

Exokrin pancreasinsufficiens hos schäfer

Åsa Lundberg

**Handledare: Henrik Von Euler
Inst. för kliniska vetenskaper, smådjur**

SAMMANFATTNING

Exokrin pancreasinsufficiens är en ärftlig sjukdom som i Sverige drabbar framför allt schäfer och till vilken det i nuläget inte finns något kopplat avelsprogram.

Syftet med denna studie var att göra en genomgång av publicerad litteratur om sjukdomen och att göra en inventering av sjukdomsläget i Sverige idag, framför allt med inriktning på schäferhundar. Inventeringen jämfördes sedan med en opublicerad sammanställning som gjordes vid Klinisk kemiska laboratoriet, Sveriges Lantbruksuniversitet 1997.

Under perioden 2002-06-01 till 2007-09-26 (avrundat till 64 månader) testades 2961 blodprover för TLI. 274 blodprover var positiva, det vill säga TLI $<2,5$ $\mu\text{mol/l}$. Hundar från 31 raser samt blandrashundar och hundar av okänd ras har testats positiva. Av dessa var schäfer, borzoi, border collie, cairnterrier, eurasier, långhårig collie samt blandraser överrepresenterade inom urvalsgruppen ($p < 0,05$).

De schäfrar som testats positiva studerades närmare. Genomsnittlig ålder vid provtagning var 52,8 mån $\pm 30,6$ månader, medianen var 48 mån (4-140 månader). Hundar av honkön (tikar samt honkastrater) var statistiskt överrepresenterade ($p < 0,05$).

Vid jämförelse med den sammanställda perioden 1996-1997 kunde det ses att antalet testade hundar har ökat kraftigt. Andelen testade schäfrar och andelen schäfrar av positivt testade hundar har sjunkit, men av testade schäfrar är andelen positiva konstant eller något ökad.

En identifiering av den genetiska orsaken till sjukdomen och ett gentest för att identifiera anlagsbärande hundar vore värdefullt för den svenska schäferaveln eftersom den aktuella aveln inte verkar ha fått antalet drabbade hundar att minska.

SUMMARY

Exocrine pancreatic insufficiency is a hereditary disease that in Sweden is especially common in German shepherds. The Swedish German shepherd club has currently no plan of action for decreasing disease prevalence in the breed.

The purpose of this study was to scrutinize existing literature about the disease and also perform an inventory of the disease in the Swedish dog population. Special focus was laid on the German shepherd breed. The inventory was later compared to an unpublished inventory of the disease with data from the Swedish University of Agricultural Sciences from 1997.

During the period 2002-06-01 to 2007-09-26 (ca 64 months) 2961 blood samples were analyzed for cTLI. 274 samples were positive (cTLI <2.5 $\mu\text{mol/l}$). 32 breeds including dogs of mixed breed were represented among the positive dogs. German shepherd, border collie, borzoi, cairn terrier, eurasian dogs, rough-coated collie and mixed breeds were statistically over represented ($p < 0.05$) in the sampled population.

The average age among the positive German shepherds at the time of blood sampling was 52.8 months \pm 30.6 months; the median age was 48 months (4-140 months). Bitches were statistically over represented ($p < 0.05$).

A comparison of the previous inventory with the current revealed that the number of blood samples tested for cTLI has increased greatly. The number of German shepherds tested compared to the whole population has decreased, as has the number of positive German shepherds compared to the whole positive population. The ratio of positive German shepherds and tested German shepherd has remained about the same.

An identification of the genetic basis of the disease and a genetic test to identify disease carriers would be valuable for the German shepherd breed in Sweden, as the current breeding does not seem to decrease the prevalence in the dog population.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	1
Inledning	4
Syfte	4
Bakgrund	4
Bukspottskörtelns funktion	4
Beskrivning av sjukdomen	5
Diagnos	5
Ärftlighet	6
Patofysiologi	6
Behandling	7
Tidigare genetiska studier av EPI	9
Material och metoder	10
Inventering av sjukdomsläget idag i Sverige	10
Inventering av avelsarbetet inom Schäferklubben i dag gällande EPI	11
Insamling av blodprover för genetisk analys	11
Resultat	12
Inventering av sjukdomsläget	12
Inventering av avelsarbetet	12
Genetisk analys	14
Diskussion	14
Referenser	18
Bilaga	20

INLEDNING

I och med att hundens genom har kartlagts öppnas nya möjligheter för att med dagens teknik hitta genetiska avvikelser som leder till sjukdom hos hund. Dessutom har det nu presenterats data i vilket beskrivs en metod för att hitta den genetiska orsaken till monogent nedärvda sjukdomar hos hund med så lite som 10 sjuka individer och 10 friska kontroller inom samma ras (Karlsson et al., 2007).

Sjukdomen exokrin pancreasinsufficiens (EPI) ses hos ett flertal hundraser men är vanligast och mest studerad hos schäfer. Hos schäfer ses en ärftlig variant av sjukdomen som drabbar framför allt hundar upp till fyra års ålder. Vid denna sjukdom kan hunden inte tillgodogöra sig födan den får i sig med illabefinnande och avmagring trots glupande aptit som följd. Diagnosen är lätt att ställa genom ett blodprov, men behandlingen är kostsam och livslång.

Hos schäfer har ärftligheten i ett flertal studier rapporterats vara autosomt recessiv (Westermarck, 1980, Moeller et al., 2002), men man känner inte till vilken genförändring som orsakar EPI. För att djuren och deras ägare ska slippa drabbas av denna sjukdom vill man kunna styra aveln så att man inte avlar på en drabbad hund samt undvika att två anlagsbärare paras med varandra. Därmed minskar risken för att få en sjuk avkomma. I nuläget kan en anlagsbärare endast identifieras om någon av dess föräldrar insjuknar eller ifall den själv får en sjuk avkomma. Om den orsakande genetiska förändringen identifieras så skulle en logisk fortsättning vara att arbeta fram en testmetod för att kontrollera om avelsdjur är anlagsbärare.

SYFTE

Syftet med detta arbete var dels göra en litteraturstudie om sjukdomen och dels att göra en inventering av sjukdomsläget i Sverige idag. Dessutom har blodprov samlats in för att en genetisk analys för EPI hos schäfer framöver ska kunna utföras.

