



Instruktion för insamling av biologiskt material för DNA-analys från varg, järv, lodjur och björn

Instruktionen finns att läsa och ladda ner från Viltskadecenters webbplats
www.slu.se/viltskadecenter

Innehållsförteckning

Insamlingsperioder	4
<i>Varg</i>	<i>4</i>
<i>Järv.....</i>	<i>4</i>
<i>Lodjur.....</i>	<i>4</i>
<i>Björn.....</i>	<i>4</i>
Smittorisk vid hantering av rovdjursspillning	5
Undvik kontaminerade prov.....	5
<i>Förebygg kontaminering och smittspridning – rengör redskapen.....</i>	<i>5</i>
Märkning av prov	6
Insamling från varg, järv och lodjur	7
<i>Spillning</i>	<i>7</i>
<i>Sekret (järv).....</i>	<i>8</i>
<i>Urin samt blodstänk och löpblod i snö.....</i>	<i>8</i>
<i>Urin på snöfria substrat (endast varg).....</i>	<i>9</i>
<i>Blod som torkat på växtlighet.....</i>	<i>9</i>
<i>Hår</i>	<i>9</i>
<i>Saliv som tas på tamdjur</i>	<i>9</i>
<i>Prov från munhålan på dött rovdjur</i>	<i>10</i>
<i>Ansvar och rutiner för insamlade prov</i>	<i>11</i>
Sätt rätt analysprioritet	11
Insamling från björn.....	12
<i>Spillning</i>	<i>12</i>
Laboratorier	13
<i>Varg</i>	<i>13</i>
<i>Järv och lodjur.....</i>	<i>13</i>
<i>Björn.....</i>	<i>13</i>
Etiketter, insamlingsmaterial och frankerade kuvert.....	14

<i>Varg, järv, lodjur (och fjällräv)</i>	14
<i>Björn</i>	14
Varför fungerar inte vissa prov?	15
Fältlathund för DNA-prov från varg, järv och lodjur	17

Instruktion för insamling av biologiskt material för DNA-analys från varg, järv, lodjur och björn

Detta dokument innehåller instruktioner för insamling av biologiskt material från stora rovdjur. Det är främst avsett för fältpersonal vid länsstyrelserna i Sverige samt inventeringssamordnare inom svenska samebyar. Genetiska analyser av biologiskt material utgör en central del av rovdjursförvaltningen i både Sverige och Norge. Analyserna används bland annat för inventering, övervakning av genetisk variation (särskilt hos varg) samt som underlag i skyddsjaktsärenden.

Vid provanalysen är målet ofta att identifiera enskilda individer. Det kan i sin tur användas för att beräkna populationsstorlek, särskilja föryngringar och upprätta släktskapsträd. För varg används även DNA-prov inom förvaltningen, till exempel vid skyddsjaktsärenden och inför licensjakt. Dessa kallas förvaltningsprov. För ytterligare instruktioner och faktablad som reglerar inventering av stora rovdjur i Sverige och Norge se www.naturvardsverket.se och www.rovdata.no.

DNA finns i nästan allt biologiskt material, och varje individ har en unik DNA-profil – med undantag för enäggstvillingar. Vid inventering och annan övervakning av stora rovdjur utvinns DNA ofta från material som kan samlas in i fält utan direkt kontakt med djuren. Provmaterialet består då av spillning, urin, sekret (från järv), hår, blod, löpblod (från varg) eller saliv (från dödade tamdjur). Från döda rovdjur samlas DNA in i form av vävnadsprov och i vissa fall genom topsning i munhålan.

DNA är ett känsligt material, det bryts till exempel snabbt ner i varma och fuktiga miljöer. För att maximera möjligheten för lyckad analys är det viktigt att insamlingsinstruktionerna följs.

Insamlingsperioder

De perioder som anges nedan gäller för insamling av prover som ska användas i inventeringen. Prover ska skickas löpande till laboratoriet, samt snarast efter avslutad säsong. Endast prover insamlade inom inventeringsperioden används för inventeringsresultatet.

Prover kan även tas vid rovdjursangrepp eller andra händelser utanför dessa perioder. De skickas då in på samma sätt, men används främst för andra syften, till exempel skyddsjaktsärenden eller dokumentation.

