



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Antinukleära antikroppar och immunoglobulin A hos tollare och schäfer

Sara Hahne

*Uppsala
2017*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2017:32*

Antinukleära antikroppar och immunoglobulin A hos tollare och schäfer

Antinuclear antibodies and immunoglobulin A in NSDTRs and German shepherd dogs

Sara Hahne

Handledare: Helene Hamlin, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Pia Gustås, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Delnummer i serie: Examensarbete 2017:32

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: antinukleära antikroppar, Immunoglobulin A, nova scotia duck tolling retriever, tollare, schäfer

Key words: antinuclear antibodies, immunoglobulin A, Nova Scotia duck tolling retriever, NSDTR, German shepherd dog

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Nova scotia duck tolling retriever (tollare) och tysk schäferhund (schäfer) är överrepresenterade för vissa immunmedierade sjukdomar. Schäfer är en av de mest förekommande raserna att drabbas av systemisk lupus erythematosus (SLE) medan tollare har en påtagligt högre incidens jämfört med de flesta andra raser att drabbas av den SLE-liknande sjukdomen immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD). Antinukleära antikroppar (ANA) är en sensitiv markör för SLE och SLE-liknande sjukdomar. Standardmetoden för att påvisa ANA är indirekt immunofluorescens (IIF). IIF-ANA positiva hundar brukar delas in i två grupper beroende på fluorescensmönster; kornigt (utan kromosomreaktivitet) samt homogent (med kromosomreaktivitet). Andra typer av analysmetoder kan användas för att ytterligare kartlägga antinukleära antikroppar. En sådan teknik är till exempel immunodiffusion. Det är tidigare visat att endast hundar med kornigt IIF-ANA mönster ger utslag på immunodiffusion.

Förutom IMRD har tollare även visat sig vara överrepresenterade för steroid-responsiv meningit arterit (SRMA). En förhöjd koncentration av immunoglobulin A (IgA) i cerebrospinalvätska (CSF) och serum kan observeras hos de flesta hundar som drabbas av SRMA. Både friska tollare och friska schäfrar har i tidigare studier haft relativa låga IgA-serumkoncentrationer jämfört med andra raser. Låga IgA-koncentrationer har tidigare associerats med andra immunmedierade sjukdomar så som autoimmunitet och allergi.

Studien hade främst två syften. Det ena var att med immunodiffusion undersöka ANA-specificitet hos schäfer och hos tollare med misstänkt SLE eller SLE-liknande autoimmun sjukdom. Det andra var att med ELISA undersöka IgA-koncentrationerna i serum hos friska schäfrar och tollare samt hos tollare med SRMA och IMRD.

I ANA-undersökningen ingick 32 IIF-ANA positiva hundar med kornigt mönster (21 schäfrar, tre tollare och åtta individer av sju andra raser). Trettioen stycken var positiva på immunodiffusion. Tjugonio av dessa kunde vidare delas in i tre skilda undergrupper utifrån deras identitetsreaktioner på immunodiffusion. Grupp 1 (n=4) och grupp 2 (n=16) hade okända antigenreaktiviteter. Grupp 3 (n=9) hade antikroppar mot RNP. Två individer kunde inte placeras i någon av dessa tre grupper. En av dessa individer hade RNP-reaktivitet och den andra hade SSA/SSB-reaktivitet. En rasbunden ANA-specificitet uppmärksammades hos både tollare och schäfer då samtliga tre tollare tillhörde grupp 1 medan grupp 2 utgjordes av enbart schäfrar (80 % av de immunodiffusionspositiva schäfrarna).

IgA-koncentrationen i serum analyserades hos 74 hundar varav 40 stycken tollare (elva friska, tolv med akut obehandlad SRMA, tio med SRMA under behandling och sju med IMRD), 28 stycken friska schäfrar samt tio kontrollhundar av tio olika raser. Tjugofem utvalda serumprover analyserades även externt vid Laboklin (Bad Kissingen, Tyskland). Schäfrarna hade ett statistiskt signifikant lägre IgA-medelvärde jämfört med de friska kontrollhundarna av olika raser. Hos tollarna (friska respektive sjuka) kunde ingen sådan signifikant skillnad av IgA-medelvärde ses. Bara två av åtta tollare med akut SRMA hade IgA-koncentrationer över referensintervallet, till skillnad från tidigare studier där förhöjda IgA-koncentrationer har observerats hos de flesta hundar med SRMA. Man kan spekulera i huruvida tollare kan ha en genetiskt annorlunda variant av SRMA jämfört med andra raser.

SUMMARY

Nova Scotia duck tolling retrievers (NSDTRs) and German shepherd dogs are both overrepresented in some immune mediated diseases. German shepherd dog is one of the most common breeds to be affected by systemic lupus erythematosus (SLE), while compared to most breeds NSDTR has a substantially higher risk for developing the SLE-related disease immune mediated rheumatic disease (IMRD). Antinuclear antibodies (ANA) are a sensitive marker for SLE and SLE-related diseases. Indirect immunofluorescence (IIF) is the standard method for ANA analysis. IIF-ANA positive dogs are usually divided into two subgroups depending on their fluorescence pattern. Speckled pattern with no chromosomal reactivity and homogenous pattern with chromosomal reactivity. Other methods can be used to analyse and map antinuclear antibodies, immunodiffusion is such a method. Previous studies have shown that only dogs with a speckled pattern are positive on immunodiffusion.

Apart from IMRD, NSDTR has also shown to be clearly overrepresented in steroid responsive meningitis-arteritis (SRMA). Most affected dogs have an elevated concentration of immunoglobulin A (IgA) in both serum and cerebrospinal fluid (CSF). Healthy NSDTRs and German shepherd dogs have previously been shown to have relatively low IgA serum concentrations compared to most other breeds. Low IgA concentrations have previously been associated with other immune mediated diseases such as autoimmunity and allergy.

This study had two major aims. One was to examine ANA-specificity with immunodiffusion in German shepherd dogs and in NSDTRs with suspected SLE or SLE-related autoimmune disease. The other was to analyze serum IgA concentrations with ELISA, in healthy German shepherd dogs and NSDTRs, and in NSDTRs with SRMA and IMRD.

Thirty-two IIF-ANA positive dogs with speckled fluorescence pattern were part of the immunodiffusion study (21 German shepherd dogs, three NSDTRs and eight dogs of seven different breeds). Thirty-one of these were positive on immunodiffusion. Twenty-nine of the positive dogs could be further divided into three separate groups based on their reactions on immunodiffusion. Group 1 (n=4) and group 2 (n=16) had reactivity to unknown antigens. Group 3 (n=9) had antibodies directed to RNP. Two individuals could not be placed in either of the groups. One had RNP-reactivity and the other had SSA/SSB-reactivity. A breed associated ANA specificity was observed in both NSDTRs and German shepherd dogs. All NSDTRs belonged to group 1 and group 2 consisted only of German shepherd dogs (80% of immunodiffusion positive German shepherd dogs).

IgA concentration was analyzed in 74 dog sera; 40 NSDTRs (eleven healthy, twelve with acute untreated SRMA, ten with SRMA under treatment and seven with IMRD), 28 healthy German shepherd dogs and ten control dogs of various breeds. Twenty-five chosen sera were also analyzed at Laboklin (Bad Kissingen, Germany). German shepherd dogs had a statistically lower IgA mean value compared to the healthy control dogs. NSDTRs (healthy and ill) had no such statistical difference in IgA mean value. Only two out of eight NSDTRs with acute SRMA had IgA concentrations over the reference value, apart from previous studies where high IgA concentrations have been observed in most dogs with acute SRMA. One can speculate if NSDTR have a genetically different form of SRMA than other breeds.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

FÖRKORTNINGSLISTA.....	1
INLEDNING.....	2
Bakgrund.....	2
Tollare.....	2
Schäfer.....	3
Syfte.....	3
Frågeställning.....	3
LITTERATURÖVERSIKT.....	3
Autoimmunitet.....	3
SLE och SLE-relaterade sjukdomar.....	4
IMRD.....	7
IgA-brist.....	8
SRMA.....	8
Tollare.....	10
MATERIAL OCH METODER.....	10
ANA, immunodiffusion.....	10
Studiepopulation.....	10
IIF-ANA.....	11
Immunodiffusion.....	11
IgA.....	13
Studiepopulation.....	13
ELISA.....	14
Statistisk analys.....	14
RESULTAT.....	14
ANA, immunodiffusion.....	15
IgA.....	17
Schäfer.....	17
Tollare.....	18
Extern analys.....	19
DISKUSSION.....	20
ANA, immunodiffusion.....	20
Jämförelse av immunodiffusion, ELISA och LIA.....	21
IgA.....	23
KONKLUSION.....	24
TACK.....	25
LITTERATURFÖRTECKNING.....	26

FÖRKORTNINGSLISTA

ANA	antikukleära antikroppar
CRP	C-reaktivt protein
CSF	cerebrospinalvätska
DLA	”dog leukocyte antigen”
dsDNA	dubbelsträngat DNA (deoxiribonukleinsyra)
ELISA	”enzyme-linked immunosorbent assay”
ENA	extraherbara nukleära antigen
HEp-2	humana epitelceller typ 2
hnRNP-G	heterogent kärnribonukleoprotein G
IgA	immunoglobulin A
IIF	indirekt immunofluorescens
LIA	”line immunoassay”
IMRD	immunmedierad reumatisk artrit
MHC	”major histocompatibility complex”
RNP	ribonukleoprotein
SLE	systemisk lupus erythematosus
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
Sm	Smith’s antigen
SRMA	steroid-responsiv meningit arterit
SSA	Sjögrens syndrom A
SSB	Sjögrens syndrom B

INLEDNING

Bakgrund

Immunmedierade sjukdomar uppkommer när immunsystemet skadar kroppen på grund av defekt eller efter felaktig aktivering. De tre huvudsakliga grupperna av immunmedierade sjukdomar är: autoimmunitet, immunbristsjukdomar och allergiska reaktioner. Vissa raser är mer utsatta för immunmedierade sjukdomar än andra (Tizard, 2013; Nelson & Couto, 2014). Nova scotia duck tolling retriever (tollare) och tysk schäferhund (schäfer) är två raser som är påtagligt överrepresenterade för just vissa immunmedierade sjukdomar (Vilson *et al.*, 2013; Bremer *et al.*, 2015a).

Tollare

I en studie av Bremer *et al.* (2015a), som baserades på försäkringsstatistik, såg man att tollare totalt sett har en något ökad sjukdomsrisk jämfört med alla andra raser sammanlagt och en likvärdig risk med övriga retrieverraser. Tollarna är påtagligt predisponerade för den immunmedierade sjukdomen autoimmun reumatisk sjukdom och även för en viss form av hjärnhinneinflammation, så kallad steroid-responsiv meningit arterit (SRMA) (Anfinsen *et al.*, 2008; Bremer *et al.*, 2015a).

Enligt försäkringsstatistik är ”hälta” den vanligaste diagnostiska koden som registreras hos rasen. Diagnosen ”smärta/stelhet” förekommer knappt tre gånger oftare hos tollare jämfört med övriga raser sammanlagt. De diagnostiska koder som används i journalsystem och som även registreras av försäkringsbolagen är ofta relativt ospecifika. Detta medför att det kan vara svårt att beräkna en exakt förekomst av sjukdomar som kan placeras under mycket övergripande diagnoskoder eller som kan rymmas under flera tänkbara underrubriker. Immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD, efter engelskans ”immune mediated rheumatic disease”) är exempel på en sjukdom som kan registreras under många olika diagnoskoder såsom ”hälta”, ”generell smärta/stelhet”, ”tecken på smärta från specifik led”, ”tecken på autoimmun sjukdom” och så vidare. Att incidensen för IMRD är högre hos tollare jämfört med övriga raser har dock konstaterats (Bremer *et al.*, 2015a).

Diagnoskoden ”neurologisk infektion/inflammation” är också vanligare hos tollare jämfört med övriga raser. Hos försäkrade tollare är meningit cirka 12 gånger vanligare jämfört med alla andra raser sammanlagt. Största andelen meningiter förmodas utgöras av SRMA då det sedan tidigare är känt att tollare är överrepresenterade för SRMA. Försäkringsstatistiken är dessutom baserad på unga individer vilka är de som i första hand drabbas av SRMA (Anfinsen *et al.*, 2008; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013; Bremer *et al.*, 2015a).

I en studie som undersökte serumkoncentrationerna av immunoglobulin A (IgA) hos hund kunde man hos tollare påvisa en generellt lägre IgA-koncentration jämfört med de flesta andra raser (Olsson *et al.*, 2014). Hos hundar, av olika raser, med akut SRMA har flera studier istället visat på förhöjda IgA-koncentrationer i serum (Tipold & Jaggy, 1994; Tipold, 1995; Maiolini *et al.*, 2012).

