

# Urin-DNA från varg – utvärdering av användbarhet och analysframgång

Eva Hedmark, Linn Svensson, Anna Danielsson och Mikael Åkesson

*Grimso forskningsstation, Ekologiska institutionen, SLU*

## Bakgrund

I Sverige ansvarar Länsstyrelserna för inventeringen av varg, vilken i sin tur kvalitetsäkras, utreds och sammanställs av Viltskadecenter. Ett viktigt verktyg i inventeringen är genetisk analys av DNA som samlas in i samband med att vargar spåras. Inventeringen av varg i Skandinavien består av flera delar, däribland särskiljandet av olika revir, dokumentering av revirmedlemmarnas sociala status under vintern och genetisk identifiering av revirmarkerande djur för att säkerställa släktträdet över populationen. I dagsläget används huvudsakligen DNA från spillning vid genetiska analyser. Vid spårning på snö observerar dock länsstyrelsens fältpersonal urin i form av revirmarkeringar oftare än spillning, något som observerats även i andra länder (Zub m.fl. 2003, Hausknecht m.fl. 2007). Utnyttjandet av DNA från urin skulle därmed kunna innebära en lägre spårningsinsats i fält, inte minst i de fall då sökandet efter genetiskt material är den primära uppgiften. Dessutom förväntas olika provtyper vara lämpade till att besvara olika frågor. Urin från revirmarkeringar förväntas t.ex. vara mer lämpade för att identifiera och särskilja revirhävdande djur, medan spillning och urin från icke revirmarkerande djur (hukande uriner) förväntas vara bättre lämpade för att bekräfta föringring, d.v.s. förekomst av valpar. Anpassningen av provtyp till olika frågeställningar skulle kunna bidra till en effektivare prioritering av prover som ska samlas in och analyseras och därmed ge utrymme för mer ingående analyser, som att t.ex. få fram bättre uppskattningar av de olika revirs utbredning.

Anledningen till att urinprov hittills knappt använts för DNA-analys är att analysframgången varit låg samt att det funnits indikationer på att insamlade urinprov ofta innehåller DNA från fler än en individ. Någon kvantitativ utvärdering av urin-DNA och dess användbarhet för genetisk analys har dock inte gjorts. Under de senaste åren har tekniken blivit allt bättre på att bevara och fånga upp DNA för analytiska ändamål och det finns exempel på användning av urin för DNA-analys av varg i t ex Polen (Hausknecht m.fl. 2007). Urin innehåller normalt låga koncentrationer av epitelceller, upp till 400 celler/ml hos en frisk människa (Graff 1983), och åtminstone bland människor finns en skillnad mellan könen med färre celler i urin från män jämfört med från kvinnor (Prescott 1966, Milde m.fl. 1999, Zhang m.fl. 2012). DNA i urin är instabilt och bryts snabbt ner under tider av lagring. I litteraturen finns endast få rapporter om hur urinprov (från människa) lagras på bästa sätt för senare DNA-analys (bl.a. Cannas m.fl. 2009, Zhang m.fl. 2012). Förvaring i låg temperatur, i EDTA, eller med tillsats av proteinas K har i vissa studier visat sig bromsa sönderfallet av DNA i urin (bl.a. Milde m.fl. 1999, Beermann m.fl. 2011). Effektiviteten av dessa åtgärder varierar dock mellan olika studier, studieområden och populationer (Cannas m.fl. 2009).

Prov med låg DNA-koncentration löper allmänt en högre risk att förorenas med DNA från andra individer eller av PCR produkter i laboratoriet. DNA-prov innehållande DNA från mer än en individ brukar kallas för kontaminerade och dessa prover är oftast inte användbara för t ex individ- och föräldraskapsbestämning. Kontamination kan uppstå i fält när ytterligare en eller flera individer av varg, hund eller räv kommer i kontakt med en vargspillning eller urin innan den samlas in för analys. Kontamination kan också uppstå vid insamling och hantering av prov, eller under laboratorieanalysen. Eftersom urin har ett mycket lågt DNA-innehåll och vargar dessutom gärna följs åt och ofta revirmarkerar på samma plats förväntas problemet med kontaminerade urinprov vara större än för spillningsprov.