Varg

Inventering av revir och föryngringar: 1 oktober – 31 mars

Inventering av vargindivider i renskötseområdet: 1 juli – 30 juni (året runt)

Förvaltningsprov: Samlas vid händelser där DNA-prov behövs inom förvaltningen, kan samlas hela året.

Järv

DNA-inventering baserad på fångst-återfångstmodellering: 1 oktober – 15 maj

Inventering av regelbunden och tillfällig förekomst i renskötseområdet: 1 juli – 30 juni (året runt)

Lodjur

Inventering av familjegrupper: 1 oktober – 28 (29) februari

Inventering av regelbunden och tillfällig förekomst i renskötseområdet: 1 juli – 30 juni (året runt).

Björn

Inventering av björn sker i olika län olika år. Inventeringen återkommer vart femte år enligt ett rullande schema.

Insamlingsperiod: 21 augusti – 31 oktober (avvikelser kan förekomma, dubbelkolla med ditt län).

Smittorisk vid hantering av rovdjursspillning

Vid hantering av spillning från vilda rovdjur finns risk för smitta från dvärgbandmask (*Echinococcus multilocularis* hos räv, *Echinococcus granulosus* hos hund). Dessa parasiter kan orsaka allvarlig sjukdom hos människa. Sök på *dvärgbandmask* på www.sva.se för senaste information och gällande rekommendationer i Sverige.

För att minimera risken för smittspridning:

- Rör inte spillning med händerna. Använd verktyg eller en pinne från skogen för att ta en bit spillning och placera den i provröret.
- Undvik att röra vid ansikte eller mun under insamling och provhantering.
- Rengör händerna med våtservett eller vanlig handtvätt innan du äter eller liknande.
- Rengör redskap och eventuella arbetsytor efter användning (se *avsnittet Förebygg kontaminering och smittspridning – rengör redskapen* nedan).
- Håll dig uppdaterad om aktuellt smittläge.

Undvik kontaminerade prov

Urin, spillning, hår, sekret, blod och saliv är känsliga DNA-källor som lätt kontamineras om de kommer i kontakt med DNA från andra individer av samma art eller närbesläktade arter. Till exempel kan prover från varg kontamineras med DNA från hund och räv, och prover från järv kan kontamineras av DNA från mård. Kontaminering kan ske i naturen av djuren själva, men också vid insamling och hantering på labbet.

Kontaminerade prov ger sällan användbara analysresultat. Tyvärr upptäcks problemet först efter att analysen är genomförd – och kostnaden redan uppstått. Undvik i möjligaste mån att samla prover som kan vara kontaminerade. I fält kan det vara svårt att avgöra, men när risken är tydlig bör man vara extra uppmärksam. Hos varg urinmarkerar till exempel både hane och tik på samma plats, försök i sådana fall att visuellt skilja urinfläckarna innan insamling. Undvik att samla löpblod som kan var sammanblandat med hanens urin.

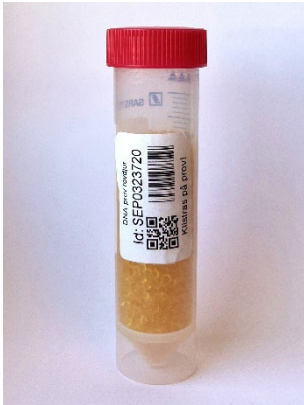
Förebygg kontaminering och smittspridning – rengör redskapen

Minska risken för DNA-kontaminering och smittspridning genom att:

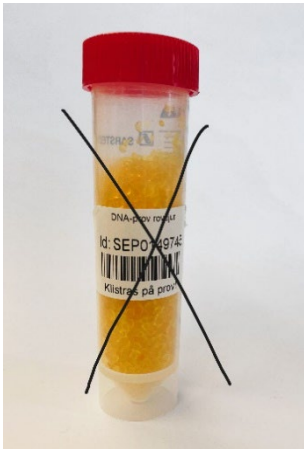
- Rengöra återanvändbara redskap efter *varje* provtagning. Metallredskap kan rengöras genom att torkas av mot snö eller växtlighet, och därefter brännas av med tändare i några sekunder. Alternativt kan engångsredskap, exempelvis en pinne från skogen, användas.
- Stänga provrör och kuvert direkt efter att provet lagts i.
- Hålla provtagningsutrustning och insamlade prover åtskilda från husdjur.