Schäfer

Vilson *et al.* (2013) visade att schäfer är en av de vanligaste raserna att drabbas av immunmedierade sjukdomar. Systemisk lupus erythematosus, en autoimmun sjukdom som ofta påverkar leder och hud, är mer förekommande hos schäfer jämfört med andra raser (Fournel *et al.*, 1992; Nelson & Couto, 2014). Hudproblem är schäferns vanligaste problem vilket är nästan dubbelt så vanligt hos schäfer som hos övriga raser sammanlagt. Schäfer är klart överrepresenterade för cirkumanalfistlar, atopi och pyodermi. Exokrin pancreasinsufficiens drabbar också rasen i kraftigt ökad utsträckning jämfört med övriga raser (Vilson *et al.*, 2013). Schäfer har i flera studier visat sig ha låga IgA-koncentrationer i serum. Individer med atopisk dermatit eller exokrin pancreasinsufficiens har dessutom visat sig ha en signifikant lägre IgA-koncentration jämfört med kliniskt friska schäfrar (Batt *et al.*, 1991; Olsson *et al.*, 2014).

Syfte

Studien är uppdelad på två delstudier - undersökning av antinukleära antikroppar (ANA) respektive IgA.

Första delstudiens syfte var att, med hjälp av immunodiffusion, undersöka vilka ANA-specificiteter som förekommer hos schäfer och hos tollare med misstänkt systemisk autoimmun sjukdom med förhoppningen att detektion av specifika ANA i framtiden kan bidra till en förbättrad diagnostik av olika systemiska autoimmuna sjukdomar.

Den andra delstudiens syfte var att analysera IgA-koncentrationerna i serum hos kliniskt friska schäfrar och tollare för att undersöka om dessa raser har en lägre IgA-koncentration i serum jämfört med andra raser. Ytterligare ett syfte var att undersöka om IgA-koncentrationen skiljer sig mellan friska tollare och tollare med SRMA eller IMRD samt om tollare med SRMA har en högre IgA-koncentration i serum jämfört med friska hundar.

Frågeställning

- Vilken ANA-specificitet kan identifieras hos tollare och schäfer med immunodiffusion och skiljer det sig mellan raserna?
- Har friska tollare och schäfrar någon påvisbar skillnad av IgA-koncentration i serum jämfört med andra raser?
- Har tollare med SRMA en högre IgA-koncentration i serum jämfört med friska hundar och jämfört med andra raser med SRMA?

LITTERATURÖVERSIKT

Autoimmunitet

Autoimmunitet kan uppkomma genom ett onormalt immunförsvars reaktion mot ett normalt antigen eller genom ett normalt immunförsvars reaktion mot ett ovanligt eller onormalt antigen. Ålder, kön, tumörer, infektioner, vacciner, läkemedel, gifter och framför allt genetisk bakgrund har framförts som tänkbara orsaker till att påverka benägenheten för utveckling av autoimmunitet. *Anaplasma phagocytophilum* och *Borrelia burgdorferi* är exempel på infektioner som har beskrivits kunna inducera en autoimmun respons (Tizard, 2013; Nelson & Couto, 2014).

Genetiska faktorer uppges ofta vara den avgörande determinanten för om individen är mottaglig för autoimmun sjukdom. Generna för ”major histocompatibility complex” (MHC) tycks ofta vara involverade i utvecklingen av autoimmuna sjukdomar eftersom det krävs att ett antigen har presenterats på MHC-molekyler för att trigga det förvärvade immunförsvaret. Vissa MHC-alleler skyddar mot sjukdom och andra alleler gör motsatsen. ”Dog leukocyte antigen” (DLA) är ett samlingsnamn för alla hundens proteiner som kodas av MHC-gener. Förutom MHC-generna finns även flertalet andra gener kopplat till autoimmuna sjukdomar och i de flesta fall är det troligen ett samspel mellan alla dessa olika gener tillsammans med yttre faktorer som avgör mottagligheten för autoimmun sjukdom (Teichner *et al.*, 1990; Wilbe *et al.*, 2009; Wilbe *et al.*, 2015; Tizard, 2013; Nelson & Couto, 2014).

Autoimmunitet kan medieras av både T- och/eller B-celler. All autoimmunitet är inte dåligt, vissa autoantikroppar finns normalt; till exempel mot erythrocyter som är gamla och ska tas ur bruk. Autoimmunitet kan uppkomma när tidigare gömda autoantigen möter icke toleranta T-celler. För att sjukdom ska uppstå måste den autoimmuna responsen vara ihållande. En annan teori till autoimmunitet är att reglerande T-celler inte fungerar normalt varvid immunförsvaret blir överaktivt. T-celler med potentiell risk för autoimmunitet genomgår normalt apoptos men vid autoimmun sjukdom tycks detta kontrollsystem inte fungera (Tizard, 2013).

Autoimmuna sjukdomar har beskrivits kunna förekomma tillsammans med lymfoida tumörer. Många lymfoida tumörer uppkommer när immunologiska kontrollmekanismer inte fungerar korrekt. Till exempel skulle en kvarhållen stimulering av autoantigen eventuellt kunna leda till lymfoida tumörer (Tizard, 2013). Hos tollare, som tidigare visat sig vara överrepresenterade för både autoimmun reumatisk sjukdom och lymfom, har dock inget samband mellan dessa sjukdomskomplex ännu påvisats. Inte heller har något samband påvisats mellan lymfom och SRMA - som tollare också är överrepresenterade för (Anfinsen *et al.*, 2008; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013; Bremer *et al.*, 2015a).

SLE och SLE-relaterade sjukdomar

Systemisk lupus erythematosus (SLE) är en systemisk autoimmun sjukdom som karakteriseras av immunmedierad vävnadsskada med inblandning av flera organsystem genom typ II, typ III, och ibland även typ IV överkänslighetsreaktioner. Sjukdomen är som regel kronisk med akuta perioder men den kan också vara subakut. SLE finns beskriven hos människa, andra primater, hund, katt, häst och mus (Chabanne *et al.*, 1999; Tizard, 2013; Nelson & Couto, 2014).

Sjukdomen är ärftlig och raspre disposition förekommer. Som regel är det medelstora till stora hundraser som insjuknar; mycket stora och små hundraser tycks drabbas mer sällan. Schäfer, collie, shetland sheepdog, beagle och pudel är några raser som anses överrepresenterade (Fournel *et al.*, 1992; Nelson & Couto, 2014). Sjukdomsincidensen anses vara likvärdig för hanar som för tikar (Nelson & Couto, 2014) eller till och med högre hos hanar (Fournel *et al.*, 1992), till skillnad från människa där SLE är mer förekommande bland kvinnor. Hos schäfrar har hanar en uppmärksammas högre incidens (Fournel *et al.*, 1992; Vilson *et al.*, 2013). SLE kan drabba hundar i alla åldrar även om debut i medelåldern tycks vara vanligast (Fournel *et al.*, 1992; Nelson & Couto, 2014). Studier har visat att hundar med MHC-genen DLA-A7 har en ökad risk för SLE medan hundar med DLA-A1 och DLA-B5 istället har minskad risk

(Teichner *et al.*, 1990). Det finns också starka bevis för att MHC klass II är en betydande genetisk riskfaktor för IMRD. Tollare som är homozygota för haplotypen DLA-DRB1*00601/DQA1*005011/DQB1*02001 har en ökad risk för IMRD (Wilbe *et al.*, 2009). Ytterligare elva gener med flera riskhaplotyper har dock identifierats hos tollare med IMRD och troligen är det ett samspel mellan alla dessa gener tillsammans med miljöfaktorer som avgör mottagligheten för sjukdomen (Wilbe *et al.*, 2015).

Kliniska fynd

Då SLE är en sjukdom som påverkar flera organsystem kan en uppsjö av kliniska fynd ses vid sjukdomen eftersom de varierar med vilka organsystem som är påverkade. Vanligt förekommande kliniska fynd är intermittent feber och icke-erosiv polyartrit. Leder som ofta anses vara drabbade vid polyartrit är: karpus, armbågar, haser, knän, kotpelarens fasettleder och käkleden. Andra fynd som kan förekomma är polymyosit, njurproblem samt hudåkommor. Alopeci, dermatit, erytem, ulceration, hyperkeratos och fotosensibilitet är exempel på uppmärksammade hudåkommor vid sjukdomen. Ulcerationer i munslemhinnan är relativt ovanligt men kan också ses vid SLE. Hematologiska förändringar som kan förekomma är till exempel leukocytos men också leukopeni, lymfopeni, trombocytopeni och hemolytisk anemi förekommer. Likaså har polyadenopati och splenomegali beskrivits. Mer sällan ses pleuroperikardit, pneumoni, polyneurit och centralnervösa symtom (Fournel *et al.*, 1992; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009; Nelson & Couto, 2014).

Diagnos

För att ställa diagnosen ”äkta SLE” bör man hos misstänkta hundar identifiera en autoimmun reaktion från flera olika organ (Nelson & Couto, 2014). Hos både hund och människa har man dock sett olika varianter av SLE där de kliniska tecknen tycks involvera färre organsystem och då ofta med problem framför allt från rörelseapparaten. Dessa SLE-varianter kallas ofta för SLE-relaterade sjukdomar. IMRD är ett exempel på SLE-relaterad sjukdom (Hansson-Hamlin *et al.*, 2006; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009; Wilbe *et al.*, 2009).

Det finns ingen fastställd kriterielista för diagnosställande av ”äkta SLE” hos hund som det gör för människa där vissa kriterier måste uppfyllas för att personen ska diagnostiseras med SLE (Tan *et al.*, 1982). Flera författare har dock kommit med olika förslag vilket sammantaget kan beskrivas som att hunden bör ha kliniska fynd från flera organsystem. Återkommande förslag på kliniska fynd är: icke-erosiv polyartrit, hudlesioner, njurproblem, hematologiska avvikelser och ett positivt ANA-test (Chabanne *et al.*, 1999; Smee *et al.*, 2007; Tizard, 2013).

ANA

En sensitiv markör för både SLE och SLE-relaterade sjukdomar hos hund är en hög ANA-titer (Fournel *et al.*, 1992; Hansson-Hamlin *et al.*, 2006). ANA är en heterogen grupp antikroppar mot antigen i cellkärnan. Dessa autoantikroppar kan bilda immunkomplex, tillsammans med fritt antigen, vilka uppges kunna deponeras i exempelvis njurar där de leder till en membranös glomerulinfrit eller i ledvätska där de stimulerar till artrit. Framför allt vid ”äkta SLE” kan det även bildas autoantikroppar mot annat än nukleärfragment, till exempel mot erythrocyter vilket kan resultera i en immunmedierad hemolytisk anemi (Tizard, 2013).

Standardmetoden för att påvisa ANA är indirekt immunofluorescens (IIF). Sensitiviteten för testet varierar mellan studier, framför allt beroende på valda inklusionskriterier för diagnosställandet (Fournel *et al.*, 1992; White *et al.*, 1992). Det är viktigt att hunden uppvisar klinisk misstanke på SLE eller SLE-relaterad sjukdom när man analyserar ANA eftersom det även förekommer hos till synes friska hundar men då i en mycket lägre frekvens och oftast i låga serumkoncentrationer (Monier *et al.*, 1992; Smees *et al.*, 2007).

Tollare och schäfer utgjorde 19 % respektive 5 % av serumproverna inskickade till Universitetsdjursjukhuset, Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) för analys av IIF-ANA under tidsperioden januari 2013 till oktober 2016. Av totala antalet positiva IIF-ANA prover under samma tidsperiod var knappt 30 % tollare och drygt 10 % schäfrar (Lilliehöök I., Sveriges lantbruksuniversitet, pers. medd., 2016). Dessa siffror ligger inte i enlighet med rasernas storlek gentemot totalpopulationen. Av hundar (upp till tio års ålder) som är registrerade i Svenska Kennelklubbens ägarregister DjurID.se (2016-11-07) är 0,8 % tollare och 3,7 % schäfrar. Enligt Agria's försäkringsstatistik utgör tollare och schäfer 0,6 % respektive 7,3 % av totala antalet försäkrade hundar (Vilson *et al.*, 2013; Bremer *et al.*, 2015a). Många tollarprover skickas till Universitetsdjursjukhuset, SLU, för att delta i det så kallade Tollarprojektet varför siffran för inskickade tollarprover inte är representativ. Att tollare och schäfer tillsammans utgör cirka 40 % av positiva IIF-ANA prover är dock en tydlig överrepresentation.