Här utvärderar vi med vilken framgång vi med DNA från urin, insamlat i snö under vintern 2013/2014, lyckas ta fram genetiska profiler för att bestämma art, individ, kön och föräldraskap. Vi jämför tre olika insamlings- och lagringsmetoder av urin. Vi utvärderar dessutom hur frekvent DNA från flera individer påträffas i ett DNA-prov, vilket kraftigt försvårar möjligheten att bestämma individ och kön. För jämförelse använder vi analysframgången från spillningar insamlade på snö under samma vinter.

Studien gjordes inom ramen för en överenskommelse mellan Naturvårdsverket och Grimsö forskningsstation (NV:s ärendenummer NV-04027-14).

## **Metoder**

### *Insamling och lagring*

Inför inventerings säsongen 2013/2014 samlade 23 personer bland länsstyrelsens fältpersonal in urin vid spårning av varg. Dessa urinprov fick ingå bland övriga inventeringsprov inom våra ordinarie DNA-analyser vintern 2013/2014. Resultaten användes dels i inventeringsarbetet och dels för att undersöka och utvärdera om och hur urin kan användas för genetisk analys av varg. Vargar som ingår i ett revirhävande par revirmarkerar genom att urinera på samma plats. För att i möjligaste mån undvika urinprov med DNA från båda individerna instruerades fältpersonalen att: "om två vargar har kissat på samma plats och två olika fläckar observeras tas urin från respektive fläck, på den fläck där urinet ser mest koncentrerat ut. Vid tillfällen med två löpor fram och endast en fläck tas urin från det mest koncentrerade området".

Tre olika insamlings-/lagringsmetoder för urin jämfördes:

- 1) Fryst: urin samlades in genom att snö med urin (så koncentrerat som möjligt) placerades i ett rör och sedan förvarades fryst fram till DNA-extraktion.
- 2) BIOTEK-rör: 2-10ml snö med urin samlades in i förbehandlade provrör (Urine Collection and Preservation Tubes, Norgen Biotek Corp.) ursprungligen avsedda för lagring av urinprov i sjukhusmiljö.
- 3) FTA-kort: en liten mängd snö med urin fick smälta på ett så kallat FTA®-kort (GE Healthcare). FTA-kortet är ett kemiskt behandlat papper som lyserar celler, denaturerar proteiner samt fångar och stabiliserar DNA. På ett FTA-kort kan DNA, enligt instruktioner från tillverkaren, bevaras i rumstemperatur under flera år.

För samtliga tre metoder varierade tiden från insamling till det att analysen påbörjades från någon dag till drygt tre månader. Huruvida den varierande lagringstiden påverkade provets analyskvalitet kontrollerades genom att undersöka effekten av lagringstid på möjligheten att bestämma vargens identitet.

Under inventeringssäsongen 2013/2014 samlades 95 urinprov in för utvärdering av analysframgång. Urinproven var fördelade på 46 frysta, 32 i BIOTEK-rör och 17 på FTA-kort (Tabell 1). Analysframgången för respektive insamlings-/lagringsmetod jämfördes i förhållande till analysframgången för 194 spillningsprov som samlats in för inventeringsarbetet under samma tidsperiod. Alla spillningsprov var insamlade på snö och lagrade i silica. Beroende på provens insamlings-/lagringsmetod isolerades DNA på olika sätt. DNA från frysta urinprov och prov i BIOTEK-rör isolerades med NORGENE Urine DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp.). DNA på FTA-kort isolerades i enlighet med tillverkarens instruktioner. DNA från spillning isolerades med Isolate Fecal DNA Kit (BIOLINE) i enlighet med medföljande instruktioner.

### *Screening och genotypning*

Vid analys av DNA-prov från varg använde vi 30 mikrosatellitmarkörer för identifiering av art, population, individ och föräldraskap. De insamlade proverna är dock ofta av varierande analyskvalitet och därför användes en inledande s.k. screening för att i ett tidigt skede kunna utesluta prov som sannolikt inte kommer att ge användbara analysresultat. Screeningen består av att en mikrosatellitmarkör (markör 2096) amplifieras i fyra PCR-replikat från respektive prov och visualiseras på agarosgel. Valet av screening-markör baseras på att använda en av de bäst fungerande markörerna som vid test på råv-DNA inte visade någon PCR-produkt. På detta sätt kan vi screena bort prov med dålig DNA-kvalitet samt prov med DNA uteslutande från råv. De urin- och spillningsprov som vid screeningen gav tydlig PCR-produkt i två eller fler replikat fick gå vidare till mikrosatellitanalys medan övriga uteslöts från vidare analys.

