

PROCEDURE VOOR GENETISCHE IDENTIFICATIE
WOLF/HOND OP GEDOOD OF VERWOND VEE
VERSIE 2.2 – 1 JUNI 2021

■■■■■■■■■■, ■■■■■■■■■■, ■■■■■■■■■■

Inleiding

De wolf (*Canis lupus*) is een diersoort beschermd via de bijlages II en IV van de Europese Habitatrichtlijn, en via het Soortenbesluit (Vlaanderen). Schade veroorzaakt door beschermde dieren kan door de Vlaamse Overheid vergoed worden indien aangetoond wordt dat deze door de betreffende soort werd veroorzaakt.

Identificatie van wolf als predator op gedood (klein)vee gebeurt via een autopsie op kadavers, sporenonderzoek in de buurt van een aanval en genetische identificaties op DNA-sporen gevonden op het kadaver. Hieronder beschrijven we de procedure voor genetische identificatie van wolf, en hoe het onderscheid met hond wordt gemaakt. Deze procedures zijn gevalideerd en worden gedeeld binnen het Centraal-Europese Wolf consortium (CE-Wolf), dat genetische laboratoria voor identificatie van wolven kent in Duitsland, Polen, Denemarken, Tsjechië, Oostenrijk, België, Nederland en Luxemburg.

Frankrijk maakt geen deel uit van het CE-Wolf consortium, omdat het historisch een andere reeks merkers gebruikt, gedeeld met laboratoria uit Zwitserland en Italië. Waar dit nodig wordt geacht, wordt wel DNA uitgewisseld met Franse laboratoria, om de herkomst van wolven van Franse herkomst toe te laten. We verwachten wel dat er binnen afzienbare tijd een gemeenschappelijke standaard zal gebruikt worden voor de individuele identificatie van wolven in heel Europa.

Toegepaste methodes

INBO maakt gebruik van drie aanvullende methodes, die verschillende types van identificaties mogelijk maken, en die verschillende gevoeligheden en statistische zekerheid verschaffen over de identificatie. De drie methodes zijn gebaseerd op een polymerase kettingreactie (PCR). PCR kan beschouwd worden als een moleculaire zoekfunctie voor het DNA: we zoeken in een overvloed van DNA van niet-doelsoorten (bv de prooi) naar stukjes DNA die niet voorkomen bij de prooidiersoort en die kenmerkend zijn voor de doelsoorten (wolf, hond, ...). Eenmaal die stukjes DNA zijn gevonden kunnen deze nog bestaan uit verschillende varianten, die per doelsoort verschillen (wolf, hond, goudjakhals, vos, ...) en die zelfs per individu kunnen verschillen. Op deze manier identificeren we de soort en zo mogelijk het individu.

- a. Droplet digital PCR voor een kwantificatie van het aantal kopieën (Copy Number Variation, CNV) van het Amy2B-gen. Het Amy2B-gen is een gen dat in de loop van de domesticatie van de hond van belang is geweest voor een betere vertering van zetmeel, wat bij honden een belangrijk deel van het dieet uitmaakt, maar niet bij wolven (Olivier et al. 2016). Hierdoor komt dit gen bij wolven in slechts twee kopieën voor, en bij honden in twee tot dertig kopieën, afhankelijk van het ras. Bij de grote meerderheid van de hondenrassen komt dit in meer dan 6 kopieën voor, in uitzonderlijke gevallen (sommige ex van primitieve hondenrassen zoals Siberische husky) komen ook maar 2 kopieën voor. Indien we veel meer dan 2 kopieën vinden (in vergelijking met een referentiegen dat zowel in wolf als hond in 2 kopieën voorkomt), dan geeft dit aan dat de predator een hond is in plaats van een wolf. Deze methode detecteert geen andere hondachtigen (vos, goudjakhals, ...). In geval van contaminatie van vos op DNA van honden kan alsnog een signaal vergelijkbaar met dat van wolf ontstaan. Daarom wordt bij een CNV <4, of wanneer het resultaat onder de betrouwbare detectiegrens ligt (>15 droplets op controlegen), deze methode altijd aangevuld met methode b.
- b. DNA-sequencing van de zeer sterk variabele controle-regio (CR) van het D-loop-locus van het mitochondriaal DNA. Dit is een regio die zeer veel varianten ('haplotypes') kent, waarvan sommige zo goed als uitsluitend in wolf voorkomen, en andere varianten uitsluitend van honden gekend zijn. Wanneer de eerste methode (ddPCR amy2B) aangeeft dat het mogelijk om wolf gaat, wordt deze methode gebruikt om verder te verfijnen om welk CR-haplotype het gaat. In NW-Europa kunnen we voornamelijk drie haplotypes van wolf verwachten ((Pilot et al. 2006), die niet of

amper voorkomen bij honden. Het CR-haplotype kan dus toelaten om wolf van hond te onderscheiden in >95% van de gevallen. In combinatie met methode a laat dit een zo goed als 100% correct onderscheid tussen wolf en hond als predator.

- c. DNA-fingerprinting van individuele wolven aan de hand van microsatelliet-loci. Hiervoor worden 12 autosomale en 2 geslachtsgebonden merkers gebruikt, die toelaten om elk individu te herkennen op basis van een DNA-staal (Szewczyk et al. 2020). De DNA-fingerprints ('genotypes') worden vergeleken met een gedeelde databank van de Centraal-Europese wolvenpopulatie, die beheerd wordt door het CE-Wolf consortium. Deze genotypes laten ook toe om nauwe bloedverwanten te identificeren, zoals ouders, en op die manier ook de herkomst van nieuwe genotypes te bepalen. Ook individuele honden kunnen met deze methode 100% herkend worden of aangeduid worden als dader, indien er DNA van een verdachte hond kan afgenomen worden.