Vid många laboratorier har man numera övergått till att använda humana epitelceller typ 2 (HEp-2) istället för råttlever som substrat vid IIF-ANA analys vilket har medfört färre falskt positiva utslag. Det har också inneburit att det har blivit lättare att bedöma fluorescensmönster och att resultaten blivit mer konsekventa (Hansson *et al.*, 1996). Flera olika grupper av fluorescensmönster finns beskrivet hos människa. Hos hund delas fluorescensmönstren huvudsakligen in i homogent (med kromosomreaktivitet) respektive kornigt (utan kromosomreaktivitet). Monier *et al.* (1992) visade att 37 % av individerna med SLE uppvisade ett homogent mönster och 26 % av individerna med trolig SLE. Andra studier gjorda på ANA-positiva hundar med systemisk autoimmun sjukdom (inte bara SLE) visade att 83 % respektive 75 % hade ett kornigt fluorescensmönster medan resterande 17 % respektive 25 % var homogent (Hansson *et al.*, 1996; Hansson-Hamlin *et al.*, 2006). Dessa studier indikerar att individer med SLE oftare har ett homogent mönster jämfört med individer med SLE-relaterad sjukdom som oftast uppvisar ett kornigt mönster (Monier *et al.*, 1992; Hansson *et al.*, 1996; Hansson-Hamlin *et al.*, 2006).

Vissa IIF-mönster kan förknippas med specifika ANA. Antikroppar riktade mot kromosomer ses oftast vid ett homogent fluorescensmönster medan ett kornigt mönster ofta associeras med extraherbara nukleära antikroppar (ENA) (Bremer *et al.*, 2015b). Hos människa har också fluorescensmönster och specifika ANA kunnat sammankopplas med olika autoimmuna sjukdomar (von Mühlen & Tan, 1995).

Ett antal olika subspecificiteter av ANA har påvisats hos hundar med SLE och SLE-relaterade sjukdomar. Främst har antikroppar riktade mot histoner, dubbelsträngat DNA (dsDNA), ribonukleoprotein (RNP), Smith's antigen (Sm) Sjögrens syndrom A (SSA), Sjögrens syndrom B (SSB) och heterogent kärnribonukleoprotein G (hnRNP-G) associerats med dessa sjukdomar tillsammans med antikroppar mot ett oidentifierat antigen, det så kallade anti-typ-2 antigenet.

Även antikroppar mot Scl-70 och Jo-1 har påvisats hos hund med systemisk reumatisk sjukdom (Soulard *et al.*, 1991; Fournel *et al.*, 1992; Monier *et al.*, 1992; White *et al.*, 1992; Bremer *et al.*, 2015b).

Anti-dsDNA förekommer hos de flesta människor med en SLE-diagnos. Anti-Sm förekommer också hos människor med SLE men är inte lika vanligt. Antikroppar mot dsDNA och Sm anges ha en mycket hög specificitet för sjukdomen. Även ANA mot histoner och RNP kan ses i en hög grad av SLE-fall hos människa. Anti-SSA och anti-SSB är hos människa starkt associerat med Sjögrens syndrom (en systemisk reumatisk sjukdom) men förekommer även vid kutan och neonatal lupus. Scl-70 ses framför allt hos vissa människor med systemisk skleros medan Jo-1 kan ses hos människor med polymyosit (von Mühlen & Tan, 1995).

Behandling och prognos

Behandling av systemiskt autoimmuna sjukdomar går ut på att dämpa immunförsvaret med immunosuppressiva läkemedel. Den vanligaste behandlingen vid SLE och SLE-relaterade sjukdomar är kortikosteroider (prednisolon), ofta med startdosen 1-3 mg/kg kroppsvikt. Kortikosteroider har en positiv effekt under behandlingstiden men återfall av SLE är inte ovanligt under eller efter avslutad behandling. Livslång behandling är ofta nödvändig; dosen sänks då successivt till lägsta effektiva dos. Vid allvarliga fall av sjukdomen och/eller då hög dos kortison krävs för symtomlindring är prognosen ofta sämre. Kortikosteroider kombineras (eller ersätts) ibland med andra immunomodulerande läkemedel. Ett sådant alternativ som ibland används är läkemedlet azathioprin. Förutom kortikosteroider och annan immunsupprimerande och immunmodulerande behandling kan symptomatisk behandling vara aktuell (Chabanne *et al.*, 1999; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009).

IMRD

En typ av SLE-relaterad sjukdom som identifierats hos bland annat tollare är så kallad IMRD. Medianåldern hos tollare som diagnostiseras med IMRD är tre år men är observerad hos tollare från 10 månader upp till 11 år. Sjukdomstecken uppträder som regel vid ett till fem års ålder (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009). IMRD hos tollare har visat sig vara vanligare hos tikar enligt försäkringsstatistik (Bremer *et al.*, 2015a) medan en annan studie inte visade någon könspre disposition (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009). Som tidigare nämnts har flera olika riskgener identifierats hos tollare med IMRD (Wilbe *et al.*, 2009; Wilbe *et al.*, 2015). Prevalensen av antikroppar mot *Anaplasma phagocytophilum* och *Borrelia burgdorferi*, infektioner som potentiellt skulle kunna stimulera autoimmuna reaktioner, har inte visat sig vara högre hos tollare jämfört med den generella hundpopulationen i Sverige (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009; Nelson & Couto, 2014).

De vanligaste kliniska fynden vid IMRD är kronisk ledsmärta med härla och stelhet vilken är mest framträdande efter vila och avtar med fysisk aktivitet. Ledsmärtan, som varierar i intensitet, vandrar ofta mellan olika leder och ben. Specifika leder kan vara smärtsamma vid palpation men är som regel inte svullna. Karpus, haser, armbågar och knän är mest drabbade. De fall av tollare med IMRD som har undersökts radiologiskt har inte uppvisat ett patologiskt utseende på lederna vilket talar för en icke-erosiv artrit. Både diffus och mer tydligt lokaliserad muskelsmärta är också relativt vanligt förekommande. Andra förekommande symptom är feber

och hudlesioner. Ospecifika krutor på öronlappen och nosryggen, ulcerationer i gingiva samt vitiligo är några av de dokumenterade hudförändringarna (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009).

Tidigare undersökningar avseende blod- och urinanalys har visat att tollare med symtom på IMRD har ett signifikant högre fibrinogen och α_2 -globulin än friska tollare samt ett lägre lymfocytantal. Dessa värden låg dock fortfarande inom referensintervallet. Övriga blodparametrar (hematologi, kreatinin, aspartataminotransferas, gallsyror, totalprotein, albumin, α_1 -globulin, β_1 -globulin, β_2 -globulin, γ -globulin) samt urinanalyser visade inga signifikanta fynd (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009).

Ungefär 70 % av tollare med kliniska tecken som talar för IMRD uppges vara ANA-positiva. Omkring 60 % av dessa uppvisar ett kornigt fluorescensmönster och hos resterande 40 % ses ett homogent mönster. Ingen association mellan fluorescensmönster och kliniska symtom eller behandlingsresultat har påvisats (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009).

Tollare med IMRD behandlas vanligen med kortikosteroider (prednisolon). I en studie försvann symtomen nästan helt hos 65 % av tollarna på en låg dos prednisolon ($\leq 0,5$ mg/kg varannan dag). Drygt 10 % krävde en högre dos för tillräcklig förbättring av symtomen och 20 % avlivades till följd av dåligt behandlingsvar. Vid behandling med NSAID har man sett lindrig-måttlig förbättring av kliniska tecken - åtminstone under en begränsad period. Ofta behöver man dock på sikt gå över till kortikosteroider (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009).

IgA-brist

Det första skyddet mot mikroorganismer är fysiska barriärer som hud och slemhinnor. Under dessa finns plasmaceller som producerar IgA. Dessa antikroppar skyddar genom att neutralisera antigen och förhindra att mikroorganismer får fäste (Tizard, 2013). Brist på IgA är människans vanligaste primära immunbristsjukdom och har kopplats ihop med bland annat återkommande infektioner och olika immunmedierade sjukdomar såsom allergi och autoimmun sjukdom. Hos människa definieras det som en brist om IgA-koncentrationen i serum understiger 0,07 g/l (Yel, 2010). Även hos hund har låga serumkoncentrationer sammankopplats med återkommande infektioner och immunmedierad sjukdom (Felsburg *et al.*, 1985; Day, 1996).

Ingen könsskillnad eller skillnad mellan kastrerade och intakta hundar verkar finnas, däremot varierar IgA-koncentrationen mellan raser. Shar-Pei, hovawart, norsk älghund, tollare, bullterrier, schäfer, golden retriever och labrador retriever är några raser där mer än 10 % av individerna enligt en studie uppges ha serumkoncentrationer under 0,07 g/l vilket är gränsvärdet för människa (Olsson *et al.*, 2014; Yel, 2010). För hund finns inget sådant fastställt gränsvärde för IgA-brist men 0,15 g/l har föreslagits av flera författare (Rivas *et al.*, 1995; Day, 1999). Det är visat att IgA-koncentration är direkt korrelerad till ålder i och med att man hos yngre individer har påvisat lägre koncentrationer. Stabilisering tycks ske omkring ett års ålder (Felsburg *et al.*, 1985; Olsson *et al.*, 2014).

SRMA

Framst unga hundar drabbas av SRMA. Sjukdomsdebut är vanligast vid 6-18 månaders ålder men har observerats hos hundar från fyra månader. Sjukdomen anses dock ovanlig hos individer

över fem år. Det finns ingen könsskillnad i incidens; SRMA är beskrivet som lika vanlig hos hanar som hos tikar. Boxer, berner sennenhund, beagle, weimaraner och tollare är raser som anses överrepresenterade (Tipold & Jaggy, 1994; Tipold, 1995; Anfinson *et al.*, 2008; Maiolini *et al.*, 2012; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013; Bremer *et al.*, 2015a).

Kliniska fynd

SRMA har vanligen ett akut förlopp med kliniska fynd som innefattar feber, nacksmärta, hyperestesi och stel gång. Andra, mindre vanliga, neurologiska fynd är nedsatt proprioception, påverkan på kranialnerv, myoklonus samt hyper- och hyporeflexi. Vid hematologisk undersökning ses ofta en leukocytos, vanligtvis tillsammans med neutrofil och vänsterförskjutning men även en helt normal blodbild förekommer. Akutfasproteinet C-reaktivt protein (CRP) stiger vanligen i det akuta skedet av sjukdomen. I cerebrospinalvätska (CSF, enligt engelskans "cerebrospinal fluid") har de flesta individer en måttlig-kraftig pleiocytos samt måttligt-kraftigt förhöjd proteinkoncentration (Tipold & Jaggy, 1994; Tipold, 1995; Bathen-Noethen *et al.*, 2008; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013).

I flera studier har man observerat förhöjda IgA-koncentrationer i serum och/eller i CSF hos merparten av undersökta hundar med SRMA. En ökad IgA-koncentration i CSF kan även ses vid andra inflammatoriska tillstånd i centrala nervsystemet. Hundar med SRMA har visat sig ha en signifikant högre IgA-koncentration i serum jämfört med andra vanliga sjukdomar som drabbar centrala nervsystemet varför analys av CSF och serum gärna kombineras vid diagnosställande. I en studie hade drygt 90 % av hundarna med obehandlad SRMA förhöjda IgA-koncentrationer i både CSF och serum (Tipold & Jaggy, 1994; Tipold, 1995; Maiolini *et al.*, 2012).

Maiolini *et al.* (2012) visade att medianen för IgA-koncentrationen i CSF var 2,5 mg/l hos 145 stycken hundar av olika raser med SRMA. Dessa hade ett intervall på 0,26-52,2 mg/l. I serum var medianen 0,25 g/l och intervallet 0,08-1,48 g/l. Högst IgA-koncentrationer i serum och CSF har påvisats hos individer med obehandlad SRMA jämfört med individer under behandling och individer med återfall av sjukdomen. Serumkoncentrationen av IgA har dock visat sig vara förhöjd även hos individer under behandling (Maiolini *et al.*, 2012).