BAKGRUND

Bukspottskörtelns funktion

Bukspottskörteln består av en endokrin och en exokrin del. Den endokrina delen producerar flera hormoner, bland annat insulin och glukagon. Den exokrina delen producerar ett sekret som är mycket viktigt för nedbrytningen av föda i tarmen. Sekretet har hög koncentration av HCO_3^- vilket neutraliserar magsäcksinnehållet när detta når duodenum. Det innehåller också en rad enzymer vilka har kapacitet att nästan totalt bryta ned hundens näringsintag (Sjaastad, 2003).

Utsöndringen till tarmen från den exokrina delen styrs av det autonoma nervsystemet via vagusnerven och av hormonerna gastrin, secretin och cholecystokinin (CCK) (Sjaastad, 2003).

Hos hund har bukspottskörteln också visats ha en funktion i kobalaminupptaget (vitamin B12) genom produktion av intrinsic factor (IF) samt R-binder (gastrointestinala kobalaminbindande proteiner som ej är intrinsic factor) (Batt et al., 1989).

Beskrivning av sjukdomen

Exokrin pancreasinsufficiens är ett tillstånd där den enzymproducerande pankreasvävnaden inte producerar tillräcklig mängd enzymer för att nedbrytning av föda ska kunna ske i tarmen. Orsaken kan vara förvärvad, till exempel en atrofi av körtelvävnad som vanligtvis drabbar unga hundar (pancreatic acinar atrophy, PAA), kronisk pankreatit där symtom framför allt ses hos lite äldre hundar eller neoplasi i pancreas. EPI kan också orsakas av en medfödd hypoplasi och drabbar då mycket unga hundar. Den vanligaste orsaken är atrofi av körtelvävnad och schäfrar är tydligt överrepresenterade i denna kategori. Även långhårig collie, chow chow och eurasier drabbas av samma typ av sjukdom. Cavalier king charles spaniel är också överrepresenterad vad gäller EPI, men cavalierer som insjuknar är ofta äldre och kronisk pankreatit anses därmed kunna ligga bakom sjukdomen i den rasen. (Batchelor et al., 2007).

Åldern vid insjuknande i EPI hos schäfer har rapporterats vara sex till 204 månaders ålder, med en median på 36 månader (Batchelor et al., 2007). I en finsk studie angavs att 93 % av de schäfrar som insjuknade i EPI var under fyra år (Raiha and Westermarck, 1989).

Symtom på sjukdomen inkluderar ökad aptit, ökad vattenkonsumtion, ökad avföringsfrekvens och ökad mängd avföring. Avföringen är dåligt nedbruten, gulgrå till färgen och luktar illa. Ökad frekvens av diarré och gasighet ses också, samt koprofagi, speciellt av den egna dåligt nedbrutna avföringen. Bukömhet, troligen på grund av den ökade gasmängden i tunntarmarna, kräkningar och temperamentsförändringar har också rapporterats. Inga symtom på förestående sjukdom har dock säkerställts (Raiha and Westermarck, 1989).

Diagnos

Diagnos ställs genom en radioimmunoassay av serum canine trypsin-like immunoreactivity (s-TLI). S-TLI mäter både trypsin och trypsinogen i blodet. Enzymerna produceras i bukspottskörteln och läcker normalt ut i blodet men minskar vid EPI (Williams, 1983). Blodprovet tas efter minst tre och helst efter tolv timmars fasta (L-E Edqvist, 2005).

En hund som har ett TLI-värde på mindre än 2,5 $\mu\text{mol/liter}$ får diagnosen EPI. Mellan 2,5 och 5,2 $\mu\text{mol/liter}$ (klinisk kemi vid SLU:s referensvärden 2007) finns en gråzon, där det rekommenderas omprov efter 1-2 månader med behandling under tiden om hunden har symtom. Om hunden däremot fritestas från EPI vid omprov kan man prova att sätta ut behandling (Batt, 1993). Testet har visats ha 100 procents sensitivitet och specificitet för exokrin pancreasinsufficiens

(Williams and Batt, 1988). En hund som upprepade gånger får resultat i gråzonen utan att uppvisa symtom anses vara subkliniker. Dessa hundar insjuknar ofta i klinisk sjukdom inom en varierande lång framtid (Wiberg and Westermarck, 2002).

Även andra tester kan göras för att ställa diagnosen EPI, men TLI är det i särklass enklaste och säkraste sättet (Williams and Batt, 1988).

Ärftlighet

PAA är ärftlig hos schäfer men arvs gången är ännu inte fullständigt fastställd. Stamtavleanalyser tyder på att sjukdomen har autosomt recessiv nedärvning, men i de studier som har gjorts är något färre hundar drabbade än förväntat vid den typen av nedärvning (Moeller et al., 2002). Westermarck (1980) har studerat två schäferfamiljer i Finland med ett flertal drabbade hundar. I den ena familjen har en tik parats tre gånger med en hane och en gång med en annan hane. Både hanarna och tiken saknar symtom av EPI vid minst sex års ålder. I alla fyra kullar finns minst en drabbad avkomma. Fördelningen drabbade avkommor tyder på autosomt recessiv nedärvning men utifrån data kan inte en autosomal dominant nedärvning med inkomplett penetrans avskrivras (Westermarck, 1980). Moeller (2002) har studerat schäferfamiljer med hundar drabbade av EPI i USA. Slutsatsen i denna studie är att sjukdomen styrs av ett omfattande, men begränsat locus, vilket nedärvs recessivt eller mycket nära recessivt (Moeller et al., 2002).

En viss överrepresentation har i en studie setts hos tikar. Detta skulle kunna förklaras av att det finns andra faktorer som gör att det är mer troligt att klinisk sjukdom utvecklas hos hondjuren (Batchelor et al., 2007). I andra studier är hanhundar och tikar drabbade i samma utsträckning (Hall, 1991).

Patofysiologi

Bukspottskörteln har en stor funktionell reserv och symtom framträder inte förrän mer än 90 procent av vävnaden har förlorats (Simpson et al., 1992). Vid pancreatic acinar atrophy (PAA) är pancreasvävnaden makroskopiskt alltså nästan obefintlig när sjukdomssymtomen debuterar. Det resulterar i att produktionen av pancreasenzymerna är kraftigt nedsatt, med malabsorption som följd (Batt, 1993). Enstaka drabbade hundar visar dock aldrig kliniska symtom trots atrofi av pancreasvävnaden (Clark et al., 2005).

