

Ikke-teknisk redegørelse der besvarer forskellige spørgsmål i relation til DNA-analyser fra nedlagte husdyr mm.

Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 26. maj 2015

Liselotte Wesley Andersen

Institut for Bioscience - Kalø

Rekvirent:
Naturstyrelsen
Antal sider: 9

Faglig kommentering:
Aksel Bo Madsen

Kvalitetssikring, centret:
Jesper Fredshavn



AARHUS
UNIVERSITET

DCE - NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Tlf.: 8715 0000
E-mail: dce@au.dk
<http://dce.au.dk>

Indhold

Baggrund	3
Kan spytpøver vise art og individ med samme sikkerhed som en blodprøve?	3
Hvordan sikres, at prøver ikke "forurenes" med DNA i laboratoriet og dermed viser falske resultater?	4
Indtil videre har ingen prøver været "blanke" (hverken vist hund eller ulv), selvom der i enkelte tilfælde har været en formodning om, at dyret var nedlagt af en ræv. Kan dette forhold forklares?	5
I Sverige tages angiveligt kun DNA prøver fra nedlagte husdyr om vinteren. Har DCE kendskab til praksis for prøvetagning i andre lande? Bør praksis i Danmark ændres? Hvis der foreslås en ændring beskrives denne.	5
Har DCE en egen kontrolmekanisme der verificerer de resultater man finder i laboratoriet og i hvilket omfang benytter man eksterne tests til at verificere egne resultater?	6
Analyseres positive ulveprøver for om der er slægtskab til andre ulveindivider?	7
DCE bedes give en oversigt over hvilket biologisk materiale (spyt, fæces, urin) fra ulv der kan vise henholdsvis art og individ	9
Referencer	9

Baggrund

DNA materiale fra sår af nedlagte dyr analyseres med henblik på at afklare, om ulv står bag drabet. Metoden har været anvendt i Danmark siden ulven vendte tilbage til dansk natur i 2012. Naturstyrelsen bliver stillet spørgsmål om, hvad disse prøver viser, og hvilke fejlkilder der kan være i forbindelse med analyserne og har derfor behov for en ikke-teknisk redegørelse, der kan bruges i formidlingen af dette stofområde.

Naturstyrelsen har den 3. marts 2015 anmodet DCE om, at udarbejde en ikke-teknisk redegørelse om DNA-analyser for ulv. Redegørelsen skal mindst besvare følgende spørgsmål:

- Kan spytprøver vise art og individ med samme sikkerhed som en blodprøve?
- Hvordan sikres, at prøver ikke "forurenes" med DNA i laboratoriet og dermed viser falske resultater?
- Indtil videre har ingen prøver været "blanke" (hverken vist hund eller ulv), selvom der i enkelte tilfælde har været en formodning om, at dyret var nedlagt af en ræv. Kan dette forhold forklares?
- I Sverige tages angiveligt kun DNA prøver fra nedlagte husdyr om vinteren. Har DCE kendskab til praksis for prøvetagning i andre lande? Bør praksis i Danmark ændres? Hvis der foreslås en ændring beskrives denne.
- I Sverige tages angiveligt kun DNA prøver fra nedlagte husdyr om vinteren. Har DCE kendskab til praksis for prøvetagning i andre lande? Bør praksis i Danmark ændres? Hvis der foreslås en ændring beskrives denne.
- Har DCE en egen kontrolmekanisme der verificerer de resultater man finder i laboratoriet og i hvilket omfang benytter man eksterne tests til at verificere egne resultater?
- Analyseres positive ulveprøver for om der er slægtskab til andre ulve-individer?
- DCE bedes give en oversigt over hvilket biologisk materiale (spyt, fæces, urin) fra ulv der kan vise henholdsvis art og individ.

Kan spytprøver vise art og individ med samme sikkerhed som en blodprøve?