Diagnos, behandling och prognos

SRMA är som namnet antyder en aseptisk inflammation i meninger och kärl som svarar på behandling med kortikosteroider. Diagnos ställs på kliniska tecken samt fynd vid hematologi och analys av CSF. SRMA behandlas som regel med kortikosteroider. Startdosen är relativt hög (ofta 2-4 mg/kg) men sänks vanligen redan efter några dagar. Behandlingssvaret är ofta bra med total regression av symtom inom några dagar. När de kliniska tecknen på meningit har försvunnit sänks kortisondosen långsamt till en jämförelsevis låg dos. Rekommendationen är vanligen att behandlingstiden inte bör understiga cirka sex månader totalt sett. Regression av sjukdomen kan följas upp med exempelvis symtombild och serum-CRP. IgA-koncentration kan dock inte användas för att övervaka regression eftersom den vanligen inte sjunker nämnvärt under behandlingstiden. Återfall av sjukdomen i unga år är mycket vanligt (Bathen-Noethen *et al.*, 2008; Tipold & Schatzberg, 2010; Maiolini *et al.*, 2012; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013).

Tollare

Tollare med SRMA uppvisar vanligen typiska symtom på sjukdomen med kraftig akut nacksmärta, feber, letargi, anorexi och stelhet. Symtomdebut är vanligen mellan 4 och 24 månaders ålder; medianålder 7 månader (Anfinsen *et al.*, 2008; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013). Ingen skillnad i incidens mellan könen har påvisats (Bremer *et al.*, 2015a). Starka indikationer finns för att genetiska faktorer har av betydande roll för utvecklingen SRMA hos tollare (Anfinsen *et al.*, 2008; Wilbe *et al.*, 2015). Antikroppar mot *Anaplasma phagocytophilum* och *Borrelia burgdorferi* har analyserats hos tio tollare med SRMA där samtliga resultat var negativa (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013).

I CSF hos akut sjuka tollare (innan behandling) har lindrigt-kraftigt ökat leukocytantal observerats ($24\text{--}3540 \times 10^6/l$, referensvärde $< 10 \times 10^6/l$). Hematologiskt ses mild-måttlig leukocytos och neutrofilie hos drygt 90 % av akut sjuka tollare (innan behandling). Även ett förhöjt CRP-värde har observerats hos akut sjuka tollare med värden mellan 46 och 188 mg/l (referensvärde < 5 mg/l). Återfall av SRMA är vanligt hos tollare (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013).

Tollare med SRMA är vanligen IIF-ANA negativa (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013). Tollare som insjuknar i SRMA eller IMRD drabbas vanligen bara av ena sjukdomen. Det finns dock enstaka exempel på tollare med SRMA som i ett senare skede har utvecklat IMRD. Dessa hundar har varit IIF-ANA negativa när SRMA diagnostiserades men IIF-ANA positiva vid diagnos av IMRD vilket tyder på att ANA-positiviteten hos tollarna är associerade med just IMRD (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009; 2013).

MATERIAL OCH METODER

Studien består av två delar, dels ANA-undersökning genom immunodiffusion och dels analys av IgA-koncentrationer i serum med enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA, efter engelskans ”enzyme-linked immunosorbent assay”).

ANA, immunodiffusion

Studiepopulation

I den här delstudien ingick serumprover från 32 stycken ANA-positiva hundar varav 21 stycken schäfrar, tre tollare, två riesenschnauzer, en golden retriever, en berner sennenhund, en irländsk varghund, en hovawart, en saluki och en bearded collie. Könsfördelningen var 53 % hanar och 47 % tikar. De flesta serumproverna har tagits vid andra kliniker och skickats till Universitetsdjursjukhuset, SLU för IIF-ANA analys. Trots att klinisk data till stor del saknas kan det antas att de inskickade proverna kommer från hundar där en systemisk autoimmun sjukdom misstänkts då ANA efterfrågades. Från ankomst och fram till analysen av IIF-ANA hölls serumproverna frysta (-20°C eller -70°C) och har därefter genomgått upp till fem omfrysningar. De IIF-ANA positiva serumproverna samlades in mellan maj 2002 och juni 2012.

Trettioen av de ANA-positiva proverna ingick i en tidigare studie (Bremer *et al.* 2015b) med syfte att identifiera specifika ANA med andra metoder (ELISA och LIA, efter engelskans ”line immunoassay”) än vad denna studie avser. Ett av de 32 serumproverna utgjordes av en tollare

vilken ingick i en immunodiffusionsundersökning år 2008 (Hamlin H., Sveriges lantbruksuniversitet, pers. medd., 2016, opublicerade data).

Som kontroll ingick serumprover från tio stycken IIF-ANA negativa hundar av tio olika raser (american staffordshire terrier, beagle, boxer, flatcoated retriever, golden retriever, labrador retriever, tollare, ungersk vizla, korthårig vorsteh och welsh springer spaniel). Insamling av ANA-negativa kontrollsera skedde vid blodprovstagning på Universitetsdjursjukhuset, SLU, med djurägarnas godkännande.

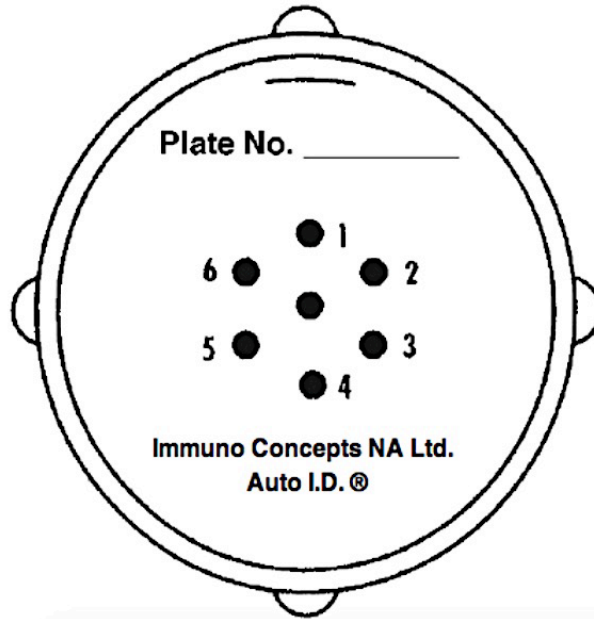
Samtliga medverkande hundar var privatägda. Godkända etiska tillstånd för de aktuella åren har diarienummer C164/99, C75/3, C37/6, C53/9 och C418/12.

IIF-ANA

Serumproverna hade tidigare analyserats för IIF-ANA och konstaterats ANA-positiva vid spädning $\geq 1:100$ (Bremer *et al.*, 2015b). Analysen av proverna utfördes vid Kliniskt kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset, SLU samt Euroimmun (Lübeck, Tyskland) medan de ANA-negativa kontrollproverna endast analyserades vid SLU. Analysen utfördes genom inkubation av serum på objektglas förpreparerade med ett enkelt fixerat lager HEp-2-celler enligt tillverkarens instruktioner (Immuno Concepts, Sacramento, CA, USA samt Euroimmun, Lübeck, Tyskland). Analysmetoden finns beskriven sedan tidigare av Hansson *et al.* (1996). ANA-positiva prover delades in i två grupper beroende på fluorescensmönstret; homogent respektive kornigt enligt tidigare beskrivning (Hansson *et al.*, 1996; Hansson-Hamlin *et al.*, 2006). Endast korniga prover (utan kromosomreaktivitet) inkluderades i den här studien.

Immunodiffusion

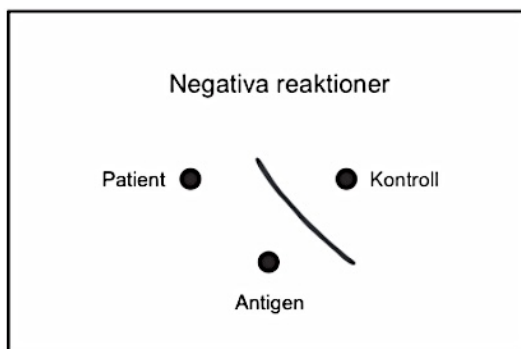
Testsystemet "Auto I.D." som användes för immunodiffusion kommer från Immuno Concepts (Sacramento, USA). Testet är enligt Ouchterlony's princip (Ouchterlony, 1953). Agarospattan har en central mittbrunn och sex omgivande brunnar, se figur 1. I centralbrunnen placerades ENA framställda av Immuno Concepts. I de omgivande brunnarna placerades patientserum eller med testet medföljande positiva kontrollserum med specifika antikroppar. Positiva kontrollantikroppar som användes i den här studien var: anti-RNP/Sm, anti-Sm, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Jo-1 och anti-Scl-70. Plattorna blev avlästa, enligt nedanstående princip, efter 24 och 48 timmars inkubation i rumstemperatur. Vissa serumprover användes bara en gång (då de direkt hade en överensstämmande reaktion med ett annat serumprov) medan andra serumprover användes flera gånger. Serumproverna förvarades fem dygn i kylrum (6 °C) under tiden analysen pågick.



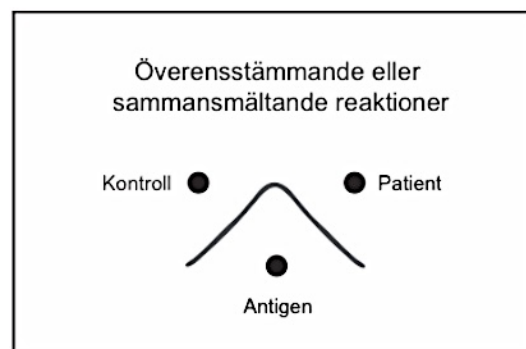
Figur 1. Agarosplattan som användes för immunodiffusionsanalys av ANA (Immuno Concepts, Auto I.D. SSA/Ro och SSB/La autoantikroppsanalys, 2014).

Avläsning

Positiva kontroller med antikroppar mot specifika antigen samt patientserum som innehöll antikroppar mot ENA bildade en fällningslinje mellan provbrunnen och centralbrunnen. Serumprovet betraktades som negativt om ingen fällningslinje bildades (figur 2). Två vid varandra placerade prover (patientserum eller positiva kontrollantikroppar) betraktades som överensstämmande, det vill säga att de hade gemensamma antikroppar mot ENA, om deras fällningslinjer sammansmälte mellan brunnarna (figur 3).



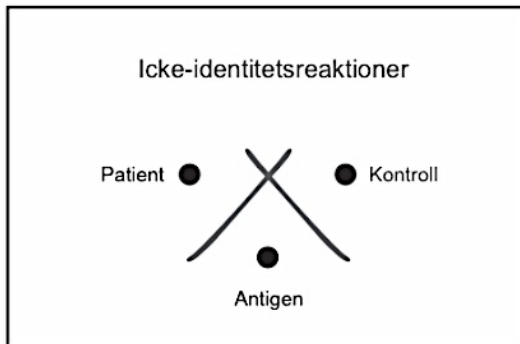
Figur 2. Negativa reaktioner för patientserum samt positiva reaktioner för kontrollantikroppar vid immunodiffusionsanalys (Immuno Concepts, Auto I.D. SSA/Ro och SSB/La autoantikroppsanalys, 2014).



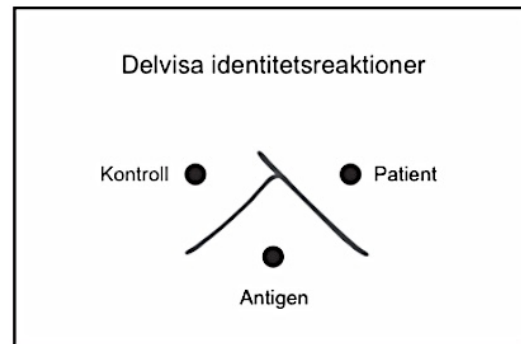
Figur 3. Överensstämmande reaktioner mellan patientserum och kontrollantikroppar vid immunodiffusionsanalys (Immuno Concepts, Auto I.D. SSA/Ro och SSB/La autoantikroppsanalys, 2014).

Två vid varandra placerade serum med icke identiska ENA-antikroppar visade sig som att linjerna korsade varandra (figur 4). En icke-identitetsreaktion betyder alltså att de två serumproverna inte hade någon gemensam antikropp mot ENA. Serumprover som har flera olika ENA-antikroppar kan uppvisa flera fällningslinjer eller bara en. En delvis identitetsreaktion mot närliggande prov sågs om proverna hade både gemensamma och icke

gemensamma antikroppar. Vid en delvis identitetsreaktion sammansmälte linjerna men det bildades också en utlöpare (figur 5). Dessa reaktioner studerades extra noga med avseende på att linjerna verkligen sammansmälte och inte bara korsade varandra vilket hade indikerat en icke-identitetsreaktion.