Vid klinisk sjukdom ses mikroskopiskt att körtelvävnaden har ersatts av fettväv, och parenkym samt gångsystem är atypiska. När subkliniskt drabbade hundar identifierats (TLI < 5 vid flera mätningar, utan kliniska symtom) och biopsier tagits från deras bukspottskörtlar har man sett att kliniska symtom föregås av en misstänkt autoimmun process med lymfocytär pancreatit. Inflammationen leder till en successiv nedbrytning och atrofi av den exokrina delen av bukspottskörteln (Wiberg et al., 1999).

Steatorréen vid EPI orsakas av att lipas är nödvändigt för fettnedbrytning i tarmen och i avsaknad av lipas passerar nästan allt fett genom tarmen utan att absorberas.

Däremot kan enzymer från tarmslemhinnan kompensera kolhydrat- och proteinnedbrytningen till två tredjedelar i avsaknad av pancreaszymer (Hall, 1991).

Undernäring och minskad utsöndring från pankreas av trofiska substanser kan leda till att proteinsyntesen i tunntarmens enterocyter minskar (Batt, 1993). Minskad syntes av specifika bärarproteiner i borstbrämen kan ge minskad absorption i tarmen av till exempel monosackarider, men eftersom det samtidigt sker en minskad nedbrytning av bärarproteinerna då proteaser från pankreas är frånvarande varierar borstbrämsenzymernas påverkan på upptaget från hund till hund (Batt and Mann, 1981) (Rogers et al., 1980).

I och med malabsorptionen av fetter får hundar drabbade av EPI också brist på fettlösliga vitaminer. Dessutom får EPI-hundarna ofta brist på vitamin B12 (kobalamin) (Hall, 1991). Bristen har föreslagits bero på att B12-absorptionen i tarmen är beroende av intrinsic factor (IF) från pancreas, och att produktionen av IF är nedsatt vid EPI. Andra orsaker till B12-brist kan vara minskad nedbrytning av R-bindare i tarmen, bakteriell överväxt och/eller onormalt lågt pH i tarmen (Simpson et al., 1989).

Vid obehandlad EPI ses ofta bakteriell överväxt i tunntarmen (Williams et al., 1987). Denna orsakas troligen av avsaknaden av bukspottskörtelvätskan med dess antibakteriella egenskaper. Även undernäring skulle kunna predisponera för bakterieöverväxt genom minskad immunologisk motståndskraft mot infektioner (Williams et al., 1987).

Bakterieöverväxten ger i sin tur enzymologiska och morfologiska förändringar i jejunum. Vid överväxt av obligata anaerobes ses nedsatt aktivitet hos en rad borstbrämsenzymer och partiell villiatrofi (Williams et al., 1987). Vissa obligata anaerobes har visats kunna ge skador på borstbrämen och nedsatt enzymaktiviteten genom produktion av proteaser vilka kan frisätta eller bryta ned enzymerna. Vid överväxt utan obligata anaerobes samt hos EPI-hundar utan överväxt ses ofta ökad enzymaktivitet (Williams et al., 1987). Både överväxt av aerobes och anaerobes kan dock bidra till malabsorption av kolhydrater och orsaka sekretorisk diarré genom konjugering av gallsalter och hydrolysning av fettsyror (Batt, 1993).

Studier har gjorts för att identifiera externa faktorer som påverkar sjukdomsuppkomsten, men inga sådana faktorer har säkerställts (Raiha and Westermarck, 1989).

Behandling

Pancreaszymer

Hundar med symtom behandlas genom tillförsel av pancreaszymer. Bäst resultat ger enzymer utan hölje i pulverform. Enzymerna serveras iblandat i foder i början av varje måltid. Flera små mål mat om dagen rekommenderas (Hall, 1991). Ett billigare men lika effektivt alternativ är att ge 50-100 gram av rå

bukspottskörtel från nöt eller gris per måltid (Wiberg et al., 1998). Detta ges färskt eller fryses i -20 grader och tinas före servering (Batt, 1993).

När bra behandlingsresultat uppnåtts kan man testa att minska enzymmängden till så låg mängd som möjligt utan att hunden visar symtom. Uppnås inte ett bra resultat vid tillskottet av enzymer kan man testa att öka dosen enzymer (Hall, 1991).

Vitaminer

Vitamin B12 (kobalamin) måste kontrolleras vid återbesök hos veterinären och vissa hundar behöver medicineras med detta. Vid låga kobalaminhalter i serum ges 250-500 mikrogram kobalamin parenteralt. Behandlingen upprepas om låga värden uppmäts vid återbesök (Westermarck, 2005). Fettlösliga vitaminer kan vara bra att ge som tillskott framför allt i början av behandlingen, innan fettabsorptionen i tarmen har börjat normaliseras (Batt, 1993).

Syrhämmare

Dåligt resultat vid insatt behandling med pankreasenzymer har ibland tillskrivits att de exogena enzymerna, framför allt lipas, inaktiveras i magsäckens sura miljö. Därför kan H₂-receptorblockare (till exempel cimetidin eller ranitidin) ges peroralt 20 minuter före måltid för att inhibera syraproduktionen och minska nedbrytningen av enzymerna (Batt, 1993).

Foder

Behov att foderbyte varierar mellan hundar. Vissa kan fungera bra på ett vanligt hundfoder i kombination med enzymtillskott medan andra svarar bättre på ett lättsmält foder. Byte till ett lättsmält foder kan vara av särskild vikt i början av behandlingen när hunden fortfarande är undernärd och eventuella skador i tarmslemhinnan ännu ej hunnit läka. Hundar med EPI kan utveckla överkänslighet mot foder och till dessa hundar passar det bra att ge ett hypoallergent foder, även detta är viktigast i början av sjukdomen (Wiberg, 2004). Traditionellt har dieter med låg fetthalt rekommenderats till hundar med EPI och det finns studier som visar positiva resultat av sådana foder (Pidgeon, 1982). Det finns dock andra studier som visar att fodrets fetthalt inte ger någon skillnad annat än hos vissa individer (Westermarck and Wiberg, 2006). Den slutliga rekommendationen blir därmed oftast att anpassa dieten efter individens behov, men att utgå från en lättsmält, ev hypoallergen kost.