Märkning av prov

- Alla prov ska märkas med streckkodsetikett. Omärkta prov analyseras inte.
- Streckkoden (inklusive eventuell QR-kod) ska fästas i provrörets längdriktning.
- Prov insamlat i papperskuvert (hår och saliv) ska ha streckkodsetiketten fäst på kuvertets utsida.



Figur 1. Streckkodsetiketten är korrekt placerad i rörets längdriktning.



Figur 2. Streckkodsetiketten är felaktigt placerad och kan inte läsas av laboratoriets scanner.

Laboratoriet i Umeå hanterar både järv och lodjur. Även om art framgår i Rovbase så kan du underlätta laboratoriets initiala sortering genom att skriva "lodjur" på de provrör som gäller lodjur.

Insamling från varg, järv och lodjur

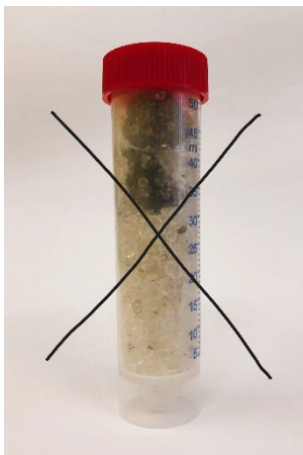
Information om hur du får tag i insamlingsmaterial hittar du nedan under rubriken *Etiketter och insamlingsmaterial*.

Spillning

Samla ca 1 cm³ (storlek som en ärt) spillning i ett 50 ml provrör fyllt med 35–40 ml silica. Ta inte mer spillning eftersom mängden silica då inte klarar att torka ut provet. Undvik att snö och is följer med i röret. Förvara provet torrt i rumstemperatur och i skydd från solljus.



Figur 3. Silicans uppgift är att konservera provet genom att torka ut det. Silican innehåller en färgindikator där orange färg visar att den är funktionell och redo ta upp fukt. Bilden visar lagom mängd insamlad spillning.



Figur 4. För mycket spillning! Om silican blivit ljusgul eller vitaktig har den mättats på fukt och förlorat sin torkande funktion. Bakterier kan då bryta ner och förstöra provets DNA.

Sekret (järv)

Sekret från järv ska samlas in i ett 50 ml provrör fyllt med 35–40 ml silica. Undvik att snö och is följer med i röret. Förvara provet torrt i rumstemperatur och i skydd från solljus.



Figur 5. Sekret från järv ska liksom spillning samlas i rör med silica.

Urin samt blodstänk och löpblod i snö

Samla urin i ett tomt 50 ml rör och tillsätt genast stabiliseringsvätska från en ampull. Samla ”gul snö” där urinen förefaller koncentrerad, lämplig mängd är ca 10 – 30 ml i smält tillstånd. Blodstänk och löpblod i snö samlas in på samma sätt, men volymen kan vara mindre.

Undvik att ren snö och is följer med i röret. Fast material som barr, jord etcetera får inte följa med då det täpper till ett filter som används vid DNA-extraktionen. Skruva på locket rakt och tillräckligt hårt för att undvika läckage.

Undvik att samla urinprov i varm, utsmält snö. Sådana prov har mycket låg analysframgång. Förvara provet torrt i rumstemperatur och i skydd från solljus.

Urine Preservative
Single Dose Cat. 18124

Specifications:
For inputs of 5 to 50 mL urine. Stabilizes DNA, RNA and proteins at room temperature for over 2 years.

Storage Conditions and Product Stability:
All tubes should be kept tightly sealed and stored at room temperature (15 – 25°C) for up to 2 years without any loss of performance.