Figur 4. *Icke-identitetsreaktioner mellan patientserum och kontrollantikroppar vid immunodiffusionsanalys (Immuno Concepts, Auto I.D. SSA/Ro och SSB/La autoantikroppsanalys, 2014).*



Figur 5. *Delvisa identitetsreaktioner mellan patientserum och kontrollantikroppar vid immunodiffusionsanalys (Immuno Concepts, Auto I.D. SSA/Ro och SSB/La autoantikroppsanalys, 2014).*

IgA

Studiepopulation

För analys av IgA ingick totalt 74 hundar. Av dessa var 40 stycken tollare (29 sjuka och 11 friska), 28 stycken friska schäfrar och de övriga tio hundarna (friska kontroller) var alla av olika raser (american staffordshire terrier, beagle, boxer, flatcoated retriever, golden retriever, labrador retriever, patterdale terrier, ungersk vizla, korthårig vorsteh och welsh springer spaniel).

Tjugotvå tollare med SRMA, sju med IMRD och elva friska tollare ingick i delstudien. Tolv tollare var diagnostiserade som akut sjuka i SRMA och hade inte fått behandling innan blodprovstagning medan tio stycken var behandlade för sin SRMA innan provtagning. De flesta serumproverna från sjuka tollare hade tagits vid andra kliniker och skickats till Universitetsdjursjukhuset, SLU inom ramen för det så kallade Tollarprojektet. Tollarna diagnostiserades med SRMA efter att de uppvisat kliniska tecken som akut nacksmärta, stelhet, feber, nedstämdhet och anorexi tillsammans med hematologiska fynd i enlighet med sjukdomen. Tollarna med IMRD diagnostiserades vid SLU efter symtom från rörelseapparaten som indikerade en systemisk reumatisk sjukdom - mer specifikt stelhet och smärta från minst två extremitetsleder i minst 14 dagar.

Åldern på tollarna med SRMA var fyra månader och uppåt. Nio tollare med SRMA var under ett år. Tollarna med IMRD och friska tollare var alla över ett år. Av tollarna var 25 stycken (63 %) hanar och 15 stycken (37 %) tikar. Tre schäfrar var sju veckor gamla och resterande schäfrar var över ett år. Av schäfrarna var 12 stycken hanar, 13 stycken tikar och för de tre individerna som var sju veckor saknades uppgifter om kön. Dessa tre individer exkluderades från de statistiska beräkningarna till följd av den låga åldern. De friska kontrollhundarna av olika raser var alla över ett år (kön okänt).

Blodprovstagning från friska individer har skett inom ramen för Universitetsdjursjukhuset, SLU. Samtliga hundar var privatägda och blodprovstagning skedde med djurägarnas tillåtelse. Godkända etiska tillstånd har diarienummer C417/12 och C418/12.

ELISA

För analysen av IgA användes ett testkit från Bethyl Laboratories (Texas, USA), ”Dog IgA ELISA Quantitation Set”. Analysen utfördes enligt tillverkarens instruktioner. Kortfattat tillsattes 100 µl utspädd IgA i 0,05 M karbonat-bikarbonat buffert (1:100) i varje brunn på en 96-brunnsplatta som därefter inkuberades i rumstemperatur (20-25°C) i en timme. Plattan sköljdes sedan fem gånger med en sköljlösning (50 mM tris, 0,14 M natriumklorid och 0,05 % tween 20) varpå 200 µl blockerande lösning (50 mM tris, 0,14 M natriumklorid och 1 % BSA) tillsattes i varje brunn. Därefter inkuberades plattan igen i rumstemperatur i 30 minuter och sköljdes sedan fem gånger. Därefter tillsattes 100 µl utspädd serum i brunnarna som inkuberades i rumstemperatur i en timme och sedan sköljdes fem gånger. Efter det tillsattes 100 µl utspädd HRP-detektionsantikropp i varje brunn och inkuberades i rumstemperatur i en timme varpå plattan sköljdes fem gånger. Sedan tillsattes 100 µl TMB-lösning i varje brunn och förvarades i ett mörkt rum vid rumstemperatur i 15 minuter. Därefter tillsattes 100 µl stopplösning (0,18 M H₂SO₄) i varje brunn. Absorbansen mättes slutligen på en ELISA plattläsare vid 450 nm.

Varje individserum analyserades minst tre gånger. Serumproverna är analyserade vid två olika tillfällen. I december 2015 analyserades samtliga 28 schäfrar, åtta stycken sjuka tollare samt fyra stycken kliniskt friska tollare. I april 2016 utfördes analys av 23 sjuka tollare, sju stycken kliniskt friska tollare samt de tio friska kontrollerna av olika raser. Två sjuka tollare analyserades vid båda tillfällena.

Extern IgA-analys

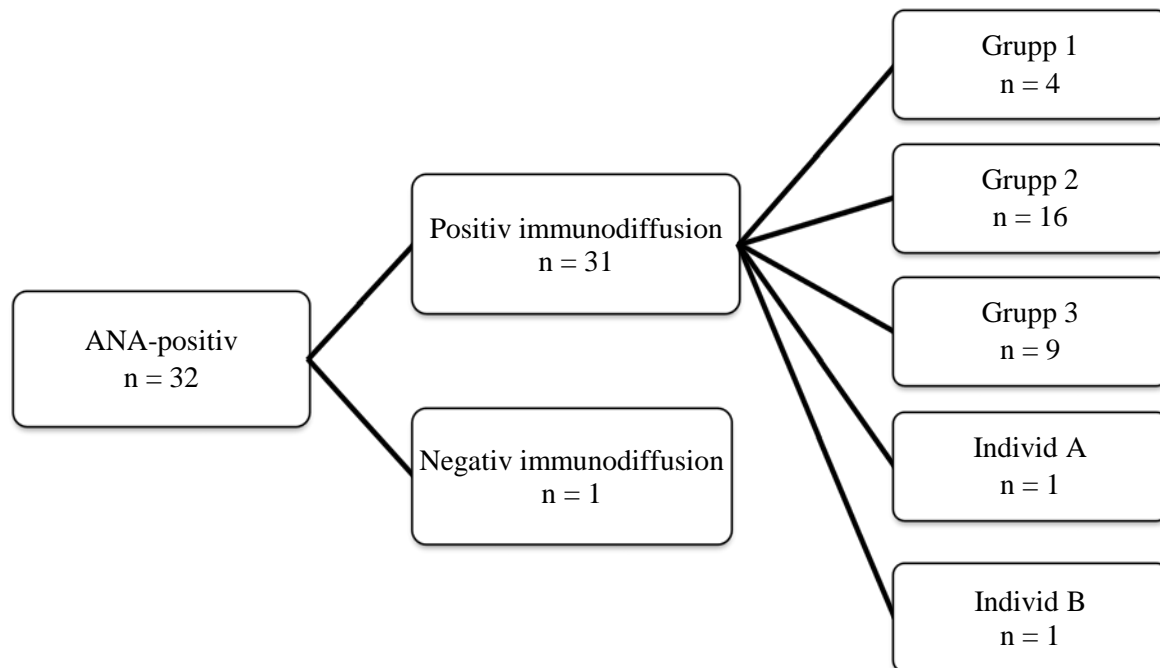
Tjugofem utvalda serum skickades även till Laboklin (Bad Kissingen, Tyskland) för ELISA-IgA analys. Av dessa var åtta stycken tollare med akut obehandlad SRMA (fyra stycken var 4-12 månader och övriga fyra > 1 år), fem stycken tollare med SRMA under behandling (> 10 månader), två tollare med IMRD (> 1 år), fem kliniskt friska tollare (> 1 år) och fem stycken kliniskt friska schäfrar (> 1 år).

Statistisk analys

Ett medelvärde, standardvariation och variationskoefficient räknades ut för varje individ. Medelvärde, standardvariation, variationsvidd, median, kvartilavstånd och ett prediktions konfidensintervall med 95% konfidens räknades ut för: schäfrarna (n=28), friska tollare (n=11), sjuka tollare (n=29), alla tollare med SRMA (n=22), tollare med akut SRMA (n=12), tollare med IMRD (n=7) samt för kontrollerna av olika raser (n=10). Därefter gjordes hypotesprövning med t-test mellan dessa grupper för att påvisa eventuella skillnader av medelvärde. P-värden lägre än 0,05 ansågs som signifikanta (konfidens 95 %).

RESULTAT

ANA, immunodiffusion



Figur 6. Översiktligt immunodiffusionsresultat av ANA-positiva hundar med kornigt mönster på indirekt immunofluorescens. Indelningen av grupp 1-3 samt individ A och B grundar sig på identitetsreaktionerna på immunodiffusionen där individer med överrensstämmande reaktioner placerades tillsammans och individer med icke-identitetsreaktioner placerades i olika grupper.

Av de 32 ANA-positiva serumproverna med kornigt fluorescensmönster bildade 31 stycken fällningslinjer och ansågs därmed positiva på immunodiffusion. Alla tio kontroller var negativa (bildade inga fällningslinjer). Utifrån identitetsreaktionerna kunde 29 stycken placeras i en av tre större grupper där individer med överrensstämmande reaktioner placerades tillsammans och individer med icke-identitetsreaktioner placerades i olika grupper. Samtliga grupper hade icke-identitetsreaktioner mot varandra. Två immunodiffusionspositiva prover hade icke-identitetsreaktioner mot de tre grupperna, samt mot varandra, och benämns här efter som individ A respektive B (figur 6).

Tabell 1. Sammanställning av identitetsreaktioner på immunodiffusion för ANA-positiva hundar med kornigt mönster på indirekt immunofluorescens. Identitetsreaktionerna baseras på respektive grupps

gemensamma fällningslinje. Icke-identitetsreaktioner är angivet som "≠" och överensstämmande reaktioner är angivet som "identitet"

	Grupp 1	Grupp 2	Grupp 3	Individ A	Individ B
Grupp 1	Identitet	≠	≠	≠	≠
Grupp 2	≠	Identitet	≠	≠	≠
Grupp 3	≠	≠	Identitet	≠	≠
Individ A	≠	≠	≠		≠
Individ B	≠	≠	≠	≠	
Anti-RNP/Sm	≠	≠	Identitet	≠	Identitet
Anti-SSA	≠	≠	≠	Identitet	≠
Anti-SSB	≠	≠	≠	Identitet	≠
Anti-Jo-1	≠	≠	≠	≠	≠

Grupp 1 bestod av en schäfer och samtliga tre medverkande tollare. Denna grupp hade icke-identitetsreaktioner mot de positiva kontrollantikropparna anti-RNP/Sm, anti-SSA, anti-SSB och anti-Jo-1 (tabell 1).

Grupp 2 utgjordes enbart av schäfrar. Sexton av 20 stycken immunodiffusionspositiva schäfrar (80 %) hamnade i denna grupp (en schäfer var negativ på immunodiffusion). Sex stycken individer hade en eller två ytterligare, "sekundära", fällningslinjer utöver den gemensamma "grupplinjen" (den som visade överensstämmande reaktion mellan alla individer i gruppen). Hos samtliga individer med sekundära fällningslinjer var dock grupplinjen starkast. Grupplinjen hade icke-identitetsreaktion mot de positiva kontrollantikropparna anti-RNP/Sm, anti-SSA, anti-SSB och anti-Jo-1 (tabell 1). En schäfer med en sekundär fällningslinje hade överensstämmande reaktion med anti-SSA och icke-identitetsreaktioner mot anti-RNP/Sm, anti-SSB och anti-Jo-1. Övriga fem individer med sekundära fällningslinjer testades mot de positiva kontrollantikropparna (anti-RNP/Sm, anti-SSA, anti-SSB, anti-Jo-1 och anti-Sc1-70) men då patientprovernas sekundära fällningslinjer var svaga och otydliga blev resultaten svårtolkade. I gruppen fanns också två individer, som bara tycktes ha en fällningslinje (den gemensamma grupplinjen), med en överensstämmande reaktion med anti-RNP. Detta trots att de specifika individerna visade en överensstämmande reaktion med andra schäfrar i gruppen vilka i sin tur hade icke-identitetsreaktioner mot individer ur grupp 3 (med RNP-reaktivitet).

Grupp 3 bestod av nio hundar; tre schäfrar, två riesenschnauzer, en golden retriever, en berner sennen, en irländsk varghund och en saluki. Individerna i den här gruppen hade överensstämmande reaktion med anti-RNP/Sm och icke-identitetsreaktioner mot anti-SSA, anti-SSB och anti-Jo-1 (tabell 1). En av schäfrarna hade dessutom en sekundär fällningslinje. Denna var dock svag och gick inte att bedöma gentemot de positiva kontrollantikropparna.