Även vid analysen av de 30 mikrosatellitmarkörerna utfördes fyra PCR-replikat för varje prov och markör, för detaljer kring markörer, analysprocedur och kriterier se Åkesson (2014). Baserat på de fyra replikaten och enligt bestämda kriterier konstruerades en genetisk profil som användes till identifiering av individ, ursprung och föräldraskap. Antalet fungerande markörer, dvs. de markörer där provet kunnat tillskrivas en genetisk profil, ger en god indikation av provets användbarhet. För att med säkerhet kunna identifiera en vargindivid krävs generellt analysresultat från åtminstone 8-10 mikrosatelliter, medan det för att avgöra födelseviret krävs fler markörer, vanligen 17 eller fler.

### *Könsbestämning*

Könsbestämning utfördes dels med en mikrosatellit bunden till Y-kromosomen (Sundqvist m.fl. 2001) och dels med en könsbestämningsmetod modifierad från Seddon (2005) som involverar både en X- och en Y-markör. Även könsmarkörerna amplifierades i fyra replikat och utvärderades enligt bestämda kriterier. För urinprov där identitet kunde bestämmas och aktuell individ sedan tidigare fanns representerad i vår prov- och individdatabas gjordes en jämförelse med avseende på kön. Detta gjordes genom att jämföra urinprovets könsbestämning med tidigare könsbestämning av samma individ. Jämförelsen gjordes endast för de individer vars kön bestämts morfologiskt eller utifrån minst två tidigare analyserade prov (ej urinprov). Därtill krävdes att 80 % av samtliga prov från aktuell individ, inklusive aktuellt urinprov, visat entydiga resultat med avseende på kön. Således

betraktades alltså könet som känt även för en individ där t ex 4 prov gett hona och 1 prov gett hane. Kontaminerande DNA från hane, med påföljande inkorrekt tolkning av honor som hanar, förekommer i ca 5 % av tidigare analyserade spillningar från identifierade vargar och detta var orsaken till att viss tvetydighet godtogs.

## **Resultat**

### *Screening och genotypning*

Vid screeningen amplifierade samtliga spillningsprov så pass väl att de gick vidare till genotypning. Urin fryst och Urin i BIOTEK-rör var jämbördiga med 93 respektive 91 procent som gick vidare efter screening. Urin på FTA-kort var klart sämre med 53 procent som gick vidare (Tabell 1).

Tröskelvärden och valet av markör för screening är utvecklad för att sålla bort prov som inte ger användbara resultat vid påföljande mikrosatellitanalys samtidigt som fungerande prov sållas bort i så liten utsträckning som möjligt (Åkesson 2014). En mindre andel prov som passerat screeningen förväntas därför inte ge användbara resultat i den fortsatta analysen. Ett enkelt mått på provets användbarhet för inventeringsändamål är antalet markörer som fungerat vid mikrosatellitanalysen. Spillningsproven fungerade bäst också i detta avseende med 86 % av studiens totalt 194 prov fungerade för 17 eller fler markörer. Bland urinproven fungerade de i BIOTEK-rör bäst med 81 % fungerade på 17 eller fler markörer, vilket motsvarar ungefär vad som krävs för att kunna bestämma både individ och föräldraskap (Figur 1). Urin fryst och Urin på FTA-kort var betydligt sämre med färre än 50 % av proven fungerande på 17 eller fler markörer.

Utifrån erhållna mikrosatellitgenotyper utfördes art-, individ- och föräldraskapsbestämning. Spillningsproverna fungerade genomgående bäst med 90 % individbestämda och 88 % föräldraskapsbestämda av studiens totalt 194 spillningsprov. Bland de tre insamlings-/lagringsmetoderna för urinprov var andelen individbestämda prov i förhållande till det totala antal som ingick i studien klart högst för BIOTEK-rör med 78 % jämfört med 48 % för fryst urin och 41 % för FTA-kort (Tabell 1, Figur 2). Liknande mönster observerades vid föräldraskapsbestämningen där BIOTEK-rören generade resultat i 72 % av fallen och de övriga två lagringsmetoderna visade avsevärt lägre framgång med under hälften av studiens totala antal prov föräldraskapsbestämda (Tabell 1, Figur 2).