Antibiotika

Har hunden en kraftig bakteriell överväxt i tunntarmen av obligata anaerobier är det troligt att det krävs antibiotika för att få bukt med symtomen. Dock behöver även vissa hundar utan obligata anaerobier i tarmen antibiotikabehandling, och vissa med dessa bakterier blir av med symtomen på bara enzymtillskottsbehandling (Williams et al., 1987). Förslag på antibiotika är oxitetracyklin 10-20 mg/kg kroppsvikt x 3, metronidazole 10 mg/kg x2 eller tyolsin 10 mg/kg x 3. Kuren bör pågå i minst en månad (Batt, 1993).

Svar på behandling

Cirka 15 procent av hundar med diagnosen EPI avlivas strax efter diagnosen framför allt på grund av ekonomiska aspekter. Mindre än 15 procent av hundar

svarar dåligt på behandlingen. Resterande hundar, ca 70 procent svarar bra eller ganska bra på enzymtillskotten, men många behöver även foderbyte, antibiotika, syrahämmare eller dylikt. Efter insatt enzymtillskott ska diarrén avta och försvinna inom några dagar, och hunden ska förväntas gå upp i vikt 0,5-1 kg/vecka. I hälften av fallen kvarstår dock hungern trots en i övrigt framgångsrik behandling (Hall, 1991).

Försök med immunsuppressiv behandling

Försök har gjorts med att ge immunosuppressiva läkemedel till subkliniskt drabbade individer för att hindra sjukdomsutvecklingen, men flera utav hundarna fick ändå sättas på enzymtillskottsbehandling under varierande tid efter att de immunosupprimerande läkemedlen hade satts ut (Wiberg and Westermarck, 2002).

Tidigare genetiska studier av EPI

Schäferstudien

En genetisk studie av schäfrar med EPI har tidigare publicerats. Inga kandidatgener fanns föreslagna och därför utfördes en undersökning av hundarnas hela genom. Ett antal sjuka och friska hundar från tre familjer med kliniskt sjuka hundar jämfördes för totalt 384 mikrosatelliter utspridda över hela genomet. Det fanns en viss koppling mellan sjukdomen och markörerna FH2107 och FH2302 på CFA3 (kromosom nummer 3). Eftersom kopplingarna var tillräckligt starka för att man skulle kunna misstänka att det fanns en gen som orsakar sjukdomen i närheten studerades området sedan noggrannare. Detta gjordes genom tio nya markörer. 40 hundar som inte var med i originalomgången inkluderades denna gång. Samma styrka på kopplingen uppmättes nu mellan sjukdom och FH2107. Sambandet mellan sjukdom och FH2302 sjönk. Ingen av de nya markörerna i området visade någon koppling (Clark et al., 2005).

I samma artikel publiceras också resultat från en genuttrycksstudie utförd på bukspottskörtlar från friska hundar och från hundar sjuka i EPI. I studien tittade man efter skillnader mellan friska och sjuka hundar vad gäller genuttryck. Denna analys hittade 244 gener med mer än en tvåfaldig skillnad mellan sjuka och friska hundar. Av dessa gener var 231 uppreglerade och 13 gener var nedreglerade. Den mest intressanta genen befanns vara *gp25L* som var extremt nedreglerad hos sjuka hundar. Alla *gp25L*:s exoner och delar av genens introner sekvenserades men inga nukleotidskillnader mellan sjuka och friska hundar som skulle kunna vara orsak till EPI hittades (Clark et al., 2005).

Eurasierstudien

I den här studien identifierades först två kandidatgener, båda var funktionella och den ena var dessutom intressant eftersom den ligger i området mellan FH2107 och *gp25L* på kromosom 3 (se ovan). 54 hundar från eurasierfamiljer med EPI testades för sex mikrosatellitmarkörer runt generna för cholecystokinin (CCK) och cholecystokinin A receptor (CCKAR). Generna är intressanta eftersom CCK orsakar gallblåsekontraktion och utsöndring av enzymer från bukspottskörteln genom bindning till klass A-receptorn. Genen för *CCK* placerades på CFA23 och genen för *CCKAR* på CFA3 i området mellan FH2107 och *gp25L*. Genom en

linkage analysis kunde det fastställas att ingen av markörerna och därmed ingen utav generna hade någon koppling till EPI hos eurasier. Det fanns heller ingen koppling för FH2107 på Eurasier (Proschowsky and Fredholm, 2007).

Sammanfattningsvis hittades alltså i schäferstudien en viss koppling mellan sjukdomen och markören FH2107 på kromosom 3, men kopplingen var inte så stark att man kan anse att en koppling är bevisad. Vid studien av genuttrycken i atrofiska bukspottskörtlar fann man en kraftig nedreglering av *gp25L*. Denna var intressant i dubbel bemärkelse eftersom den dels var nedreglerad och dels ligger i närheten av FH2107 på kromosom 3. Inga nukleotidskillnader mellan sjuka och friska hundar hittades dock vid närmare analys, men området kvarstår som intressant. I eurasierstudien tittade man närmare på området mellan FH2107 och *gp25L* samt området kring genen för cholecystokinin. Ingen koppling kunde identifieras.

Således har ingen koppling ännu bevisats finnas, men med tanke på sjukdomens nedärvning måste det existera en koppling. Nya, mer känsliga, metoder för att hitta genetiska kopplingar ger förhoppningsvis möjligheter att lösa gåtan.

MATERIAL OCH METODER

Inventering av sjukdomsläget idag i Sverige

För att inventera sjukdomsläget idag har vi valt att kartlägga förekomst av sjukdomen EPI genom att göra en sammanställning av de prover som sänts till Klinisk kemiska laboratoriet vid SLU de senaste fem åren. Blodprover sänds till Klinisk kemiska laboratoriet från veterinärer i hela Sverige, och laboratoriet är ett av få som gör mätning av s-TLI-värden i Sverige. Det är okänt hur stor procentuell andel av det totala antalet prover i Sverige som sänds till Klinisk kemiska laboratoriet.