Short Protocol (see reverse for illustration):

1. Collect 5 to 50 mL of midstream urine into a clean container of your choice. First flow urine is not recommended for collection.
2. Carefully cut the tip off the preservative ampoule and dispense into the urine sample. Tighten container.
3. Invert gently several times to mix preservative with urine sample.
4. If required, fill information on the provided ID Label and affix to the tube with collected sample.
5. Store or ship the urine at room temperature.
6. RNA, DNA and proteins can be purified from the preserved urine sample using a number of different methods, including Norgen's urine-based sample preparation kits.

NORGEN BIOTEK CORP.
info@norgenbiotech.com
1-866-667-4362 or 905-227-8848
www.norgenbiotech.com

Label Legend
[Barcode] Catalogue number
[ID] Lot number
[Arrow] Temperature limitation
Rev. 05/11

Figur 6. Stabiliseringsvätskan är orange och engångsförpackad i en liten ampull. Vätskan hindrar nedbrytning av DNA i urin och blodstänk. I kallt väder blir vätskan trögflytande, värm då ampullen en kort stund i handen.

Urin på snöfria substrat (endast varg)

Sköljning

Använd ren tång/pincett och ren sekator/sax för att hålla fast och klippa av material med urin på (kvistar, blad eller liknande), eller peta loss med en kniv (bark). Placera materialet i ett 50 ml rör och tillsätt genast 15–20 ml rent vatten och stabiliseringsvätska från en ampull (se figur 6). Om rör med vatten redan har förberetts, tillsätt endast urinmaterialet och stabiliseringsvätskan. Låt kvistar/blad/bark vara kvar i röret. Skruva på locket rakt och tillräckligt hårt för att undvika läckage. Förvara provet torrt i rumstemperatur och i skydd från solljus.

Topsning

Om substratet är för stort för att samlas in (stor sten, träd osv) kan man i stället använd en provtagningssticka med tops (se figur 7). Blöt topsen med vatten och topsa ordentligt på ytan där urin finns. Sätt tillbaka stickan i behållaren, förvara torrt och luftigt (ej i plastpåse) och i skydd från solljus. Prov skickas till laboratoriet i papperskuvert.

Blod som torkat på växtlighet

Samla den del av växten där det finns blod och lägg i ett papperskuvert. Förvara kuvertet torrt och luftigt (ej i plastpåse) och i skydd från solljus.

Hår

Samla hår (med hårrot) i papperskuvert. Det är dock inte alltid möjligt att med blotta ögat se om det finns hårrötter. Samla flera hårstrån från samma individ i kuvertet, analysen lyckas sällan för ett ensamt hårstrå. Förvara kuvertet torrt och luftigt (ej i plastpåse) och i skydd från solljus.

Saliv som tas på tamdjur

Använd en provtagningssticka med tops. Blöt topsen med vatten om pälsen är torr. Rulla runt topsen ordentlig på pälssidan kring de dödande betten. Det går bra att topsa både före och efter flåning och sedan bestämma vilka prover som ska skickas för analys. Om det finns tandhål, rulla topsen på pälsen i området kring dessa, inte i hålet. Sätt tillbaka stickan i behållaren, förvara torrt och luftigt (ej i plastpåse) och i skydd från solljus. Proven skickas i papperskuvert. Saliv är den provtyp som har sämst analysframgång. Max fyra prov per skadetillfälle analyseras.



Figur 7. Provtagningssticka med tops används vid provtagning av saliv på bytesdjur, vid provtagning i munhålan på döda rovdjur samt ibland vid insamling av vargurin från snöfria substrat. Behållaren har ett DNA-tätt luftfilter i botten så att provet kan torka.

Prov från munhålan på dött rovdjur

Gnugga med salivstickans tops mot insidan av kinden, långt bak i munhålan för att undvika kontaminering från annan individ om djuren slickat varandra. Sätt tillbaka stickan i behållaren, förvara torrt och luftigt (ej i plastpåse) och i skydd från solljus. Proven skickas i papperskuvert.

Ansvar och rutiner för insamlade prov

Under inventeringsperioden ska inventeringsprov skickas löpande till laboratoriet, samt snarast efter avslutad säsong. Sent anlända inventeringsprov analyseras inte.