Givet studiens provstorlek för respektive insamlings-/lagringsmetod för urin kunde vi inte se någon statistiskt säkerställd effekt av lagringstid på möjligheten att lyckas med identitetsbestämning. Det kan dock noteras att inget fryst urinprov äldre än 60 dagar kunde ID-bestämmas, vilket kan indikera att åtminstone frysta prov inte bör lagras mer än 60 dagar innan analys.

### *Kontamination*

Förekomst av DNA från mer än en individ i ett prov, dvs. kontamination, upptäcks genom att fler än två alleler påvisas för en och samma mikrosatellitmarkör. I den här sammanställningen har prov som uppvisat fler än två alleler för minst två mikrosatellitmarkörer bedömts som kontaminerade. Bland

de spillningsprov som gick vidare efter screening (n = 194) påvisades endast ett (<1 %) kontaminerat prov. Bland urinproven var andelen kontaminerade prov högre (Tabell 2), med 8 av 81 (10 %) kontaminerade prov. Även om andelen kontaminerade prov var något högre för Fryst urin och FTA-kort än för BIOTEK-rören (Tabell 2), så var provstorlekarna för små att säga säkert att kontaminationsgraden påverkades av olika lagringsmetoder.

### *Könsbestämning*

Antal och andel prov där könsbestämning kunde utföras enligt bestämda kriterier ges i Tabell 3. Provtyperna Urin fryst, urin i BIOTEK-rör och spillning kunde alla könsbestämmas i över 70 % av fallen. Urin på FTA-kort hade en betydligt lägre analysframgång med under 25 % könsbestämda prov.

Bland totalt 34 urinprov från kända hanar gav 33 prov analysresultat som överensstämde med känd könstillhörighet, medan ett prov inte kunde könsbestämmas alls. Antalet urinprov från kända tikar var totalt åtta. Bland dessa gav fem prov analysresultat överensstämmande med känd könstillhörighet, ett prov gav motstridiga resultat (d.v.s. bestämdes till hane), och två prov gav inget resultat alls (Tabell 4). Bland spillningsproven överensstämde samtliga positiva könsbestämningar för tik (n=27) och hane (n=47) med känd könstillhörighet. Se Tabell 4 för detaljer kring respektive provtyp och insamlings-/lagringsmetod.

### **Diskussion**

De tester vi utförde på urinprov under vintern 2013/2014 visar att vargurin som samlas in på snö kan vara en användbar källa till DNA. Med bästa lagringsmetoden av urin gick det att bestämma individ för 78 % av proven och föräldraskap för 72 %. Analysframgången för urin var något sämre än den för spillningar insamlade på snö, för vilka 90 % gick att individbestämma och 88 % att föräldraskapsbestämma. Skillnaden i framgång berodde främst på att urinproven mer frekvent visade på förekomst av DNA från flera individer (kontamination, Tabell 2) samt att urin fungerade på något färre mikrosatelliter (Figur 1).

Det fanns en stor variation i analysframgång mellan de olika metoderna för insamling och lagring av urin, där urin insamlat i BIOTEK-rör visade klart högre analysframgång med avseende på antalet fungerande mikrosatellitmarkörer (Figur 1), andel prov bestämda till art, individ och föräldraskap (Figur 2) samt kontamination av DNA från andra vargindivider (Tabell 2). Kostnadsmässigt utgör BIOTEK-rör det dyraste alternativet, men en extraktionskostnad på ca 265 kr, jämför med 165 kr för fryst urin och 73 kr för FTA-kort. Likväl, om hänsyn tas till andelen extraherade prov som leder till lyckad individbestämning, blir BIOTEK-rör det billigaste alternativet, med en total analyskostnad på ca 1790 kr/lyckat prov (; räknat med en lönekostnad på 350 kr/timme), jämfört med 2900 kr/lyckat prov från fryst urin och 1880 kr/lyckat prov från FTA-kort. I denna studie har vi inte tagit hänsyn till kostnader för spårningsinsatsen vid insamling av DNA. Vi förväntar oss dock en högre spårningsinsats med de två billigare metoderna eftersom fryst urin och FTA-kort leder till mycket lägre andel (60 % respektive 50 %) individbestämda vargar än BIOTEK-rör.

