

GENETISCHE DETECTIE VAN EEN BIJTINCIDENT
VAN WOLF OF HOND, 13 APRIL 2025

■■■■■■■■■■ en ■■■■■■■■■■

Verslag opgemaakt voor ■■■■■■■■■■, Provincie Gelderland op 25/04/2025.

1 SITUATIESCHETS EN VRAAGSTELLING

Op 13 april 2025 vond in park De Hoge Veluwe een bijtincident plaats waarbij een mogelijke wolf een jogger beet in het linkerbeen. Provincie Gelderland, in naam van [REDACTED], verzocht INBO tot een identificatie van de dader.

We ontvingen op 22 april 2025 een pakket met een DNA-staal en een broek, dat in ontvangst werd genomen in de vestiging van INBO te Gaverstraat 35, 9500 Geraardsbergen. Het pakket werd bij ontvangst bij -20°C bewaard in de ontvangstruimte voor contaminatie-gevoelige stalen.

Op 23 april 2025 werd het pakket geopend, en werd de inhoud geïnventariseerd en fotografisch gearhiveerd. De beelden bevinden zich in bijlage 1.

De inhoud betrof 1 zakje met een droge swab in een tube, en een stretchbroek (joggingbroek). Bij nadere inspectie waren er twee puncties zichtbaar in het bovenbeen. De stof rond deze puncties werd uitgesneden en werd onderworpen aan een DNA-extractie. DNA-extractie gebeurde volgens SAP-006I, met die modificatie dat de matrix bestond uit de opgestuurde swab en de stukjes stof uit de broek.

De stalen (een swab en stof die twee bijtaten omringt) werden gelogd in I-25G024-04.

Staalcode	LIMS-code	Opmerkingen
W2025S157	25-004452	swab_bijtincident_[REDACTED] [REDACTED]3042025_Nederland
W2025S158	25-004453	broek gaatje 1 bijtincident_[REDACTED] [REDACTED]13042025_Nederland
W2025S159	25-004454	broek gaatje 2 bijtincident_[REDACTED] [REDACTED]13042025_Nederland

Tabel 1. Overzicht van de stalen.

Identificatie van de soort (wolf of hond) volgt een procedure in twee stappen die in detail uitgelegd staat in Mergeay & Van Breusegem (2021) : in eerste instantie bepalen we de copy number variation (CNV) van het Amylase-gen (Amy2B). Bij wolven zijn er twee kopieën aanwezig, bij honden zijn er doorgaans 4 tot 20 kopieën aanwezig. Uitzonderlijk hebben primitieve hondenrassen ook slechts 2 kopieën van het gen.

In tweede instantie bepalen we de DNA-sequentie op een kort maar hypervariabel stukje mitochondriaal DNA, de controle-regio van de D-Loop. Wolven uit de Centraal-Europese populatie hebben doorgaans ofwel de variant WH01 die enkel bij wolven voorkomt, ofwel WH02 die slechts zelden bij honden voorkomt. De detectie van WH01 of WH02 in combinatie met een CNV <3 is nog niet vastgesteld bij honden en kan met hoge zekerheid aan wolf worden toegewezen.

2 RESULTATEN

2.1 COPY NUMBER VARIATION VAN AMY2B

Elk staal werd tweemaal geanalyseerd. Staal W2025S157 gaf geen amplificatie. Staal W2025S158 gaf voor replicatie 1 122/131 droplets van AMY2B ten opzichte van het controle-gen, en 105/134 droplets voor replica 2. Dit geeft een CNV=1.86 en 1.57 respectievelijk. Staal W2025S159 gaf voor de twee replica's waarden van 22/25 en 25/20 droplets, voor een CNV=1.80 en 2.50, respectievelijk.

De twee negatieve controles gaven geen resultaat, de twee positieve controles gaven 447/448 (CNV=2.00) en 357/370 (CNV=1.93).

2.2 DNA SEQUENTIE VAN DE CONTROLE-REGIO EN HAPLOTYPE

Staal W2025S157 gaf geen amplificatie op de forward sequentie, en op de reverse sequentie een match met WH01.

Staal W2025S158 en staal W2025S159 gaven zowel op de forward en de reverse sequentie een match met WH01.

De FW DNA sequentie van één van de stalen is

```
5'_TTTGCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTA ACTCAATCTCAT  
AATTCACTGATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCT  
CGAGAAACCATCAACCC_3'
```

3 BESLUIT

We bevestigen dat het DNA gevonden op het bijtincident afkomstig is van een wolf, met een haplotype (WH01) dat typisch is voor wolven uit de Centraal-Europese populatie.

Genotypering van het individu zal plaatsvinden op dinsdag 29 april.

4 ACHTERGROND

4.1 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. Voor de analyses van de hier onderzochte honden gebruikten we enkel methode c.

- 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 of honden 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.

4.2 PROCEDURE

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

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

Bijlage 1 geeft het overzicht van het fotografische beeldmateriaal van de ontvangen stalen weer, met aanduiding van de puncties in de kledij.

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

Bijlage 2: Bijlages_SOPSSAPS.ZIP

Bijlage 3: Bijlages_SAP355C.ZIP