berechnen werden, wie wahrscheinlich es ist, dass z.B. eine bestimmte biologische Spur von einer bestimmten Person stammt (SAA_016v001), wenn all deren Merkmale mit denen der Spur übereinstimmen. Im Fall sogenannter Mischspuren, die von mehr als einer Person verursacht wurden, können ebenfalls über weitere Rechenwege nach Schneider et al, 2006 biostatistische Aussagen zur Entstehung bzw. Zugehörigkeit einer Mischspur erstellt werden (SAA_17_v001).

(10) Fragmentanalyse (SAA_014v001):

Durch den Einsatz spezifischer, fluoreszenzmarkierter Primer können diese relativ kurzen DNA-Fragmente in einem Polymerase-Ketten-Verfahren (PCR) vervielfältigt und in einer automatischen Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese und Laserdetektion in z.B. einem AbiPrism3130 (Fa. Applied Biosystems) bestimmt werden.

(11) Hundespezifische Analysen (SAA_019v001, nicht aktuell akkreditiert):

In zwei verschiedenen kommerziell erhältlichen Multiplex-Kits können STR-Merkmale amplifiziert werden, die spezifisch für die Familie der Canidae sind. In diesem Gutachten wird der Stockmarks Canine for Dogs Kit von Thermo Fisher eingesetzt, mit dem 10 dieser Merkmale nachgewiesen werden können. Auch diese Merkmale kommen in unterschiedlichen Häufigkeiten vor, so dass ebenfalls einfache Identitätsuntersuchungen und Abstammungsanalysen durchgeführt werden können. Die benötigten Frequenzdaten hierzu sind einer naturwissenschaftlichen Doktorarbeit (Modrow, 2014, Kiel) entnommen und werden laufend aufgestockt. Ähnlich wie beim Menschen, gibt es auch bei Hunden spezifische Häufigkeitsverteilungen, die

hier für die verschiedenen Rassen spezifisch sind. Daher kann über eine Assoziationsanalyse mit den erhaltenen Daten eine Zuordnung zu einer bestimmten Hunderasse durchgeführt werden. Hierzu müssen Daten für die entsprechende Rasse in der Datenbank vorliegen. Rassen, die hier nicht untersucht wurden, können durch diese Analyse nicht bestimmt bzw. zugeordnet werden. Zusätzlich wird eine PCR-gestützte Geschlechtsbestimmung durchgeführt.

(15) Hinweise zur forensisch-genetischen Rissanalyse (nicht akkreditiert):

Unsere Gesamtbeurteilung bzgl. der genetischen Übereinstimmung mit dem Wolf richtet sich nach dem Washingtoner Artenschutzabkommen Artikel II und den Mendel'schen Vererbungsregeln wie folgt:

>75 %	es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen „reinrassigen" Wolf.
<75 % und >25 %:	es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Wolf-Hund-Hybriden der F1, F2, F3 oder F4 Generation bzw. deren Rückkreuzungen (B1-B4) oder einem der Hunderassen mit hoher Wolfsähnlichkeit (Sallus Wolfshund und Wolfs-/Großspitz) bzw. eines Mischlings desselben bei den niedrigeren Werten.
<25 %:	es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um einen direkten Wolfsabkömmling, sondern um einen Hund der zusätzlich angegebenen Rassen.

Gerechnet wird ab dem Nachweis von Merkmalen in 6 Genorten. Bei einem Nachweis von Merkmalen in 6 bis 7 Genorten wird ein Korrekturfaktor von 15 % einberechnet, der das eigentliche Ergebnis korrigiert; bei einem Nachweis von Merkmalen in 8 bis 9 Genorten beträgt er 10 %. Dies dient dem Vermeiden falsch-positiver bzw. negativer Spezieszuordnungen. Angegeben wird der Mittelwert.

- Die Interpretation bezüglich einer möglichen Zugehörigkeit zum Wolf bezieht sich dabei auf die Untersuchung von mehr als 1900 Hunden aus über 150 Rassen, bei denen in keinem Fall mehr als 35 % genetische Ähnlichkeit zum Wolf festgestellt werden konnte. Dabei werden die spezifischen Merkmalsmuster der Hunde mit denen der Wölfe im Rahmen einer Assoziationsstudie verglichen. Die Merkmalsmuster entstammen eigenen Untersuchungen und Literaturangaben (n=2100, Broad Institute. 2014. Broad Institute, broadinstitute.com: http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data, Ganco, L., et al. Genetic diversity analysis of 10 STR's loci used for forensic identification in canine hair samples. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2. 2009, S. 288-289.)
- Zusätzlich beinhaltet die Analyse den Abgleich mit Merkmalen, die für den Fuchs typisch sind. Auch hierzu wurden eigene Daten erstellt und zusätzlich auf die aus der Literatur zurückgegriffen (n=68, A Multiplex PCR assay to differentiate between dog and red fox: Forensic Sci Int Genet 2011 Nov 29;5(5):411-4. Epub 2010 Dec 29,M Weissenberger, W Reichert, R Mattern/A marker set for construction of a genetic map of the silver fox (Vulpes vulpes):J Hered 2004 May-Jun;95(3):185-94,A V Kukekova, L N Trut, I N Oskina, A V Kharlamova, S G Shikhevich, E F Kirkness, G D Aguirre, G M Acland /Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family: Mamm Genome 1995 Jan;6(1):11-8 M Fredholm, A K Winterø).