Jag har fått tillgång till listor över alla s-TLI-prover som analyserats på laboratoriet de senaste fem åren (2002-06-01 – 2007-09-26, avrundat till 64 månader). Dessa listor innehåller ingen djuridentitet utan endast ras, kön och ålder vid provtagning samt s-TLI-värde

Utifrån listorna över alla s-TLI-prover som analyserats har jag undersökt om några raser är överrepresenterade för sjukdomen genom beräkning av odds ratio. Schäfrar har jämförts med hela gruppen testade hundar medan övriga raser har jämförts med alla hundar i gruppen som inte är schäfrar. Detta sätt har använts för att inte det stora antalet testade schäfrar ska ge en snedvriden bild och har använts i tidigare studier (Batchelor et al., 2007).

För att se huruvida något kön är överrepresenterat bland sjuka schäfrar har jag använt odds ratio och jämfört hanar inklusive hankastrater med tikar inklusive tikkatrater. Från ålder vid provtagningstillfället har medelålder och medianålder beräknats.

Inventering av avelsarbetet inom Schäferklubben i dag gällande EPI

För att få en bild av hur avelsarbetet i nuläget ser ut för att minska förekomsten av EPI hos schäfer kontaktades Schäferklubben, den rasklubb för schäfrar som är knuten till Svenska kennelklubben. Schäferklubbens avelsgrupp kontaktades via e-mail med frågor om hur klubben hanterar EPI-hundar och om det finns några riktlinjer för aveln för att minska sjukdomsförekomsten.

Eftersom EPI är en sjukdom som syns hos unga hundar, men som inte nödvändigtvis visar sig de tre-fyra första levnadsåren ville jag ta reda på hur stor andel av schäfrarna som sätts in i aveln innan de nått en ålder då det är relativt troligt att de inte kommer utveckla sjukdomssymtom själva och då eventuella syskon troligen har utvecklat sjukdomssymtom. Schäferklubben hade inte några data på hur gamla hundar är i genomsnitt när de sätts in aveln så detta har beräknats utifrån de 300 första registrerade kullarna 2006. Data har insamlats från Svenska Kennelklubbens officiella register "Hunddata". Åldern på de hundar som hade sin första registrerade kull i Sverige under aktuell period noterades och ett medeltal samt en median både vad gäller hanhundar och tikar kunde beräknas.

Insamling av blodprover för genetisk analys

Sjuka hundar

Sjuka hundar har mestadels identifierats genom listor från Klinisk kemiska laboratoriet, SLU. Listorna bestod av alla testade schäfrar under de senaste tre åren (2003-2006). Hundar med TLI <2,5 som provtagits när de varit runt tre år eller yngre har valts ut. Tillstånd att kontakta ägare till hundar har erhållits efter dialog med klinikerna där hundarna diagnosticerats. De hundägare som lämnat sitt samtycke till studien har sedan gått till en klinik i närheten där deras hundar provtagits för DNA-analys och proven har därefter skickats till SLU. Några hundägare har kontaktat oss efter att ha hört talas om projektet, och några har blivit informerade om projektet direkt när de första gången kom till respektive klinik.

35 hundar valdes ut från listorna från klinisk kemi. Av dessa har klinikerna kontaktats i 31 av fallen. Övriga kliniker har inte kunnat identifieras. För tolv av hundarna har klinikerna eller djurägarna inte varit intresserade av eller haft möjlighet att hjälpa till. Elva hundar var vid samtalen avlivade. Nio hundägare var villiga att medverka och har fått material samt instruktioner hemskickade för provtagning på valfri veterinärklinik. Sex av dessa ingår i vår studie. Övriga hundar som ingår har nåtts av information om projektet på andra vägar. Hittills har drygt tolv stycken blodprover insamlats.

Vi har etiskt godkännande för studien och djurägarna har fyllt i en individuell godkännande blankett där även hundens registreringsnummer angivits. Utifrån detta har vi plockat ut stamtavlan från Svenska Kennelklubbens hunddatabas.

Kontroller

Kontrollerna har framför allt samlats in genom schäferklubben/brukshundsklubben. Några kontroller har tillkommit sedan de hört om

projektet från annat håll. För att inkluderas ska de vara äldre än 8 år gamla och kliniskt friska vad gäller EPI-status, samt ha ett TLI > 5,2. Djurägarna har lämnat ut hundarnas registreringsnummer och/eller stamtavlor. Vissa av hundarna är nära släkt med de sjuka hundarna som ingår i studien medan andra är mer avlägset släkt med sjuka hundar. Stamtaflor saknas på två av kontrollerna.

RESULTAT

Inventering av sjukdomsläget

Totalt analyserades under perioden 2 961 TLI-prover på Klinisk kemi vid SLU.

Raser

Schäfrar utgjorde 742 av blodproven (25 %). Totalt var 274 prover positiva och av de positiva var 161 prover från schäfrar (59 %). I snitt har 2,5 schäfrar i månaden testats positiva för EPI under perioden. Utöver schäfrar har representanter för 30 andra raser samt blandraser och hundar av okänd ras testats positiva (se tabell 1).

Ålder

Den genomsnittliga åldern vid provtagningstillfället var hos schäfrar 52,8 månader ($\pm 30,6$ månader). Åldrarna vid provtagningen varierade mellan 4 och 140 månader med en median på 48 månader (se tabell 2).

Kön

Av de 742 testade schäfrarna hade kön angivits för 728 hundar. Fler hanhundar än tikar testades men fler tikar än hanhundar testades positiva (se tabell 3).

Inventering av avelsarbetet

Schäferklubbens arbete

Det finns ingen central registrering av EPI-fall inom schäferrasen. De fall som kommer Schäferklubbens hälsokommitté till känna registreras hos denna men publiceras inte officiellt. Hälsokommittén jobbar för att samla in blodprover från EPI-hundar till projektet, med information om sjukdomen och projektet på Schäferklubbens hemsida som en del av arbetet. För närvarande finns inga restriktioner eller rekommendationer från schäferklubbens sida vad gäller avel för att minska förekomsten av EPI (Henriksson, 2007).

Ålder vid insättande i aveln

Vid en genomgång av de 300 första kullarna registrerade 2006 (födda under perioden 2005-07-15 – 2006-06-29), konstateras att 73 nya hanhundar sattes in i aveln. Medelåldern på dessa hanhundar var vid kullens födelse 42,9 månader, medianen var 37 månader (15-129 månader). 145 nya tikar sattes in i aveln under samma period. Medelåldern på dessa var vid kullens födelse 40,3 månader, och medianen var 37 månader (15-90 månader).

Tabell 1. De raser som testats positiva.