Fältpersonal som samlar in prov från varg, järv och lodjur ansvarar för att:

- proverna skickas i tid till rätt laboratorium (olika laboratorier hanterar olika arter, se nedan)
- proverna finns registrerade i Rovbase när de anländer till laboratoriet
- proverna har tilldelats rätt analysprioritet (se nedan)

Sätt rätt analysprioritet

Att tilldela analysprioritet är obligatoriskt vid provregistreringen. Hur analysprioritet ska anges skiljer sig mellan arterna. Här är vad som gäller:

Varg

Akut: Prover från renskötselområdet samt prover från hela landet som har avgörande betydelse för beredning och beslut i skyddsjaksärenden. Ange orsak i kommentarsfältet. Svarstiden för akuta prov är upp till sex arbetsdagar från ankomst till laboratoriet. *Extra akuta* prov avser situationer då ren och varg finns i samma område samtidigt "pågående skada eller stor risk". När extra akuta prov är på ingång ska laboratoriet meddelas direkt via e-post/telefon. Svarstiden för extra akuta prov är inom tre arbetsdagar från ankomst till laboratoriet.

Hög: Prov som ska analyseras löpande under inventerings säsongen, samt förvaltningsprov. Svar kommer löpande under säsongen.

Vilande: Övriga prov från varg.

Järv

Hög: Prov som ingår i inventeringen. Om flera prov samlas från samma spårlopa efter samma järv ska endast *ett* av dessa ges analysprioritet Hög.

Vilande: Övriga prov från samma spårlopa efter samma järv. Ett vilande prov analyseras endast om den genetiska analysen av det föregående provet misslyckas och Länsstyrelsen därför i Rovbase höjer analysprioriteten till Hög.

Lodjur

Akut: Prov för särskiljning av familjegrupper. När akuta prov är på ingång ska laboratoriet meddelas direkt via e-post/telefon. I kommentarsfältet i Rovbase ska frågeställningen för det aktuella fallet beskrivas. Svarstiden för akuta prover är 15 arbetsdagar.

Vilande: Övriga prov från lodjur.

Insamling från björn

Spillning

Samla ca 1 cm³ (stor som en ärt) björns spillning i ett tomt 50 ml provrör. På hösten innehåller spillningen ofta bär, vilket bevarar DNA – ingen silica behövs. Undvik att samla för mycket för att förhindra jäsning. Förvara provet kallt och mörkt, gärna i frys om försändelse till laboratoriet inte kan ske direkt.

Björnprov samlas främst in via allmänheten. En följesedel ska fyllas i för varje prov och bifogas när det skickas till laboratoriet. Prov utan ifylld följesedel analyseras inte. När insamling ska ske i ett län delas insamlingskit ut, dessa innehåller provrör, följesedel samt förfrankerat kuvert.

Läs mer om björninventering på Naturhistoriska riksmuseet nrm.se – [övervakning av brunbjörn](#).



Figur 10. Lagom mängd spillning. Björns spillning samlas i rör utan torkmedel. Streckkoden är placerad korrekt i rörets längdriktning.

Laboratorier

Proverna skickas till olika laboratorier beroende på art.

Varg

Laboratorium: Grimsö genetiska laboratorium, Institutionen för ekologi, SLU

Kontaktpersoner:

Anna Danielsson – 0581–69 73 09

Carlos Cardoso – 0581-69 73 48

E-post: dnalabb.grimso@slu.se

Postadress (om inte förfrankerade kuvert används):

Vargprov

SLU Viltskadecenter

Grimsö 152

739 93 Riddarhyttan

Järv och lodjur

Laboratorium: Institutionen för vilt, fisk och miljö, SLU (Umeå)

Kontaktpersoner:

Helena Königsson – 090–786 81 91

Göran Spong – 090–786 86 85

E-post: DNA@slu.se

Postadress (om inte förfrankerade kuvert används):

Königsson/Spong MEG

Institutionen för vilt, fisk och miljö, SLU

901 83 UMEÅ

Björn

Laboratorium: Naturhistoriska riksmuseet

Kontaktperson:

Jessica Åsbrink – 08–5195 4062

E-post: jessica.asbrink@nrm.se

Postadress (om inte förfrankerade kuvert används):