Studien visar att urinprov är, som förväntat, klart mer utsatta för kontamination än vad spillningsprov är, men andelen kontaminerade prov var likväl färre än förväntat givet att de flesta prov samlats in i löpor med fler än en varg. Vid mikrosatellitanalys uppvisade 10 % av urinproven DNA från mer än en individ, att jämföra med mindre än 1 % av spillningsproven.

Kontaminerade prov är oftast oanvändbara men orsakar sällan felaktiga identifieringar eftersom problemet i princip alltid upptäcks under mikrosatellitanalysen. Problemet är snarare av kostnadsmässig karaktär eftersom provets oduglighet inte uppdagas förrän sent under analysprocessen då det redan medfört samma kostnad som ett användbart prov. För närvarande har vi ingen lösning på detta problem, eftersom det troligen beror på att revirmarkerande par ofta urinerar på samma plats. Under vintern 2014/2015 ska just detta problem undersökas vidare, avseende var i en urinfläck prov ska samlas för att ge bästa möjliga resultat med avseende på individbestämning, att möjligen få båda de revirmarkerande djuren samt att minska eller utesluta kontamination.

När det gäller könsbestämning kan dock kontaminerade prov leda till fel genom att honor kan misstolkas som hanar. Men eftersom ett av målen i nuvarande inventering är att genetiskt identifiera individerna i alla par borde felet upptäckas om det i ett par endast identifieras två revirmarkerande hanar. I den här studien var dock antalet urinprov från kända tikar endast åtta stycken och därmed för få för att ge en bra bild av hur kontamination påverkar könsbestämningen av urin från honor.

Tidsåtgången för att analysera urin- och spillningsprov är ungefär densamma. I dagsläget är dock materialkostnaden för att analysera ett urinprov i BIOTEK-rör ungefär 150 kr högre jämfört med för spillning. Den extra materialkostnaden för urinprov utgör knappt 10 procent av den totala kostnaden för att analysera ett prov.

Även om urin visade sig vara något dyrare och gav något sämre utdelning än spillning för DNA-analys, är det viktigt att notera att det fortfarande finns utrymme för förbättringar av metoden. För det första går det att se över insamlingen för att undvika provtagning av DNA från flera individer i samma rör. Instruktionerna för insamlingen behöver därför bli så tydlig som möjligt. Det är även viktigt att noggrann dokumentation kring insamlingen förs av fältpersonal för att testa ifall vissa prov är särskilt problematiska. För att minska kostnaden för lagringen av urin, kommer vi under kommande vinter testa andra alternativ till BIOTEK-rör, däribland rör preparerade med EDTA (Zhang m.fl. 2012). Ytterligare en utvecklingsmöjlighet med urin är att se över provhanteringen efter isolering, däribland provkoncentration och PCR-förhållanden. Under denna studie har vi efter DNA extraktion inte avvikit nämnvärt från det protokoll som används för spillnings-DNA.

Sammantaget gör vi bedömningen att urinprov är en bra DNA-källa med potential att effektivisera inventeringen av varg. Minskad spårningsinsats för att hitta prov och möjligheten att rikta insamling och analys mot specifika kategorier av djur är tydliga fördelar som kan komma att väga upp urinalysens främsta nackdelar bestående av kontaminerade prov och lägre analysframgång.

## Tabeller och figurer

Tabell 1. Antal och andel av respektive provtyp/lagringsmetod som gett ett positivt resultat vid screening och därefter identifierats med avseende på art, individ och föräldraskap. Andelar anges inom parentes och baseras på det totala antalet prov (N) för respektive provtyp.

	N	Positiv screening	Art	Individ	Föräldraskap
Urin fryst	46	43 (0,93)	34 (0,74)	22 (0,48)	17 (0,37)
Urin på FTA-kort	17	9 (0,53)	8 (0,47)	7 (0,41)	6 (0,35)
Urin i BIOTEK-rör	32	29 (0,91)	29 (0,91)	25 (0,78)	23 (0,72)
Spillning i silica	194	194 (1,00)	188 (0,97)	175 (0,90)	170 (0,88)

Tabell 2. Antal prov där kontamination påvisats vid mikrosatellitanalys. Inom parentes anges andel kontaminerade bland de som gått vidare efter screening.