	Antal tester	Antal positiva	Odds ratio	Intervall för OR vid 95 % konfidensintervall	
				Undre gräns	Övre gräns
Schäfer	742	161	5,16	3,99	6,68
Amerikan*	11	1			
Bearded collie	20	2	2,09	0,48	9,12
Blandras	302	39	3,69	2,45	5,56
Border collie	25	4	3,64	1,23	10,80
Borderterrier	15	1	1,33	0,17	10,24
Borzoi	7	2	7,57	1,45	39,46
Cairnterrier	30	4	2,94	1,01	8,56
Cavalier	45	5	2,39	0,93	6,18
Chihuahua	16	1	1,24	0,16	9,51
Chow chow	4	1	4,70	0,52	42,32
Cocker spaniel	28	1	0,69	0,09	5,11
Collie, korthårig	7	1	3,13	0,37	26,18
Collie, långhårig	82	17	5,56	3,14	9,85
Eurasier	6	4	38,61	6,99	213,10
Finsk lapphund	14	1	1,44	0,19	11,10
Golden retriever	160	4	0,46	0,17	1,26
Grand danois	24	1	0,80	0,11	6,04
Jack russel	48	4	1,72	0,61	4,87
Kinesisk nakenhund	17	2	2,51	0,57	11,12
Labrador	52	1	0,36	0,05	2,63
Lagotto romagnolo	13	1	1,56	0,20	12,10
Meremba**	1	1			
Newfoundlandshund	7	1	3,13	0,37	26,18
Pudel, toy	6	1	3,75	0,43	32,39
Saluki	9	1	2,34	0,29	18,88
Springer spaniel	37	3	1,66	0,50	5,50
Stafford	4	1	4,70	0,52	42,32
Tax	43	1	0,44	0,06	3,22
Welsh corgi	3	1	3,39	0,85	104,37
Westie	7	1	3,13	0,37	26,18
Whippet	17	1	1,17	0,15	8,87
Okänd ras***	47	3			

* ingen beräkning har gjorts av OR eftersom flera raser som börjar på ”amerikan” kan vara ihopklumpade.

** ingen OR är uträknad pga få antal testade hundar

*** ingen OR är uträknad

Tabell 2. Åldrar vid provtagningstillfället hos schäfrar med TLI <2,5

Ålder	Antal hundar
<12 mån	1
12-23 mån	25
24-35 mån	23
36-47 mån	23
48-59 mån	25
60-71 mån	14
72-83 mån	8
>84 mån	26
Okänd	14

Tabell 3. Testade schäfrar fördelat på kön

Kön	Antal testade	Antal med TLI <2,5	Odds ratio	Undre gräns	Övre gräns
Hanhund	404	67	0,52	0,37	0,75
Hankastrat	12	3			
Tik	300	83	1,91	1,34	2,73
Honkastrat	12	4			
Okänt kön	14	4			

Genetisk analys

Arbetet med den genetiska studien pågår fortfarande. Resultaten kommer att ingå i en annan studie.

DISKUSSION

Syftet med mitt examensarbete var dels att göra en litteraturstudie av EPI på schäfer och dels att inventera sjukdomssituationen idag i Sverige.

Vid en jämförelse (se tabell 4) av resultaten från den aktuella inventeringen och den opublicerade inventeringen från 1995/1996 (se bilaga 1) kan utläsas att TLI-analysen används i mycket större utsträckning nu. Under den aktuella inventeringsperioden testades i medeltal 46 prover per månad. Under inventeringsperioden 1995/1996 var motsvarande siffra 16 prover per månad. En mindre andel av proverna kom vid den senaste inventeringen från schäfrar och detsamma gäller andelen av de positiva proverna. Av de schäfrar som testats är dock andelen positiva hundar i samma storleksordning (22 procent positiva schäfrar nu jämfört med 20 procent 1995/1996). Det är svårt att veta varför så många fler hundar testas nu jämfört med för tio år sedan, men man kan spekulera i att blodprovet är mer allmänt känt bland veterinärer nu än i mitten på nittioalet. Det kan också vara så att fler hundar faktiskt är sjuka med symptom som liknar

EPI. För att se den faktiska sjukdomsprevalensen i hela den svenska hundpopulationen skulle en mycket mer detaljerad studie behöva göras. Journalstudier och utdrag ur försäkringsstatistik skulle kunna ge mer information, liksom enkätundersökningar i misstänkt överrepresenterade raser.

Tabell 4. Jämförelse av antal blodprover testade för TLI mellan perioden 1995/1996 och perioden 2002-2007

	1995/1996, 12 mån	2002-2007, 64 mån
Totalt antal TLI-prover	197	2961
Varav schäfer	76 (39%)	742 (25%)
Totalt antal prover med TLI <2,5	21	274
Varav schäfer <2,5	15 (71%)	161 (59%)
Antal i gråzon	4	119
Varav schäfer	3 (75%)	72 (60%)

I inventeringen framkom det att några raser var överrepresenterade för EPI bland de testade hundarna. Bland annat var schäfer kraftigt överrepresenterad. De flesta av de övriga överrepresenterade raserna har också tidigare rapporterats som överrepresenterade (Batchelor et al., 2007), men i den aktuella populationen är även border collie och borzoi överrepresenterade. Eftersom jag utifrån listorna inte har någon information om ifall någon individ är testad flera gånger, kan det i raser som representeras av få individer bli en falsk överrepresentation om en positiv hund testats ett flertal gånger. Det skulle därför vara intressant att titta närmare på testade border collies och borzoier för att kunna exkludera eventuellt dubbeltestade hundar. Det skulle även vara givande att titta på sjukdomsförekomsten inom raserna i en större population.

I inventeringen framkom det också att tikar är överrepresenterade bland de sjuka schäfrarna. Detta stämmer bra med en tidigare studie, men sämre med en annan (Batchelor et al., 2007, Hall, 1991). Att tikar är överrepresenterade skulle kunna tyda på att hormoner eller andra könsspecifika faktorer bidrar till sjukdomsutvecklingen. Det skulle kunna vara så att båda könen har samma risk att drabbas av pancreasatrofi men att tikar har större risk att utveckla symtom.