Methode a geeft geen resultaat op stalen afkomstig van andere soorten dan wolf of hond, terwijl methode b wel een haplotype geeft voor goudjakhals (*Canis aureus*), maar niet voor vos (*Vulpes vulpes*) of andere predatoren of aaseters (bv everzwijn, *Sus scrofa*). Methode c is bedoeld voor identificatie van individuen (van hond, wolf of goudjakhals) en geeft op enkele van de 12 autosomale loci amplificatie van allelen die karakteristiek zijn voor vos, en laat daardoor toe om contaminatie door vos te identificeren. Indien andere predatoren geïdentificeerd moeten worden op stalen afkomstig van prooidieren, dan moeten andere protocols gebruikt worden (zie Lopez-Bao et al. 2017). In het kader van de analyse van schadegevallen is dit niet aan de orde, omdat dit als voornaamste doel heeft om wolf aan te duiden of uit te sluiten als predator van vee.

Procedure

Staalname-pakketten met swabs worden aangemaakt en staalnames uitgevoerd volgens Standaard Onderzoeksprotocol SOP 04 (zie bijlages).

Stalen die volgens SOP 04 genomen zijn kunnen meerdere maanden bij kamertemperatuur bewaard worden zonder afname van de kwaliteit van het DNA. Het is courant dat er meerdere dagen tot weken liggen tussen staalname in het veld en ontvangst van de stalen in het laboratorium.

Stalen worden binnen 1 maand ontvangen in de ontvangstruimte van het INBO-laboratorium te Geraardsbergen, Gaverstraat 35, en gelogd in het Lab Information Management System (LIMS) van INBO.

DNA-extractie en DNA-sequencing wordt uitgevoerd in het pre-PCR laboratorium van INBO te Geraardsbergen Gaverstraat 35 op volgens standaard-analyse-protocol (SAP) 006I.

Elk staal wordt aan een PCR onderworpen, en elk PCR product wordt minstens tweemaal aan methodes a, b, en/of c onderworpen (driemaal voor c).

Voor methode b wordt elk DNA staal onderworpen aan DNA-sequencing om het haplotype te bepalen op de controle-regio van het mtDNA volgens de nomenclatuur van Pilot et al (2006), en volgens het protocol van Lopez-Bao et al. (2017) aangepast naar Pilot et al. (2006), gebruik makend van de Lang4-primers (F-primer 5'-TCAGTATCTCCAGGTAAACC-3', R-primer 5'-GAGGGACATTACGAGCAA -3'). Dit amplificeert het stuk van de CR D-loop positie 47 tot 276.

DNA sequencing na de PCR volgens Lopez-Bao et al. (2017) gebeurt volgens SAPs 355A, 355B en 335C voor opzuivering PCR-product, sequentiereactie en tweede opzuivering, en meting van de sequenties, respectievelijk.

Gedurende de hele procedure van elke methode worden twee positieve controles meegelopen ('RF'), alsook twee tot vijf negatieve controles ('Blanco'). Voor methode b. moeten de positieve controles positief zijn voor WH02, de negatieve controles moeten negatief zijn en geen zinvolle DNA-sequentie vertonen. De positieve controle bestaat uit tongweefsel van wolf met genotype-code GW913m, die drager is van WH02 (Pilot et al. 2006). GW staat voor Grey Wolf, de cijfercode geeft het volgnummer in de CEWolf databank weer, en m of f geeft het geslacht weer.

Ter vergelijking: wolven in Duitsland, Nederland, Frankrijk komen uitsluitend voor als WH01 (bv GW680f, GW1479f, GW1608m, GW1554m), WH02 (bv GW979m, GW913m) en WH22 (GW1625m). Deze haplotypes komen niet (WH01, WH22) of uiterst zelden (WH02: <2%) voor bij honden. Het vinden van deze haplotypes is dan ook een hard bewijs (WH01 en WH22) of zeer sterke aanwijzing (WH02) voor wolf als dader.

Referenties

- López-Bao, J. V., J. Frank, L. Svensson, M. Åkesson, and Å. Langefors. 2017. Building public trust in compensation programs through accuracy assessments of damage verification protocols. *Biological Conservation* **213**:36-41.
- Ollivier, M., A. Tresset, F. Bastian, L. Lagoutte, E. Axelsson, M.-L. Arendt, A. Bălăşescu, M. Marshour, M. V. Sablin, L. Salanova, J.-D. Vigne, C. Hitte, and C. Hänni. 2016. Amy2B copy number variation reveals starch diet adaptations in ancient European dogs. *Royal Society open science* **3**:160449-160449.
- Pilot, M., W. Jedrzejewski, W. Branicki, V. E. Sidorovich, B. Jedrzejewska, K. Stachura, and S. M. Funk. 2006. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology* **15**:4533-4553.
- Szewczyk, M., S. Nowak, N. Niedźwiecka, P. Hulva, R. Špinkytė-Bačkaitienė, K. Demjanovičová, B. Č. Bolfíková, V. Antal, V. Fenchuk, M. Figura, P. Tomczak, P. Stachyra, K. M. Stępnia, T. Zwijacz-Kozica, and R. W. Mysłajek. 2019. Dynamic range expansion leads to establishment of a new, genetically distinct wolf population in Central Europe. *Scientific Reports* **9**:19003.

Bijlages

Volgende bijlages geven de details van de Standaard Onderzoeksprotocols en Standaard Analyse Protocols van INBO weer:

1. Bijlages_SOPSSAPS.ZIP
2. Bijlages_SAP355C.ZIP