DNA, der udvindes fra spyt og blod tages direkte på det individ, der skal undersøges (dvs det kan forventes, at der ikke er DNA fra andre arter eller individer iblandet), er kvalitetsmæssigt ikke væsensforskellig, hvilket betyder, at det med meget stor sikkerhed er muligt at bestemme både art og individ. I modsætning hertil vil spyt taget på nedlagt vildt eller nedlagte husdyr indeholde en blanding af DNA fra det nedlagte dyr samt de tilstedeværende bakterier, hvor mængden af de sidst nævnte er afhængig af temperatur, fugtighed og hvor lang tid det nedlagte dyr har ligget før, der bliver taget en prøve til DNA-analyse. Det betyder, at der er en meget lille koncentration af det DNA, som er afsat af den pågældende art, der har spist af dyret i forhold til hvis der blev taget en blodprøve af denne art/individ. Derfor er det vanskeligere at foretage end DNA-analyse på en spytprøve indeholdende en sådan 'DNA-suppe' med DNA fra forskellige organismer i forhold til at foretage en DNA-analyse på DNA fra en ren blodprøve.

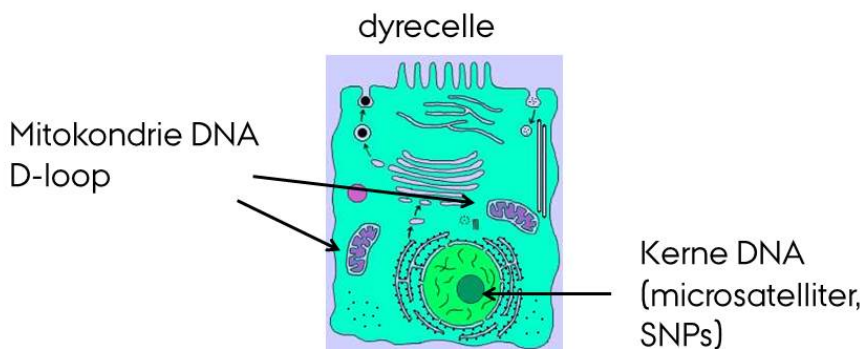
At det alligevel er muligt at bestemme en art ud fra DNA i en spytprøve fra et nedlagt dyr skyldes den markør, der benyttes til at artsbestemme, mens det er vanskeligere at kønsbestemme og individbestemme. Ved artsbestemmelse

benyttes en markør, der sidder i cellens mitokondrier, mens markørerne til kønsbestemmelse og individbestemmelse sidder i cellens kerne, hvoraf der kun findes en (Figur 1). Da en celle har flere mitokondrier er der en naturlig højere koncentration af DNA fra mitokondrierne i forhold til det DNA, der sidder i cellekernen. Dette er årsagen til, at det er lettere at artsbestemme end individ- og kønsbestemme ud fra en sådan spytprøve. Denne omstændighed betyder også, at individbestemmelse ud fra spytprøverne ofte ikke benyttes til selve opbygningen af DNA-registret over ulvene i Danmark, men at spytprøven benyttes med stor succes til artsbestemmelse. Alle DNA-prøver, der benyttes til individ- og kønsbestemmelse, bliver analyseret mindst 4 gange, nogle gange 8, for opveje variationen i forbindelse med opformeringen af de relevante benyttede markører. Selv på denne baggrund er det langt fra alle prøver, der bliver benyttet til DNA-registret.

Figur 1. Dyrecelle med organeller der viser, at der er DNA i cellens mitokondrier (mitokondrie DNA) og i cellekernen (kerneDNA). Mitokondrierne nedarves fra mor til afkom, hvilket betyder at der ikke er noget arvemateriale fra faderen i dette. I cellekernen er der arvemateriale fra både mor og far, hvilket betyder at man ved at benytte gener eller genvarianter i form af mikrosatellitter eller SNP's der sidder her kan afgøre om et individ kan være afkom af et givet forældrepar.

Genetiske markører

- Mikrosatellitter
- mtDNA (D-loop)
- Single nucleotide polymorphism (SNPs)



Hvordan sikres, at prøver ikke "forurenes" med DNA i laboratoriet og dermed viser falske resultater?