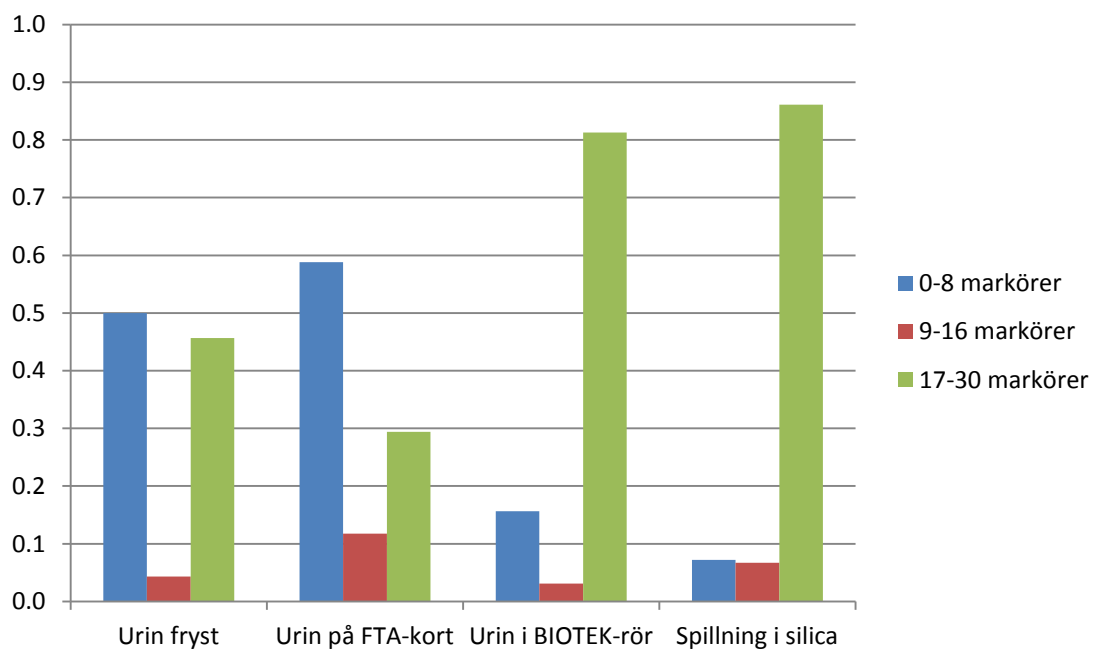
	N	Kontamination påvisad
Urin fryst	43	5 (0,12)
Urin på FTA-kort	9	1 (0,11)
Urin i BIOTEK-rör	29	2 (0,07)
Spillning i silica	194	1 (0,01)

Tabell 3. Antal (och andel) prov där könstillhörighet bestämts.

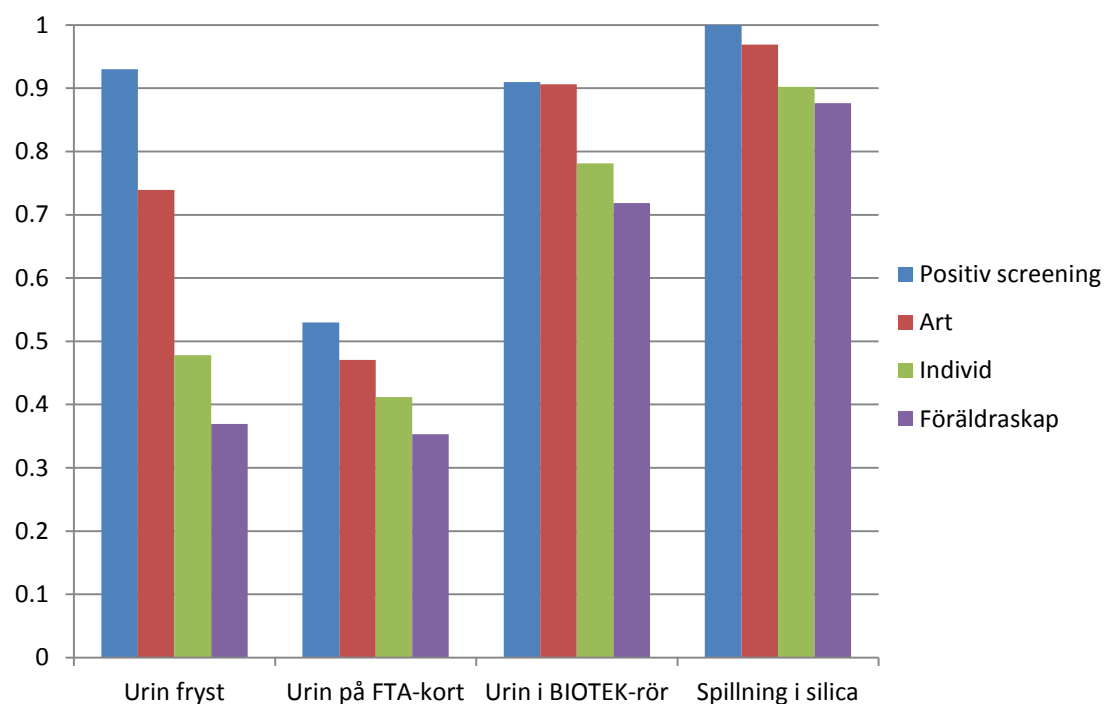
	N	Kön bestämt
Urin fryst	46	38 (0,83)
Urin på FTA-kort	17	4 (0,24)
Urin i BIOTEK-rör	32	23 (0,72)
Spillning i silica	194	137 (0,71)