Naturhistoriska riksmuseet

CGI

Svante Arrhenius väg 3

114 18 STOCKHOLM

Etiketter, insamlingsmaterial och frankerade kuvert

Varg, järv, lodjur (och fjällräv)

Streckkodsetiketter, provrör, silica, urinampuller samt förtryckta och frankerade kuvert kan beställas från SLU Viltskadecenter:

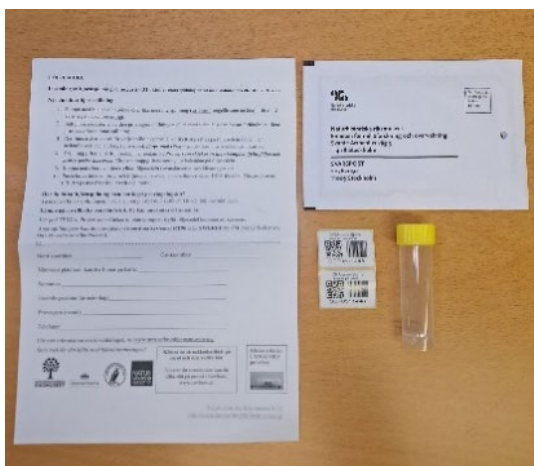
Henrike Hensel henrike.hensel@slu.se 0581-69 73 42

Linn Svensson linn.svensson@slu.se 0581-69 73 39

Länsstyrelsen distribuerar material vidare till samebyarnas inventeringsamordnare.

Björn

Inför björninventering skickar Naturhistoriska riksmuseet ut insamlingskit till berörda länsstyrelser och Svenska Jägareförbundet i de län som ska inventeras. Länsstyrelsen och Jägareförbundet ansvarar för distribuering vidare inom respektive län. Om insamlingskit saknas, vänd dig i första hand till någon av dessa regionala aktörer.



Figur 11. Ett insamlingskit för björn innehåller streckkodsetikett, provrör, följesedel samt förtryckt och frankerat svarskuvert.

Varför fungerar inte vissa prov?

Ibland går det inte att få fram tillförlitliga genetiska resultat från ett prov trots att det har samlats in på ett korrekt sätt. Det kan bero på att provet kommer från fel art, är kontaminerat med DNA från en annan individ eller en annan art, eller innehåller för lite DNA. DNA:t kan också vara nedbrutet, till exempel på grund av bakterier eller miljöpåverkan. I vissa fall innehåller provet ämnen som hämmar de kemiska processerna i laboratorieanalysen. Ofta går det inte utifrån analysen att avgöra varför ett prov inte fungerat.

Fälthund för DNA-prov från varg, järv och lodjur

Provtyp	Insamlingsmetod	Kommentar/mängd
Spillning	Samla i provrör med silica	Mängd motsvarande en ärt
Sekret (järv)	Samla i provrör med silica	
Urin, blodstänk, löpblod	Samla i tomt provrör och tillsätt stabiliseringsvätska från ampull	Viktigt att tillsätta vätska direkt
Urin på snöfria substrat (varg)	<i>Sköljning:</i> samla kvistar/blad med urin på i provrör, tillsätt 15–20 ml vatten och stabiliseringsvätska från ampull <i>Topsning:</i> Om substrat är stort, använd i stället provtagningssticka med tops	Vid sköljning: viktigt att tillsätta vätska direkt
Blod torkat på växtlighet	Samla del av växten med blod på i papperskuvert	-
Hår	Samla i papperskuvert	Helst flera strån från samma individ
Saliv på angripet tamdjur	Använd provtagningssticka med tops	-
Prov från munhålan på dött rovdjur	Använd provtagningssticka med tops	-

SLU Viltskadecenter (VSC) är ett nationellt centrum för kunskap om vilt, viltskador och samhälle. Vi tar fram kunskapsunderlag i syfte att begränsa viltskador och viltrelaterade konflikter för att främja samexistens mellan vilt och människor. Vi samverkar med flera myndigheter och organisationer.

Vi arbetar på uppdrag av Naturvårdsverket sedan 1996 och tillhör institutionen för ekologi vid SLU, Sveriges lantbruksuniversitet.

www.slu.se/viltskadecenter



VILTSKADECENTER