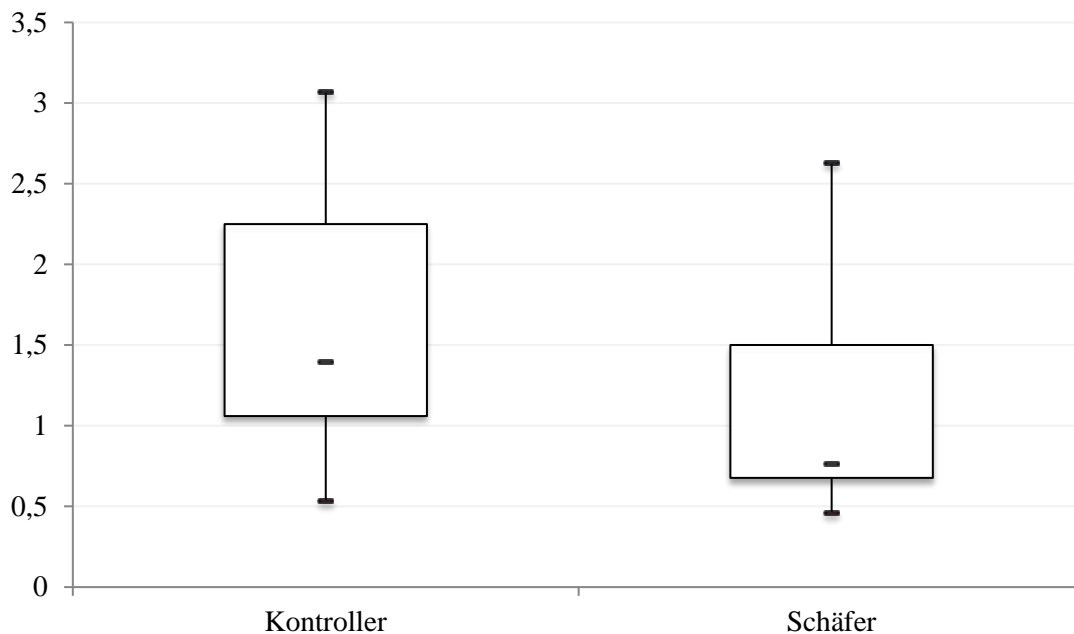
Individ A, en hovawart, hade överensstämmande reaktion med anti-SSA och anti-SSB samt en icke-identitetsreaktion mot anti-Jo-1. Individens tolkades även som negativ för anti-RNP/Sm då den visade icke-identitetsreaktioner mot individer från grupp 3 (tabell 1).

Individ B, en bearded collie, hade överensstämmande reaktion med kontrollantikropparna anti-RNP/Sm. Detta trots att den var testad mot två individer ur grupp 3 och då uppvisat en icke-identitetsreaktion mot dessa. Individens visade icke-identitetsreaktioner mot anti-SSA, anti-SSB och anti-Jo-1 (tabell 1).

Anti-Scl-70 gick inte att tolka för någon individ då dessa positiva kontrollantikroppar gav en mycket svag, knappt synbar, fällningslinje.

IgA

Schäfer



Figur 7. IgA-koncentration i serum (g/l) för friska kontroller av olika raser (n=10) och friska schäfrar (n=25).

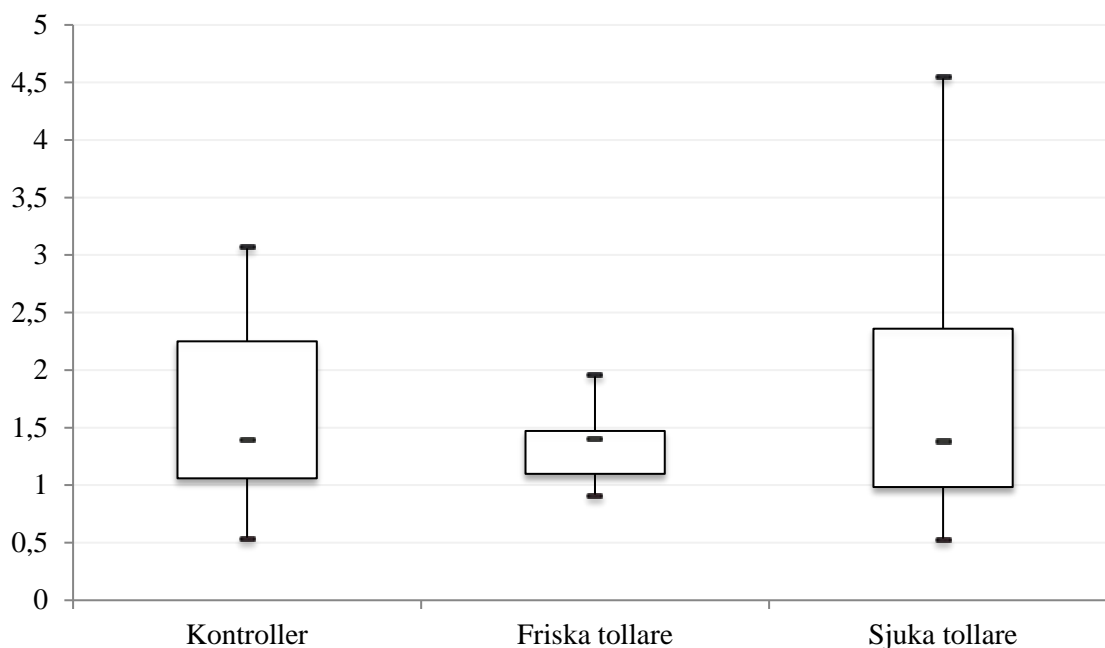
Ett statistiskt signifikant lägre IgA-medelvärde (p-värde 0,03) uppmättes hos de kliniskt friska schäfrarna jämfört med de friska kontrollhundarna av olika raser (tabell 2 och figur 7). Tre schäfrar var exkluderade från dessa resultat på grund av låg ålder (sju veckor). Deras IgA-värden var: 0,539, 0,543 respektive 0,589 g/l. Övriga schäfrar och kontrollhundarna av olika raser var alla över ett års ålder.

Tabell 2. IgA-koncentration i serum (g/l) för friska kontroller av olika raser samt friska schäfrar (95 % konfidens)

	Kontroller (n=10)	Schäfer (n=25)
Medelvärde	1,610	1,060
Variationsvidd	2,537	2,170

Standardavvikelse	0,775	0,617
Konfidensintervall	1,056-2,164	0,805-1,315

Tollare

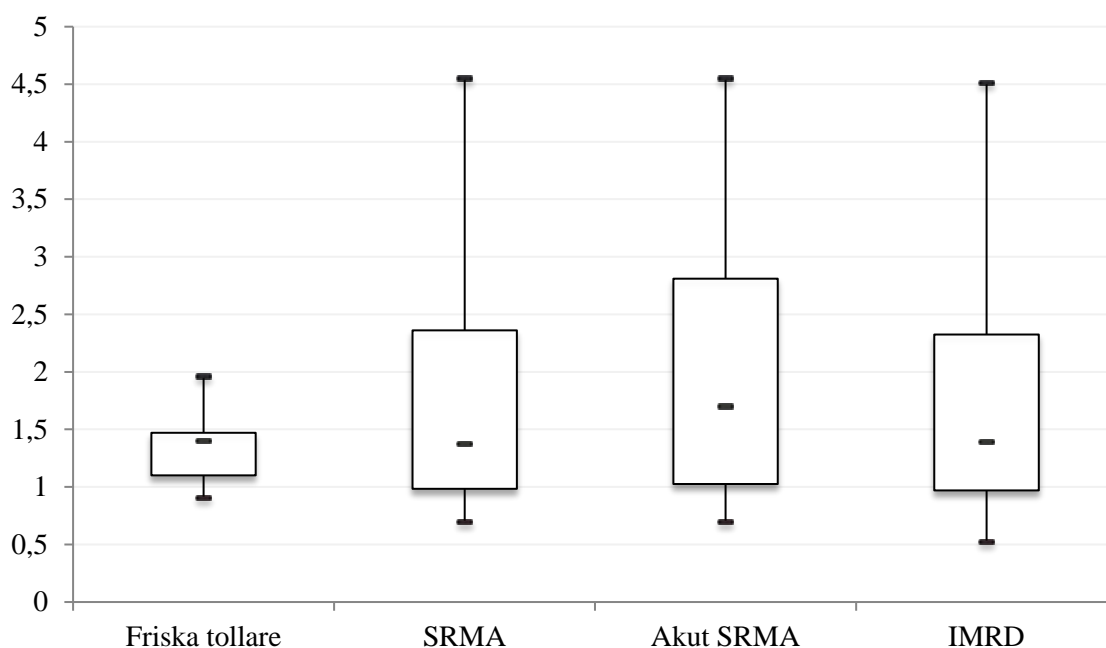


Figur 8. IgA-koncentration i serum (g/l) för friska kontroller av olika raser (n=10), friska tollare (n=10) och sjuka tollare med SRMA eller IMRD (n=29).

En av de kliniskt friska tollarna exkluderades från beräkningarna då den hade en IgA-koncentration som kraftigt översteg resterande friska tollares koncentrationer (5,92 g/l). Ingen statistiskt signifikant skillnad av IgA-medelvärde kunde påvisas mellan friska kontroller av olika raser och de kliniskt friska tollarna eller de sjuka tollarna (SRMA och IMRD). Inte heller vid jämförelse av de friska och sjuka tollarnas medelvärde kunde någon signifikant skillnad påvisas. De sjuka tollarna hade en större variationsvidd jämfört med de friska tollarna och de friska kontrollerna av olika raser (tabell 2 och 3 samt figur 8).

Tabell 3. IgA-koncentration i serum (g/l) för friska och sjuka tollare med SRMA eller IMRD (95 % konfidens)

	Friska tollare (n=10)	Sjuka tollare (n=29)
Medelvärde	1,371	1,788
Variationsvidd	1,053	4,024
Standardavvikelse	0,314	1,114
Konfidensintervall	1,146-1,596	1,364-2,212



Figur 9. IgA-koncentration i serum (g/l) för friska tollare (n=10), alla tollare med SRMA (n=22), endast tollare med akut SRMA (n=12) och tollare med IMRD (n=7).

Ingen statistiskt signifikant skillnad av IgA-medelvärde kunde påvisas mellan det totala antalet tollare med SRMA och de kliniskt friska tollarna. Inte heller kunde någon signifikant skillnad av medelvärde noteras mellan tollare akut sjuka i SRMA jämfört med det totala antalet tollare med SRMA eller med de friska tollarna (tabell 3 och 4 samt figur 9).

Tabell 4. IgA-koncentration i serum (g/l) för alla tollare med SRMA, endast tollare med akut SRMA samt tollare med IMRD (95 % konfidens)

	SRMA (n=22)	Akut SRMA (n=12)	IMRD (n=7)
Medelvärde	1,766	2,080	1,859
Variationsvidd	3,854	3,854	3,984
Standardavvikelse	1,045	1,140	1,399
Konfidensintervall	1,303-2,229	1,356-2,804	0,565-3,153

Ingen statistisk signifikant skillnad av IgA-medelvärde kunde åskådliggöras mellan tollare med IMRD och kliniskt friska tollare eller med de friska kontrollerna av olika raser (tabell 2, 3 och 4 samt figur 9).

Extern analys

Serumprover från fem av de kliniskt friska schäfrarna (> 1 år) analyserades även externt för IgA vid Laboklin (Bad Kissingen, Tyskland). Vid den ”interna” analysen hade dessa schäfrar IgA-koncentrationerna: 0,57, 0,756, 1,82, 2,06 och 2,17 g/l. Två serumprover (0,57 och 2,06 g/l vid den interna analysen) låg under Laboklin’s referensintervall (0,2-1,2 g/l). Övriga tre låg inom referensintervallet.

Fyra av fem serumprover från kliniskt friska tollare (> 1 år) låg inom Laboklin's referensintervall. Individerna som exkluderades från de interna resultaten, på grund av högt värde, låg även tydligt över (2,95 g/l) referensintervallet vid den externa analysen. Två av åtta tollare med akut obehandlad SRMA låg över referensintervallet. En individ var åtta månader och den andra över ett år. En fyra månaders tollare med akut obehandlad SRMA låg klart under (0,03 g/l) referensintervallet. Övriga fem tollare med akut SRMA hade normala värden. Även två tollare med IMRD (> 1 år) analyserades externt. En av dessa låg högt (2,66 g/l) medan den andra låg inom referensintervallet.

Totalt analyserades 25 serumprover externt. Korrelationskoefficienten var 0,93 mellan de interna och de externa ELISA-resultaten.