Alle prøver, der bliver indleveret fra "mulig ulv", dvs. både spyt-prøver og ekskrementprøver, bliver analyseret i laboratorier, hvor der kun foretages DNA analyser af prøver med lav DNA-koncentration. Disse laboratorier er fysisk adskilte fra laboratorier, hvor der f.eks. analyseres DNA fra vævsprøver, hvor DNA-koncentrationen er væsentlig højere end i prøver fra ekskrementer og spyt taget på nedlagt bytte. Det betyder, at der ikke arbejdes med DNA fra vævsprøver og DNA fra spytprøver i samme laboratorium. Når DNA'et er ekstraheret i de forskellige laboratorier foretages opformeringen af markørerne i et tredje laboratorium i et stinkskab, hvor der er installeret uv-lys, der destruerer muligt uønsket DNA. Alle opformeringer sker med negative og med positive kontroller for at spore forureninger i de benyttede enzymer og kemikalier samt falske positive. Negative kontroller er prøver, hvor der ikke er tilsat DNA, dvs. der er kun enzym og andre kemikalier der benyttes til PCR-reaktion, mens en positive kontroller er prø-

ver, hvor der tilsættes DNA fra en kendte hunde eller ulve. På denne måde kontrolleres det, om opformeringen har foregået korrekt og om der er forurening der kunne give en fejlagtig fortolkning af, at prøven stammer fra hund eller ulv.

Indtil videre har ingen prøver været "blanke" (hverken vist hund eller ulv), selvom der i enkelte tilfælde har været en formodning om, at dyret var nedlagt af en ræv. Kan dette forhold forklares?

Der har været et enkelt tilfælde, hvor det ikke har været muligt at opformere DNA fra ulv eller hund. Ifølge den aftale, der foreligger omkring DNA-analyserne mellem NST og DCE, Kalø analyseres en prøve 4 gange. Såfremt der efter disse 4 gange ikke foreligger en opformering af den relevante DNA-sekvens, bliver prøven betragtet som uafklaret og bliver destrueret. Denne aftale trådte i kraft oktober 2014. De prøver, der var i pipelinen på dette tidspunkt, blev ikke underkastet denne bestemmelse, hvorfor nogle prøver er kørt flere end de aftalte 4 gange, dvs. til det lykkedes at få et produkt, der kunne sekvenseres. I forbindelse med nogle af de indleverede spytp prøver har der været en formodning om, at det har været en ræv, der har nedlagt byttet. Resultatet af DNA-analysen har så efterfølgende vist, at der har været en hund eller en ulv. Det udelukker ikke at ræven eller andre dyr også kan have været på spil, men det viser de gennemførte analyser ikke, da de er sat op til kun at påvise DNA fra enten hund eller ulv. Sammenholdt med de laboratoriemæssige foranstaltninger for at undgå kontaminering, som beskrevet ovenfor, betragtes det som meget usandsynligt, at der har været tale om falske positive i de beskrevne tilfælde.

I Sverige tages angiveligt kun DNA prøver fra nedlagte husdyr om vinteren. Har DCE kendskab til praksis for prøvetagning i andre lande? Bør praksis i Danmark ændres? Hvis der foreslås en ændring beskrives denne.

Af Rovdata basen (<http://www.rovdata.no/Instrukser.aspx>), der er en samlet database over rovdyr i Norge og Sverige, fremgår, at der indsamles ekskrementer i perioden 1. oktober til 28. februar i kendte territorier med ulvekobler, og at der kun analyseres prøver, der er indsamlet i denne periode. I områder hvor der ikke er påvist ulv eller ulveterritorier indsamles og analyseres ekskrementprøver uafhængigt af dette tidspunkt.