Tabell 4. Utfall av könsanalysen för prov där individ kunde fastställas och dess könstillhörighet var känd sedan tidigare. För tik respektive hane anges antal analyserade prov för vilka kön kunnat bestämmas och inte, samt antal prov där bestämt kön avvek från känd könstillhörighet.

	N	Tik			Hane		
		Korrekt bestämd	Obestämd	Felbestämd	Korrekt bestämd	Obestämd	Felbestämd
Urin fryst	18	0	0	0	18	0	0
Urin på FTA-kort	4	0	1	0	2	1	0
Urin i BIOTEK-rör	20	5	1	1	13	0	0
Spillning i silica	87	27	10	0	47	3	0



Figur 1. Andel prov av respektive provtyp där en konsensusgenotyp kunde konstrueras för 0-8, 9-16 respektive 17-30 analyserade mikrosatellitmarkörer.



Figur 2. Andelar av respektive provtyp/lagringsmetod som gett ett positivt resultat vid screening och som därefter identifierats med avseende på art, individ och föräldraskap.



## Referenser

- Beermann, A., Ghanjati, F., Hermanns, T., Poyet, C., Pereira, J., Fischer, J., Wernet, P. och Santourlidis, S. 2011. Methods for Separate Isolation of Cell-Free DNA and Cellular DNA from Urine-Application of Methylation-Specific PCR on both DNA Fractions. *Open Biomarkers Journal*, 4:15-
- Cannas, A., Kalunga, G., Green, C., Calvo, L., Katemangwe, P., Reither, K., och Huggett, J. F. 2009. Implications of storing urinary DNA from different populations for molecular analyses. *PloS ONE*, 4(9): e6985.
- Graff, L. 1983. A handbook of routine urine analysis (pp. 2-19). Philadelphia, PA: Lippincott.
- Hausknecht, R., Gula, R., Pirga, B. och Kuehn, R. 2007. Urine — a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. *Molecular Ecology Notes*, 7: 208–212.
- Milde, A., Haas-Rochholz, H., Kaatsch, H. 1999. Improved DNA typing of human urine by adding EDTA. *Int J Legal Med*, 112:209-10
- Prescott, L.F. (1966) The normal urinary excretion rates of renal tubular cells, leucocytes and red blood cells. *Clin Sci Colch* 31 :425–435.
- Seddon, J. M. 2005. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conservation Genetics* V6:147-149.
- Sundqvist A.-K. , Ellegren H., Olivier M. och Vilà C. 2001. Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 10: 1959–1966
- Zub K., Theuerkauf J., Jedrzejewski W., Jedrzejewska B., Schmidt K., m.fl. 2003. Wolf pack territory marking in the Bialowieza Primeval Forest (Poland). *Behaviour*, 140: 635–648.
- Zhang, S.H., Zhao, S.M., Zhao, Z.M. and Li, C.T. 2012. Genotyping of urinary samples stored with EDTA for forensic applications. *Genetics and Molecular Research* 11 (3): 3007-3012.
- Åkesson, M. 2014. Teknisk rapport över genetiska analyser på varg i Sverige år 2013.