DISKUSSION

ANA, immunodiffusion

Tidigare studier har visat att IIF-ANA positiva hundar med kornigt fluorescensmönster, utan kromosomreaktivitet, ofta är positiva (bildar fällningslinjer) på immunodiffusion. Detta till skillnad från IIF-ANA positiva hundar med homogent mönster, med kromosomreaktivitet, vilka som regel är negativa på immunodiffusion (Hansson & Karlsson-Parra, 1999; Hansson-Hamlin *et al.*, 2006). I den här studien bildade 31 av 32 stycken IIF-ANA positiva hundar med kornigt mönster fällningslinjer på immunodiffusion. Att inte alla hundar med kornigt mönster är positiva på immunodiffusion kan delvis förklaras av att ett kornigt mönster inte alltid är förknippat med ENA (Bremer *et al.*, 2015b). Det är också troligt att det humana ENA-substratet som användes i studien inte innehåller hundens alla lösliga nukleära antigen (Immuno Concepts, Auto I.D. SSA/Ro och SSB/La autoantikroppsanalys, 2014).

Immunodiffusionspositiva individer kunde i den här studien delas in i tre större grupper. Dessutom fanns två individer som inte passade i någon av dessa tre grupper och som inte heller hade överensstämmande reaktion med varandra. Sextiofem procent av individerna (grupp 1, n=4, och grupp 2, n=16) hade reaktivitet mot okända antigen - alltså andra antigen än vad som undersöktes i den här studien. Trettionio procent (alla nio individer i grupp 3, två individer i grupp 2 samt individ B) hade RNP-reaktivitet. I tidigare immunodiffusionsstudier på hund har individer delats in i fyra grupper varav en grupp har haft antikroppar mot RNP och övriga tre grupper mot okända antigen (Hansson & Karlsson-Parra, 1999; Hansson-Hamlin *et al.*, 2006).

I den här studien hade 80 % av schäfrarna (alla i grupp 2) överensstämmande reaktion mot ett okänt antigen. Liknande resultat har tidigare visats. I två andra immunodiffusionsstudier hade 83 % respektive 100 % av schäfrarna med kornigt fluorescensmönster gemensam, okänd reaktivitet (Hansson & Karlsson-Parra, 1999; Hansson-Hamlin *et al.*, 2006).

Samtliga tre tollare som ingick i den här delstudien hade en gemensam, okänd reaktivitet på immunodiffusion. Ett av tollarproverna har även undersökts tidigare med immunodiffusion (Hamlin H., Sveriges lantbruksuniversitet, pers. medd., 2016, opublicerade data). I den studien ingick 18 stycken IIF-ANA positiva tollare med kornigt fluorescensmönster. Fyra tollare (22 %) var då negativa på immunodiffusion. Ytterligare en tollare var svårbedömd på grund av svag fällningslinje. Tolv stycken (67 %), varav en utgjordes av tollaren som medverkade i den här

studien, hade gemensam reaktivitet. Sju av dessa tolv var kullsyskon. En immunodiffusionspositiv tollare visade icke-identitetsreaktioner mot övriga tollare. Tollarna i den studien hade inte RNP-reaktivitet och analyserades inte för några andra specifika ANA (Hamlin H., Sveriges lantbruksuniversitet, pers. medd., 2016, opublicerade data).

En stor del av tollarna verkar ha gemensam ANA-specificitet. Detsamma gäller för schäfrarna fast mot ett annat antigen (Hansson & Karlsson-Parra, 1999; Hansson-Hamlin *et al.*, 2006; Hamlin H., Sveriges lantbruksuniversitet, pers. medd., 2016, opublicerade data). Resultaten indikerar att ANA-specificitet, i alla fall till viss del, kan ha genetisk bakgrund. Att olika ANA-specificiteter kan vara associerade med olika systemiska autoimmuna sjukdomar är redan åskådliggjort hos människa (von Mühlen & Tan, 1995). Hos hund är det konstaterat att ANA-positiva sjukdomar har komplex genetisk nedärvning där även miljöfaktorer, vilka ofta är okända, kan spela roll för sjukdomsutvecklingen (Wilbe *et al.*, 2009; Nelson & Couto, 2014; Wilbe *et al.*, 2015). Vid en tidigare studie av hundpatienter jämfördes kliniska förändringar mellan de olika subgrupperna på fluorescensmönster och immunodiffusion. De kliniska förändringarna var dock mycket lika mellan grupperna och man fann inte någon direkt korrelation mellan kliniska fynd och fluorescensmönster eller reaktivitet på immunodiffusion (Hansson & Karlsson-Parra, 1999).

En klar nackdel med immunodiffusionen var att flera individer hade svaga fällningslinjer och därmed var svåra att tolka. Önskvärt vore också att vissa av de positiva kontrollantikropparna skulle ha givit tydligare fällningslinjer. Anti-Scl-70 gav en väldigt svag fällningslinje och gick inte alls att bedöma men även anti-Jo-1 och anti-SSA var förhållandevis svaga. Anti-RNP/Sm, anti-Sm och anti-SSB gav tydligast fällningslinjer. Ett sätt att försöka öka möjligheten till tydligare fällningslinjer hos individer med låg antikroppstiter skulle kunna vara att dubbla serumvärdet i brunnen från 20 µl till ytterligare 20 µl efter 30 minuter (Immuno Concepts, Auto I.D. SSA/Ro och SSB/La autoantikroppsanalys, 2014). Detta var dock inte något som gjordes i den här studien.

Jämförelse av immunodiffusion, ELISA och LIA

Av de 32 individerna som ingick i delstudien med immunodiffusion har 31 av dessa undersökts tidigare med ELISA och LIA med avseende på ANA-specificitet. Då analyserades serumproverna bland annat för de extraherbara nukleära antigenen: RNP/Sm, Sm, RNP-C, RNP-A, RNP-70, SSA/Ro60, SSA/Ro52, SSB, Jo-1 och Scl-70. En individ har inte analyserats tidigare med varken ELISA eller LIA. Individen som var negativ på immunodiffusion hade inga utmärkande fynd på vare sig ELISA eller LIA (Bremer *et al.*, 2015b).

Grupp 1

Av de fyra individerna i grupp 1 på immunodiffusionen har tre stycken tidigare undersökts med ELISA och LIA. De hade då låga antikropps-koncentrationer mot de specifika ENA som analysen inkluderade (Bremer *et al.*, 2015b). Inte heller på immunodiffusion visade dessa individer någon överrensstämmande reaktion med undersökta positiva kontrollantikroppar (anti-RNP, anti-Sm, anti-SSA, anti-SSB och anti-Jo-1).

Grupp 2

Individerna i grupp 2 på immunodiffusionen, det vill säga 16 schäfrar, var alla undersökta tidigare med ELISA och LIA. Då hade totalt sex stycken förhöjda koncentrationer av antikroppar mot specifika ENA; tre stycken mot RNP/Sm, två stycken mot Jo-1 och en individ mot SSA (Bremer *et al.*, 2015b).

Två av de tre individerna i gruppen som hade förhöjda koncentrationer av anti-RNP/Sm på ELISA och LIA hade även förhöjda koncentrationer anti-Sm på båda analysmetoderna medan den tredje individen endast hade förhöjd koncentration på ELISA (Bremer *et al.*, 2015b). Dessa individer analyserades särskilt för antikroppar mot RNP/Sm på immunodiffusion eftersom de intressant nog redan uppvisat en överensstämmande reaktion med andra individer i grupp 2 som i sin tur hade icke-identitetsreaktioner mot anti-RNP/Sm. Två av individerna hade en överensstämmande reaktion med anti-RNP och icke-identitetsreaktion mot anti-Sm (varav ena individen var den som hade normalt anti-Sm på LIA). Den tredje individen visade en icke-identitetsreaktion mot anti-RNP/Sm på immunodiffusion.

De två individerna med lindrigt respektive måttligt stegrade koncentrationer anti-Jo-1 på ELISA och LIA var svårtolkade på immunodiffusionen till följd av svaga fällningslinjer. Individen med måttligt stegrat anti-Jo-1 på ELISA och LIA hade en sekundär fällningslinje på immunodiffusion vilket individen med lindrig stegring inte hade (Bremer *et al.*, 2015b).

Individen med förhöjd koncentration anti-SSA på ELISA och LIA hade dubbla fällningslinjer på immunodiffusion varvid den sekundära fällningslinjen uppvisade överensstämmande reaktion med anti-SSA (Bremer *et al.*, 2015b).

Grupp 3

Alla i grupp 3 på immunodiffusionen var tidigare undersökta med ELISA och LIA. Dessa nio individer hade stegrade antikropps-koncentrationer mot RNP/Sm och Sm på ELISA och LIA (Bremer *et al.*, 2015b). Även på immunodiffusion visade de en överensstämmande reaktion med anti-RNP/Sm. En schäfer i gruppen hade en sekundär fällningslinje på immunodiffusionen. Det är möjligt att den individen, med sin sekundära fällningslinje, även hade gemensam reaktivitet med grupp 2 men undersöktes inte för detta.

Individ A

Individ A var tidigare undersökt med ELISA och LIA och hade då förhöjda koncentrationer av antikroppar mot SSA och SSB (Bremer *et al.*, 2015b). På immunodiffusion uppvisade individen en överensstämmande reaktion med anti-SSA och anti-SSB.

Individ B

Individ B hade stegrade antikropps-koncentrationer mot RNP/Sm och Sm på ELISA och LIA (Bremer *et al.*, 2015b). På immunodiffusion uppvisade individ B en överensstämmande reaktion med anti-RNP och anti-Sm. Anmärkningsvärt är dock att denna individ uppvisade icke-identitetsreaktion med två individer ur grupp 3 som förutsattes ha antikroppar mot RNP/Sm.

Differenser mellan analysmetoderna

Sammantaget var det alltså tre individer, alla i grupp 2 vid analys med immunodiffusion, där skillnader i ANA-specificitet upptäcktes mellan undersökningar med immunodiffusion, ELISA och LIA. Två individer med stegrat anti-Jo-1 på ELISA och LIA visade ingen tydlig överensstämmande reaktion med kontrollantikropparna på immunodiffusion. Tredje individen uppvisade icke-identitetsreaktion mot anti-RNP/Sm på immunodiffusion men hade stegrade koncentrationer anti-RNP/Sm och anti-Sm på ELISA och LIA (Bremer *et al.*, 2015b). Hänsyn bör tas till att bara några från varje grupp testades mot de positiva kontrollantikropparna. Det kan alltså ha funnits fler skillnader mellan analysmetoderna om samtliga individer hade testas mot varandra och mot de positiva kontrollantikropparna. Att resultat skiljer sig mellan analysmetoderna kan förklaras av att antigenen kan ha processats i olika grad för de skilda analysmetoderna. Det medför att antigenets tredimensionella struktur då kan ha förändrats och att antigenens epitoper blir tillgängliga i varierande utsträckning vilket gör att antikropparna kanske inte identifieras på samma sätt (Tizard, 2013).

Jämfört med ELISA och LIA är en nackdel med immunodiffusion att det kan vara svårt att tolka fällningslinjerna, framför allt svaga sådana, och att ANA-koncentrationen inte går att mäta. Fördelarna med immunodiffusion är att individer med okänd antigenreaktivitet mot ENA kan identifieras samt att det vid immunodiffusion även går att jämföra individer med varandra då individer med gemensamma (överensstämmande) fällningslinjer sannolikt har samma autoantikropsreaktivitet. Med ELISA och LIA analyserar man bara serumprover för specifika ANA vilket inte utesluter att individen kan ha ytterligare antikropsreaktivitet - som kanske till och med har större betydelse än eventuell annan redan påvisad reaktivitet.

IgA

Schäfrarna (alla friska) hade som grupp ett statistiskt signifikant lägre IgA-medelvärde än de friska kontrollhundarna av olika raser (p-värde 0,03). Ett observandum är dock att schäfrarna och de friska kontrollerna analyserades vid två separata tillfällen. Två tollare analyserades som jämförelse vid båda tillfällena och ett aningen högre IgA-värde uppmättes hos de två tollarna i samband med den analys då schäfrarna ingick. Detta stärker hypotesen om att schäfer har ett lägre IgA-medelvärde än den totala populationen vilket också är i enlighet med tidigare studier (Batt *et al.*, 1991; Olsson *et al.*, 2014). Fem schäfrar analyserades även externt vid Laboklin (Bad Kissingen, Tyskland) vars referensintervall vid IgA-analys var 0,2-1,2 g/l. Två schäferprover (40 %) låg då under referensintervallet. Det går att spekulera i huruvida de låga IgA-koncentrationerna skulle kunna tala för en immundefekt i mukosan hos schäfer, vilket därmed också skulle kunna förklara den högre incidensen av immunmedierade sjukdomar (Felsburg *et al.*, 1985; Day, 1996; Vilson *et al.*, 2013).