Slutligen framkom det i inventeringen att medianåldern vid insjuknande i EPI för schäfrar i Sverige är 48 månader, vilket är 12 månader högre än en tidigare studie (Batchelor et al., 2007). Medianåldern för insjuknande har likställts med medianåldern vid provtagning eftersom en hund som en gång har fått diagnosen EPI genom uppmätning av ett lågt TLI-värde alltid kommer att ha ett lågt TLI-värde, och således behöver inte upprepade blodprover tas från en diagnosticerad hund. En felkälla i den här inventeringen är dock att en del hundar kan ha gått med symtom på sjukdom under en lång tid innan diagnos ställts och den faktiska

åldern för insjuknande kan därmed vara lägre. Å andra sidan verkar det som att även positiva hundar i vissa fall har testats flera gånger och detta drar därmed upp median- och medelålder för insjuknande. För en mer exakt bestämning av ålder för insjuknande skulle man därför behöva ta till någon annan metod, till exempel en enkätundersökning. Det är dessutom möjligt att det är olika sjukdomsmekanismer bakom EPI hos unga schäfrar och hos dem som insjuknar i högre åldrar. Det är stor sannolikhet att EPI hos unga schäfrar beror på den ärftliga pancreasatrofin, men åtminstone vissa fall av EPI hos äldre schäfrar skulle kunna vara orsakad av kronisk pankreatit eller neoplasi.

Den genomsnittliga åldern för insjuknande har betydelse vid utformning av ett avelsprogram för att minska sjukdomsförekomsten inom en ras. En hög genomsnittlig ålder för insjuknande gör att hundarna bör vara relativt gamla vid insättande i aveln för att minska risken för att sjuka hundar ska användas i aveln. I det här examensarbetet gjordes en beräkning av hur gamla schäfrarna i genomsnitt är när de sätts in i aveln. Medelåldern för hanhundar vid deras första kull var 42,8 månader och motsvarande siffra för tikar var 40,2 månader (median 37 för både hanhundar och tikar). Jämför man dessa siffror med tidigare rapporterade åldrar för insjuknande av schäfrar i EPI ser det relativt bra ut. Dock bör man ha i åtanke att lika många hundar är yngre än 37 månader vid första kullen som de som är äldre än 37 månader och att åldersspridningen är mycket stor. Även om medelåldern och medianen ligger relativt bra vore det önskvärt att minska antalet mycket unga hundar som sätts in i aveln. Vill man använda unga hundar i aveln bör man i alla fall försäkra sig om att både tiken och hanens föräldrar är fria från symtom vid högre ålder.

Som komplement för att styra aveln mot en bättre EPI-situation skulle Schäferklubben kunna föra en inofficiell offentlig registrering av drabbade hundar. Uppfödare skulle då kunna se vilka hundar som är drabbade och ta föräldrar, helsyskon samt avkommor ur aveln. Det finns dock flera problem med ett sådant förfarande. Det skulle vara svårt att göra en sådan rapportering obligatorisk och är rapporteringen frivillig skulle de uppfödare som rapporterar sina fall kunna missgynnas, genom att få ett dåligt resultat jämfört med uppfödare som inte anmäler sina drabbade hundar. Ett annat problem är att man riskerar att ta även icke-anlagsbärare ur aveln, vilket leder till en smalare avelsbas. Eftersom man i Sverige inte vet hur många hundar som är drabbade av EPI är det svårt att förutsäga hur många hundar som med ett sådant förfarande skulle tas ur aveln.

Med tanke på svårigheten att bygga upp ett lämpligt avelsprogram för att minska sjukdomsförekomsten utifrån det vi vet om sjukdomen idag skulle ett gentest vara högst önskvärt. Med ett gentest skulle man med ett enda blodprov kunna säga om hunden är drabbad, bärare av eller fri från sjukdomsanlaget. Utifrån den troliga autosomalt recessiva nedärvningen skulle man då kunna ta alla drabbade hundar ur aveln men anlagsbärare skulle kunna paras om det sker med fritestade hundar.

I och med att kartläggning av hundens genom blev färdigställd 2005 öppnades nya möjligheter för genetiska analyser av ärftliga egenskaper och sjukdomar hos hund och människa. I en beskriven metod behövs så lite som 10 drabbade hundar och 10 kontroller av samma ras för att identifiera den genetiska skillnaden vid en monogent nedärvd egenskap. Detta är möjligt genom att hundar inom samma ras och population är mycket lika genetiskt sätt, medan det mellan raser och även

inom en ras i olika delar av världen finns stora genetiska skillnader (Karlsson et al., 2007).

Ett set med ungefär 27 000 SNPs (single nucleotide polymorphisms) har utvecklats och visats informativ för alla hundraser samt vargar. Drabbade hundar och kontroller jämförs på alla 27 000 punkter utspridda över genomet och man letar efter regionen där det finns störst skillnad mellan grupperna. På det här sättet kan en intressant region i genomet identifieras (Karlsson et al., 2007).

Tanken med den genetiska studien är att använda den metod som beskrivs ovan med 27 000 SNP:s för undersökning av DNA från de insamlade schäfrarna. Denna metod skiljer sig från de metoder som använts i de tidigare nämnda genomstudierna genom att den bygger på SNP:s istället för större markörer som till exempel mikrosatelliter. Det stora antalet SNP:s som analyseras och den goda täckningen av hela genomet gör att det som ovan beskrivits går att hitta genetiska förändringar genom jämförelse av mycket få individer.

EPI anses hos schäfer vara en autosomalt recessivt nedärvd sjukdom och metoden skulle kunna passa mycket bra för en genetisk studie av sjukdomen. Ett av problemen med att samla in prover för en genetisk studie av EPI är dock att, som tidigare nämnts, hundarna insjuknar vid väldigt olika åldrar. När vi samlat in kontroller har vi bestämt att dessa ska vara minst 8 år och ha TLI >5,2, men det är möjligt att man egentligen skulle behöva lägga åldersgränsen för kontroller ännu högre.