Alle von uns untersuchten Proben werden in eine von ForGen entwickelte und geführte Datenbank eingespeist. Alle Rissproben werden als Gruppe „Risse" geführt; alle Wolfsproben als Gruppe „Wölfe". Letztere wird weiter unterteilt in „Baltische" und "russische" und „lettische" Population. Im Rahmen einer Identitätsüberprüfung und Assoziationsanalyse werden neue Daten mit den in der Datenbank vorhandenen Merkmalsmustern abgeglichen und Ähnlichkeitswerte bestimmt. Dies ermöglicht eine Zuordnung zu den Gruppen Riss, Wolf (mit Untergruppen), Hund (mit Untergruppen) bzw. eine Zuordnung zu einer einzelnen Probe („Match") bei einer vollständigen Übereinstimmung. Im letzteren Fall wäre auch über die Bestimmung der Genotyphäufigkeit eine statistische Würdigung einer Probenzugehörigkeit möglich. Stimmt ein Teilmuster mit einem Tier überein, kann auch dieses biostatistisch berechnet werden. Da allerdings die Verwandtschaftsgrade insbesondere bei den Wolfsgruppen nicht bestimmbar sind, können derartige Analysen nur als Annäherungswerte angesehen werden.

(16) Analyse der mitochondrialen DNA (mtDNA, nicht akkreditiert):

Die mitochondriale DNA (mtDNA) wird bei Hunden als Ergänzung zur Assoziationsanalyse (nDNA), wenn z.B. nicht genügend (intakte) nukleäre DNA für die Erstellung eines genetischen, autosomalen Merkmalsmusters vorliegt. D.h., wenn DNA-Qualität und -Quantität nicht für eine Analyse der nukleären DNA ausreichen. Aufgrund der maternalen Vererbung der mitochondrialen DNA (mtDNA) lässt sich diese Methodik nur eingeschränkt nutzen und wird daher von uns ergänzend zur Analyse der nukleären DNA eingesetzt. Bei der Analyse der mtDNA werden ein 319 bp und-wenn möglich- ein 740 bp großes Fragment aus dem hypervariablen Bereich des mtDNA Genoms sequenziert (anlehnend an Gundry, et al. 2007, Schneider, Seo und Rittner 1999). Das resultierende Sequenzmuster wird im letzten Schritt mittels Alignment-Algorithmen analysiert und u.a. mit der NCBI Datenbank abgeglichen. Dieses Verfahren ist durch die Wahl der Primer spezifisch für die Familie der Canidae und ermöglicht durch einen Abgleich die Erstellung eines mtDNA Haplotyps und die maternale Zuordnung z.B. zu Hund oder Wolf. Bei der Haplotypzuordnung wird sich an der Arbeit von Thai et al, 2016 orientiert.

Die mitochondriale DNA (mtDNA) wird außerdem als zusätzliche Analyse zur Speziesidentifizierung eingesetzt. Bestimmte Bereiche dieser DNA sind bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich, so dass über die Sequenzierung dieser Bereiche und dem anschließenden Abgleich der Sequenz mit Proben in einer internationalen Datenbank („Blast", NCBI) überprüft werden kann, zu welcher Spezies die untersuchte Probe gehört. Hierbei wird ein ca. 148 bp großes Fragment im Bereich des Cytochrom B der mitochondrialen DNA sequenziert und mit der obengenannten Datenbank abgeglichen (siehe Lopez-Oceja et al.(2016)). So ist die genetische Unterscheidung verschiedener Säugetiere, Amphibien, Reptilien und Insekten bzgl. ihrer Art und z.T. auch Unterart möglich.

6.2 Verbleib

Die für die vorliegende Untersuchung benutzten Spurenträger/Lösungen werden gem. Verfahrensanweisung FG_VA_008v001 Probengewahrsam wie folgt aufbewahrt:

Material	Aufbewahrung Entsorgung
Originäre Spuren (z.B. Sektionsasservate)	1 Jahr nach erfolgter Analyse und Gutachtenausgang
Extrahierte DNA aus obigen Spuren	s.o.
Mundschleimhautabstriche/Blut als VM	Sofortige Vernichtung nach Gutachtenausgang
Extrahierte DNA aus VM	s.o.
Spurenträger (Gegenstände) als VM in Identifizierungsfällen	4 Wochen nach Gutachtenausgang
Extrahierte DNA aus obigen Fällen	5 Jahre
Weitere Spurenträger/Abstriche diverse ohne spezielle Vereinbarung	2 Jahre
Extrahierte DNA aus obigen Spuren	5 Jahre

Diese Fristen gelten nicht, wenn seitens des Auftraggebers Einspruch eingelegt wird, bestimmte Abmachungen vorliegen oder, wenn es sich um Analysen im Rahmen eines Tötungsdeliktes oder anderer Kapitaldelikte handelt. Diese Proben werden langfristig asserviert.