Med hensyn til analyse af indsamlede spytp prøver har det ikke været muligt at finde dokumenterede informationer omkring, hvilken sæson de bør indsamles. Ifølge de svenske retningslinjer for vurdering af husdyrangreb fremgår det at vurderingspersonen kan tage spytp prøver til DNA-analyser (Levin et al. 2008). På det Svenske Viltskadecenters hjemmeside (http://www.viltskadecenter.se/index.php?option=com_content&task=view&id=151&Itemid=962#SALIVPROV_VID_BESIKTNING_AV_D_DA_TAMDJUR) fremgår det, at der kun i særlige tilfælde tages spytp prøver fra nedlagte husdyr. Ifølge en nyere rapport, der omhandler et udkast til fælles overvågning af ulv i Sverige og Norge (Wilkenros et al. 2014) fremgår det i et faktablad om indsamling af biologisk materiale til DNA-analyser, at spytp prøver tages på friske kadavere, hvor "friske" defineres som mellem 0-2 dage gamle. Der er ikke specificeret, hvornår på året disse skal tages.

Det har ikke været muligt at finde retningslinjer for, hvornår der skal tages spytp prøver af nedlagte husdyr i Tyskland. Det er DCE bekendt, at der bliver

taget spytpøver på husdyr, og at disse bestemmes til art og individ i det omfang, det kan lade sig gøre. Det er ligeledes intensionen i Holland, at benytte spytpøver fra nedlagte husdyr til verifikation af ulv.

Som det fremgår, er der forskellig tilgang til at benytte spyt til verifikation af ulv i forbindelse med nedlagte husdyr. I de skandinaviske lande som Sverige og Norge er man tilsyneladende mere restriktiv med hensyn til at benytte spyt fra byttedyr sammenlignet med f.eks. Tyskland. Dette kan formodentlig bero på, at selve sporingen af ulv i Sverige og Norge er lettere pga. længere vintre med sne, og at det derfor er muligt at tilrettelægge en decideret overvågning af ulv baseret på snesporing og man derfor har lettere ved at påvise ulv alene på påvisning af spor. Det er ikke næppe muligt i Danmark eller Tyskland at basere overvågningen af ulv på snesporing.

Erfaringerne fra Danmark er, at det er muligt i stort set alt det indleverede materiale at identificere spytpøver til art, mens det er vanskeligere at bestemme køn og individ ud fra disse. Ved en eventuel ændring i indsamlingspraksis burde denne bestå i en optimering af prøvetagningstidspunktet samt den efterfølgende behandling af prøverne, der kan tørres i stedet for at blive frosset direkte. Det er meget vigtigt at være opmærksom på kontaminering fra hund. Således bør husdyrrejererens opmærksomhed på, at det nedlagte husdyr afskærmes fra hunde. Samtidig kan der ske en optimering omkring selve prøvetagningen og prøvetagningsudstyret og mærkningen af dette. Dette kunne for eksempel være en prioritering af at komme meget hurtigt ud til et nedlagt bytte, så prøvetagningen er foretaget på så friskt et kadaver som muligt, såfremt dette ikke allerede er en del af beredskabet. Samtidigt kunne man f.eks. begynde at tørre spytpøverne for at undersøge om det ville give bedre resultater, og man kunne indføre et stregkodnings-system som fulgte prøven med informationer om dato og GPS koordinater mm.

Har DCE en egen kontrolmekanisme der verificerer de resultater man finder i laboratoriet og i hvilket omfang benytter man eksterne tests til at verificere egne resultater?

I forbindelse med kvalitetssikring af resultaterne sørger laboratoriet for altid at medtage både negative og positive kontroller i alle analyser som beskrevet ovenfor. I forbindelse med bestemmelse til art foretages denne ved en sekvensering af den opformerede DNA-sekvens. Sekvenseringen bliver foretaget i Holland i firmaet MACROGEN. Når sekvensen foreligger sammenlignes den med sekvenser i en international database, GenBank. Ligeledes sammenlignes sekvenserne med sekvenser fra de tyske ulve, der er udleveret af Senckenberg Institutet, Frankfurt Tyskland, og der er løbende samarbejde om resultaterne. Når der er mere end 98% match til enten ulv eller hund bliver den analyserede sekvens betragtet som én af de to arter. Sekvensen betragtes som et bevis for den pågældende art. Ved tvivlstilfælde køres prøven om. Er der stadig ikke et tydeligt resultat afsluttes prøven som værende uafklaret.