REFERENSER

- Batchelor, D. J., Noble, P. J., Cripps, P. J., Taylor, R. H., Mclean, L., Leibl, M. A. & German, A. J. (2007) Breed associations for canine exocrine pancreatic insufficiency. *J Vet Intern Med*, 21, 207-14.
- Batt, R. M. (1993) Exocrine pancreatic insufficiency. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 23, 595-608.
- Batt, R. M., Horadagoda, N. U., Mclean, L., Morton, D. B. & Simpson, K. W. (1989) Identification and characterization of a pancreatic intrinsic factor in the dog. *Am J Physiol*, 256, G517-23.
- Batt, R. M. & Mann, L. C. (1981) Specificity of the BT-PABA test for the diagnosis of exocrine pancreatic insufficiency in the dog. *Vet Rec*, 108, 303-7.
- Clark, L. A., Wahl, J. M., Steiner, J. M., Zhou, W., Ji, W., Famula, T. R., Williams, D. A. & Murphy, K. E. (2005) Linkage analysis and gene expression profile of pancreatic acinar atrophy in the German Shepherd Dog. *Mamm Genome*, 16, 955-62.
- Hall, E. J., Bond, P. M., Mclean, C., Batt, R. M., Mclean, L. (1991) A survey of the diagnosis and treatment of canine exocrine pancreatic insufficiency. *J Small Anim Pract*, 32, 613-619.
- Henriksson, M. (2007) Medlem i svenska Schäferklubbens hälsokommitté.
- Karlsson, E. K., Baranowska, I., Wade, C. M., Salmon Hillbertz, N. H., Zody, M. C., Anderson, N., Biagi, T. M., Patterson, N., Pielberg, G. R., Kulbokas, E. J., 3rd, Comstock, K. E., Keller, E. T., Mesirov, J. P., Von Euler, H., Kampe, O., Hedhammar, A., Lander, E. S., Andersson, G., Andersson, L. & Lindblad-Toh, K. (2007) Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat Genet*, 39, 1321-8.
- Moeller, E. M., Steiner, J. M., Clark, L. A., Murphy, K. E., Famula, T. R., Williams, D. A., Stankovics, M. E. & Vose, A. S. (2002) Inheritance of pancreatic acinar atrophy in German Shepherd Dogs. *Am J Vet Res*, 63, 1429-34.
- Pidgeon, G. (1982) Effect of diet on exocrine pancreatic insufficiency in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 181, 232-5.
- Proschowsky, H. F. & Fredholm, M. (2007) Exocrine pancreatic insufficiency in the Eurasian dog breed--inheritance and exclusion of two candidate genes. *Anim Genet*, 38, 171-3.
- Raiha, M. & Westermarck, E. (1989) The signs of pancreatic degenerative atrophy in dogs and the role of external factors in the ethiology of the disease. *Acta Vet Scand*, 30, 447-52.
- Rogers, W. A., Stradley, R. P., Sherding, R. G., Powers, J. & Cole, C. R. (1980) Simultaneous evaluation of pancreatic exocrine function and intestinal absorptive function in dogs with chronic diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*, 177, 1128-31.
- Simpson, K. W., Johnstone, J. M., Bell, P. R., Morton, D. B. & Batt, R. M. (1992) Pancreatic function following partial pancreatectomy and anastomosis of the pancreatic duct to the stomach or duodenum in dogs. *Res Vet Sci*, 52, 97-104.
- Simpson, K. W., Morton, D. B. & Batt, R. M. (1989) Effect of exocrine pancreatic insufficiency on cobalamin absorption in dogs. *Am J Vet Res*, 50, 1233-6.
- Sjaastad, Ö. V., Hove, K., Sand, O. (2003) *Physiology of domestic animals*, Oslo, Scandinavian Veterinary Press.

- Westermarck, E. (1980) The hereditary nature of canine pancreatic degenerative atrophy in the German shepherd dog. *Acta Vet Scand*, 21, 389-94.
- Westermarck, E., Wiberg M., Steiner, J. M., Williams, D.A. (2005) Exocrine pancreatic insufficiency in dogs and cats. IN Ettinger, S. J., Feldman, E.C. (Ed.) *Textbook of veterinary internal medicine*. 6 ed.
- Westermarck, E. & Wiberg, M. E. (2006) Effects of diet on clinical signs of exocrine pancreatic insufficiency in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 228, 225-9.
- Wiberg, M. E. (2004) Pancreatic acinar atrophy in German shepherd dogs and rough-coated collies. Etiopathogenesis, diagnosis and treatment. A review. *Vet Q*, 26, 61-75.
- Wiberg, M. E., Lautala, H. M. & Westermarck, E. (1998) Response to long-term enzyme replacement treatment in dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *J Am Vet Med Assoc*, 213, 86-90.
- Wiberg, M. E., Saari, S. A. & Westermarck, E. (1999) Exocrine pancreatic atrophy in German Shepherd Dogs and Rough-coated Collies: an end result of lymphocytic pancreatitis. *Vet Pathol*, 36, 530-41.
- Wiberg, M. E. & Westermarck, E. (2002) Subclinical exocrine pancreatic insufficiency in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 220, 1183-7.
- Williams, D. A. & Batt, R. M. (1988) Sensitivity and specificity of radioimmunoassay of serum trypsin-like immunoreactivity for the diagnosis of canine exocrine pancreatic insufficiency. *J Am Vet Med Assoc*, 192, 195-201.
- Williams, D. A., Batt, R. M. & Mclean, L. (1987) Bacterial overgrowth in the duodenum of dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *J Am Vet Med Assoc*, 191, 201-6.
- Williams, D. A., Batt, R. M. (1983) Diagnosis of canine exocrine pancreatic insufficiency by the assay of serum trypsin-like immunoreactivity. *J Small Anim Pract*, 24, 583-588.

BILAGA

TLI

TLI analyserat vid Inst f klinisk kemi 950614-960612 (1 år)

Totalt		197
varav schäfer		76 (39%)
antal < 2,5		21
varav schäfer		15 (71% av värdena under 2,5)
andra raser:	collie	2
	new f	1
	chow	1
	bl ras	1
	?	1
antal i gråzon (2,5-5,0)		4
varav schäfer		3 (75% av värdena mellan 2,5-5,0)
Ålder:	1år	4st
	2	3
	3	4
	4	2
	5	6
	9	1
	vet ej	3

2 hundar med låga värden var provtagna två gånger under året, endast första värdet är medräknat i ovan sammanställning

Summering:

På ett år har vi analyserat ca 200 TLI varav 40% var prov från schäfrar

11 % av proverna var < 2,5

2 % av proverna var mellan 2,5 och 5,0

Av de klart patologiska värdena (<2,5) var 71 % av proverna från schäfrar

Av "gråzonsvärdena (2,5-5,0) var 75 % från schäfrar