Med hensyn til individbestemmelse og kønsbestemmelse benyttes samme markører og procedurer som Senckenberg Institutet. Samtidig er markørerne mellem de to laboratorier kalibrerede, så det er muligt at sammenligne og lede efter match i det tyske DNA register. Alle analyser af formodede ulve i Tyskland foregår kun ét sted, så man mindsker usikkerheden omkring identifikationen af individer. Ved eksistensen af flere registre ville det kræve en kontinuerlig sammenligning mellem laboratorier for at verificere om ny-

analyserede individer eksisterede i registret i forvejen. Det ville kræve en stor grad af koordinering og gøre arbejdsgangene længere og risikoen for fejl større. Ligeledes for at sikre kalibreringen og individ identifikation af ulve i Danmark foretages jævnligt besøg på Senckenberg Institutet, hvor tolkningen af markørerne bliver checket og diskuteret. I samarbejde med tyskerne, polakkerne og hollænderne er der dannet et genetisk konsortium, CEWOLF konsortiet (central-europæiske ulve-bestand), der benytter samme laboratorie-teknikker og genetiske markører, samt deler et referencemateriale, der indtil videre består af prøver fra Tyskland, det vestlige, nordøstlige og sydøstlige Polen samt Estland. Danske prøver er endnu ikke inkluderet, da referenceprøverne alle er DNA fra vævsprøver. Den eneste vævsprøve der eksisterer fra Danmark er Thy-ulven. Dermed er det muligt at undersøge ved hjælp af populations genetiske undersøgelser, hvilken bestand et individ er tættest beslægtet med og ud fra dette sende den pågældende DNA-profil til et af de andre laboratorier for at lede efter et match. På denne måde er det muligt at følge et individs vandringmønster.

Analyseres positive ulveprøver for om der er slægtskab til andre ulveindivider?

Når en prøve kommer ind i laboratoriet bliver den først analyseret til art som beskrevet ovenfor. Såfremt den er positiv for ulv bliver den udvalgt til at gå videre til køns- og individbestemmelse. Dette sker ved hjælp af genetiske markører, der sidder i cellens kerneDNA. Markørerne kaldes mikrosatellitter og er karakteriserede ved at være små DNA sekvenser bestående af forskellige gentagne basesekvenser af forskellig længde. Der analyseres i alt 12 genetiske markører, og et individs DNA-profil sammensættes af disse 12 markører (Andersen et al. 2015). For at et individ genkendes, skal den ideelt set have de samme markører på tværs af alle disse markører. Da DNA'et der arbejdes med i forbindelse med ulv kommer fra spyt- og ekskrement prøver og dermed er opblandet med DNA fra andre organismer som beskrevet i 1), er det ikke nødvendigvis alle 12 markører der bliver opformuleret hos hvert individ. Derfor slækkes der på kravet om, at information fra alle markørerne skal være til stede .

Det er muligt at påvise om der er søskende blandt individerne på baggrund af DNA-profilerne. Dette gøres på baggrund af at markørerne nedarves biparentelt, hvilket betyder, at et gen (en allel) kommer fra moderen og et fra faderen. Derfor er der to gener (alleler) i hver markør. Et søskende par deler derfor mindst et og samme gen (allel) på tværs af alle markørerne (Mendelsk nedarvning). Hvis der er 12 markører er der 24 gener, og for at to individer er søskende deler de mindst 12 gener, et fra hver markør. Alle de hidtidige analyserede og påviste individer (Tabel 1) er blevet testet for søskende-slægtskab. Individ UV002 og UV003, UV009 og UV010 samt UV011 og UV013 kan på ovennævnte baggrund være søskendepar. UV002 og UV003 er de to ulve, der kommer fra Lubasco koblet og som ligeledes kan være søskende, hvilket antyder, at disse kan have vandret sammen fra det vestlige Polen til Danmark. UV001 i tabellen er påvist hele 9 gange. Den er halvbror til Thy-ulven og er den han-ulv der betragtes som værende stedfast i Danmark.

Tabel 1. Antal individer (minus Thy ulven) hidtil rapporteret fra det danske DNA-register over ulve pr januar 2015 (Kilde: Institut for Bioscience, Aarhus Universitet).

	Køn	Første spor	Seneste spor	Genfangst	Landsdel	Oprindelse	
UV001	Han	Februar 2013	Juli-2013	7 gange	Midtjylland	Tyskland Milkeler koblet	halv bror til Thy ulven
UV004	Han	25_02_2013	10_8_2013	2 gange	Midtjylland	Nord-østlige Polen-Baltikum	
UV005	Han	21_10_2013	30_12_2013	3 gange	Vestjylland	Nord-østlige Polen-Baltikum	
UV002	Han	Feb/marts 2013		1 gang	Midtjylland	Polen Lubsko koblet	Søskende til UV003*
UV003	Han	Feb/marts 2013		1 gang	Midtjylland	Polen Lubsko koblet	
UV006	Han	01_12_2013		1 gang	Nordvestjylland	Nord-østlige Polen-Baltikum	
UV007	Han	01_12_2013		1 gang	Nordvestjylland	Nord-østlige Polen-Baltikum	
UV008	Han	10_09_2013		1 gang	Sydvestjylland	Nord-østlige Polen-Baltikum	
UV009	Han	2013		1 gang	Sydjylland	Nord-østlige Polen-Baltikum	Søskende til UV010*
UV010	Han	2013		1 gang	Vestjylland	Nord-østlige Polen-Baltikum	
UV011	Han	December 2013		1 gang	Midtjylland	Nord-østlige Polen-Baltikum	
UV001	Han	Juni2014	Juli2014	2 gange	Midtjylland	Tyskland Milkeler koblet	
UV012	Han	juni 2013		1 gang	Djursland	under analyse	
UV013	Han	07_03_2014		1 gang	Djursland	under analyse	
UV014	Han	marts 2014		1 gang	Midtjylland	under analyse	
UV015	Han	02_04_2014		1 gang	Midjylland	under analyse	
UV016	Han	14_04_2014		1 gang	Sydjylland	under analyse	
UV017		9_10_2014		1 gang	Østjylland	under individ analyse	
UV018	Han	17_04_2014	07_08_2014	3 gange	Sydvestjylland	under analyse	

*kan være søskendepar ifølge beskrivelsen om at dele gener på tværs af markørerne.

DCE bedes give en oversigt over hvilket biologisk materiale (spyt, fæces, urin) fra ulv der kan vise henholdsvis art og individ

Følgende biologisk materiale kan vise henholdsvis art og individ:

- Spyt: art, køn og individ
- Fæces: art, køn og individ
- Urin: art, køn og individ
- Østrusblod: art, køn og individ
- Blod: art, køn og individ
- Væv: art, køn og individ.

Som udgangspunkt kræver det i alle tilfælde at prøverne er friske og behandlet efter forskrift for, hvordan man bedst bevarer DNA fra disse. Grundet et ihærdigt laboratorie arbejde kan det lykkes at få disse informationer ud af mindre optimalt opbevarede prøver, men det kræver tid da prøverne ofte skal køres mange gange for at opnå en troværdig profil.

Referencer

Andersen LW, Elmeros M, Sunde P, Olsen K, Vedel-Smith C, Jensen TS, Madsen AB(2015) DNA-baseret bestandsovervågning afslører ulve i Danmark- Flora & Fauna 121 in press.

Levin M, Karlsson J, Svensson L, HansErs M, Ängsteg I. 2008. Besiktning av rovdjursangripna tamdjur. ISBN 978-91-977318-0-5, Viltskadecenter 2008.

Wilkenros C, Berg L, Brendryen SA, Flagstad Ø, Jonsson B, Larsson P, Strømseth TH, Svensson L, Liberg O 2014. Förslag till samordning av inventering av varg i Norge och Sverige. NINA Rapport 993. 83 s. ISSN: 1504-3312, ISBN: 978-82-426-2603-5.