Tre stycken sju veckor gamla schäfrar analyserades också men exkluderades från de statistiska beräkningarna. Deras IgA-medelvärde var 0,557 g/l vilket var klart lägre än medelvärdet för schäfrarna över ett år (1,037 g/l). Att IgA-koncentration är ålderskorrelerad och att unga individer har en lägre IgA-koncentration har också visats i tidigare studier (Felsburg *et al.*, 1985; Olsson *et al.*, 2014).

Ingen signifikant skillnad av IgA-medelvärde kunde identifieras hos friska tollare jämfört med friska kontroller (olika raser), eller sjuka tollare jämfört med friska kontroller (olika raser), eller tollare akut sjuka i SRMA jämfört med friska kontroller (olika raser). Tollarproverna analyserades vid två olika tillfällen men även vid statistisk jämförelse av bara det ena tillfället (april), då alla utom sex tollare analyserades, fanns det inga signifikanta skillnader. Den här studien är gjord på ett relativt litet antal hundar och för att påvisa mindre skillnader som ändå är statistiskt signifikanta fordras ett större antal hundar. Låga IgA-koncentrationer hos ett mindre antal tollare har påvisats i en tidigare studie (Olsson *et al.*, 2014). Det är alltså möjligt att tollarna, likt schäfrarna, har lägre IgA-koncentrationer än medelpopulationen. Ytterligare studier på ett större antal individer skulle behövas för att kunna dra sådana slutsatser.

Av de fem kliniskt friska tollarna som analyserades externt låg alla inom referensintervallet förutom en som även på den interna analysen hade tydligt högre koncentrationer än övriga friska tollare. Bara två av åtta tollare med akut SRMA som analyserades externt låg över referensintervallet och en tollare (4 månader) låg till och med klart under referensintervallet. Dessa resultat är inte i enlighet med tidigare studier som visat att de flesta hundar med akut SRMA har förhöjda IgA-koncentrationer i serum (Tipold & Jaggy, 1994; Tipold, 1995; Maiolini *et al.*, 2012). Den unga tollaren med akut SRMA som låg under referensintervallet skulle kunna förklaras av att IgA-koncentrationen i serum är ålderskorrelerad och individer under ett års ålder därmed kan ha ett falskt lågt värde (Felsburg *et al.*, 1985; Olsson *et al.*, 2014).

Medelvärdena för de 25 hundar som analyserades både internt och externt var 1,877 g/l respektive 0,741 g/l. Trots en stor variation av medelvärdena var korrelationen mellan de två ELISA-analyserna hög (0,93). Att värdena varierar så mycket mellan olika analyser gör att det är svårt att jämföra olika studier med varandra. Det medför också att det är tveksamt att använda sig av fasta gränsvärden, till exempel för IgA-brist, om inte analyserna sker med en standardiserad metod (Felsburg *et al.*, 1985; Rivas *et al.*, 1995; Day, 1996; Day, 1999; Olsson *et al.*, 2014).

KONKLUSION

Den här studien kunde visa att IIF-ANA positiva hundar med kornigt fluorescensmönster bildade fällningslinjer vid immunodiffusion. Hundarna kunde vidare delas upp i ett mindre antal undergrupper utifrån identitetsreaktionerna. I de flesta fall (65 %) var det mot ett okänt antigen, det vill säga ett antigen som inte överensstämmer med de vanligast förekommande kärnantigenen hos människa. Vid tidigare immunodiffusionsstudier av ANA-positiva hundar har motsvarande resultat erhållits (Hansson & Karlsson-Parra, 1999; Hansson-Hamlin *et al.*, 2006; Hamlin H., Sveriges lantbruksuniversitet, pers. medd., 2016, opublicerade data). Fortsatta undersökningar för att kartlägga dessa okända hundantigen skulle kunna ha stor betydelse för diagnostiken av ANA-positiva sjukdomar hos hundar. Hos människa har det visat sig att ANA-specificitet kan vara korrelerad till olika varianter av systemiska autoimmuna sjukdomar och det är sannolikt att så även skulle kunna vara fallet hos hund (von Mühlen *et al.*, 1995; Hansson & Karlsson-Parra, 1999; Hansson-Hamlin *et al.*, 2006; Hamlin H., Sveriges lantbruksuniversitet, pers. medd., 2016).

Studien visade också att friska schäfrar har en statistiskt signifikant lägre IgA-medelkoncentration i serum jämfört med friska kontrollhundar av olika raser. Två av fem schäfrar låg under referensintervallet vid IgA-analys vid Laboklin (Bad Kissingen, Tyskland). Ingen skillnad av medelvärde kunde visas för friska respektive sjuka tollare jämfört med friska kontrollhundar (olika raser). Hos tollare med akut SRMA var det bara två av åtta individer som hade förhöjda IgA-koncentrationer i serum vilket skiljer sig från tidigare studier då det är visat att de flesta individer av olika raser med akut SRMA har en förhöjd IgA-koncentration i serum (Tipold & Jaggy, 1994; Tipold, 1995; Maiolini *et al.*, 2012). Analys av ett större antal tollare med akut, obehandlad SRMA skulle vara önskvärt. Om fler studier visar på liknande resultat kan man spekulera i huruvida tollare har en annan genetisk variant av SRMA jämfört med andra raser.

TACK

Till min handledare Helene Hamlin, institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet, för ditt otroliga engagemang, bra handledning och givande diskussioner.

Till Hanna Bremer, institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet, för din hjälp med proverna, statistikvägledning och konstruktiv kritik.

Till Anna Svensson, institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet, för att du analyserat IgA.

Till Johan Rönnelid, institutionen för immunologi, genetik och patologi, Uppsala Universitet, för din expertis i antinukleära antikroppar och immunodiffusion.

Till min underbara man, son, övriga familj, släkt och vänner för erat stöd under min studietid.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Anfinsen K.P., Berendt M., Liste F.J.H., Haagensen T.R., Indrebo A., Lingaas F., Stigen O. & Alban L. (2008). A retrospective epidemiological study of clinical signs and familial predisposition associated with aseptic meningitis in the Norwegian population of Nova Scotia duck tolling retrievers born 1994-2003. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, vol. 72 (4), ss. 350-355. Tillgänglig: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2442678/> [2016-12-27]
- Bathen-Noethen A., Carlson R., Menzel D., Mischke R. & Tipold A. (2008). Concentrations of acute-phase proteins in dogs with steroid responsive meningitis-arteritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 22 (5), ss. 1149-1156. Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2008.0164.x/abstract> [2016-10-14]
- Batt R.M., Barnes A., Rutgers H.C. & Carter S.D. (1991). Relative IgA deficiency and small intestinal bacterial overgrowth in german-shepherd dogs. *Research in Veterinary Science*, vol. 50 (1), ss. 106-111. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003452889190062S> [2016-09-30]
- Bremer H.D., Lattwein E., Renneker S., Lilliehöök I., Rönnelid J. & Hansson-Hamlin H. (2015b). Identification of specific antinuclear antibodies in dogs using a line immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 168 (3-4), ss. 233-241. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242715300027> [2016-09-17]
- Bremer H.D., Vilson A., Bonnett B.N. & Hansson-Hamlin H. (2015a). Disease patterns and incidens of immune-mediated disease in insured Swedish Nova Scotia Duck Tolling Retrievers. *Veterinary Record*, vol. 177 (3). Tillgänglig: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/177/3/74.full> [2016-09-17]
- Chabanne L., Fournel C., Rigal D & Monier J.C. (1999). Canine systemic lupus erythematosus Part II - Diagnosis and treatment. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, vol. 21 (5).
- Day M.J. (1999). Possible immunodeficiency in related rottweiler dogs. *Journal of Small Animal Practice*, vol. 40 (12), ss. 561-568. Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1999.tb03022.x/abstract;jsessionid=F77D0BBA6A810EDE9DF12CF899D38EB1.f02t04> [2016-10-04]
- Day M.J. (1996). Inheritance of serum autoantibody, reduced serum IgA and autoimmune disease in a canine breeding colony. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 53 (3-4), ss. 207-219. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242796056073> [2016-09-30]
- Felsburg P.J., Glickman L.T. & Jezyk P.F. (1985). Selective IgA deficiency in the dog. *Clinical Immunology and Immunopathology*, vol. 36 (3), ss. 297-305.
- Fournel C., Chabanne L., Caux C., Faure J.R., Rigal D., Magnol J.P. & Monier J.C. (1992). Canine systemic lupus-erythematosus I: A study of 75 cases. *Lupus*, vol. 1 (3), ss. 133-139.
- Hansson H. & Karlsson-Parra A. (1999). Canine nuclear antibodies: Comparison of immunofluorescence staining patterns and precipitin reactivity. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 40 (3), ss. 205-212.
- Hansson H., Trowald-Wigh G. & Karlsson-Parra A. (1996). Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence in dog sera: Comparison of rat liver tissue and human epithelial-2 cells as antigenic substrate. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 10 (4), ss. 199-203. Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1996.tb02050.x/epdf> [2016-09-17]
- Hansson-Hamlin H. & Lilliehöök I. (2013). Steroid-responsive meningitis-arteritis in Nova Scotia duck tolling retrievers. *Veterinary Record*, vol. 173 (21). Tillgänglig: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/173/21/527.2.full> [2016-09-17]

- Hansson-Hamlin H. & Lilliehöök I. (2009). A possible systemic rheumatic disorder in the Nova Scotia duck tolling retriever. *Acta Veterinaria Scandinavia*, vol. 51. Tillgänglig: <http://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0147-51-16> [2016-09-17]
- Hansson-Hamlin H., Lilliehöök I. & Trowald-Wigh G. (2006). Subgroups of canine antinuclear antibodies in relation to laboratory and clinical findings in immune-mediated disease. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 35 (4), ss. 397-404. Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2006.tb00155.x/full> [2016-09-17]
- Immuno Concepts. (2014). *Auto I.D. SSA/Ro och SSB/La autoantikroppsanalys*. Sacramento: Immuno Concepts.
- Maiolini A., Carlson R., Schwartz M., Gandini G. & Tipold A. (2012). Determination of immunoglobulin A concentrations in the serum and cerebrospinal fluid of dogs: An estimation of its diagnostic value in canine steroid-responsive meningitis-arteritis. *Veterinary Journal*, vol. 191 (2), ss. 219-224. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023310004508> [2016-09-17]
- Monier J.C., Ritter J., Caux C., Chabanne L., Fournel C., Venet C. & Rigal D. (1992). Canine systemic lupus erythematosus II: Antinuclear antibodies. *Lupus*, vol. 1 (5), ss. 287-293.
- Nelson R.W. & Couto C.G. (2014). *Small animal internal medicine*. 5. uppl. St. Louis: Elsevier.
- Olsson M., Frankowiack M., Tengvall K., Roosje P., Fall T., Ivansson E., Bergvall K., Hansson-Hamlin H., Sundberg K., Hedhammar Å., Lindblad-Toh K. & Hammarström L. (2014). The dog as a genetic model for immunoglobulin A (IgA) deficiency: Identification of several breeds with low serum IgA concentrations. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 160 (3-4), ss. 255-259. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242714001329> [2016-09-17]
- Ouchterlony O. (1953). Antigen - antibody reactions in gels IV types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*, vol. 32 (2), ss. 231-240.
- Rivas A.L., Tintle L., Argentieri D., Kimball E.S., Goodman M.G., Anderson D.W., Capetola R.J. & Quimby F.W. (1995). A primary immunodeficiency syndrome in shar-pei dogs. *Clinical Immunology and Immunopathology*, vol. 74 (3), ss. 243-251. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090122985710367> [2016-10-04]
- Smee N.M., Harkin K.R. & Wilkerson M.J. (2007). Measurement of serum antinuclear antibody titer in dogs with and without systemic lupus erythematosus: 120 cases (1997-2005). *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 230 (8), ss. 1180-1183.
- Soulard M., Barque J.P., Dellavalle V., Hernandezverdun, D., Masson C., Danon F. & Larsen C.J. (1991). A novel 43-kDa glycoprotein is detected in the nucleus of mammalian-cells by autoantibodies from dogs with autoimmune disorders. *Experimental Cell Research*, vol. 193 (1), ss. 59-71. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482791905386> [2016-11-13]
- Svenska Kennelklubben (2016-11-07). DjurID.se. Tillgänglig: <https://hundar.skk.se/agarreg/> [2016-11-08]
- Tan E.M., Cohen A.S., Fries J.F., Masi A.T., McShane D.J., Rothfield N.F., Schaller J.G., Talal N. & Winchester R.J. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of Systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, vol. 25 (11), ss. 1271-1277. Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.1780251101/abstract> [2016-09-30]
- Teichner M., Krumbacher K., Doxiadis I., Doxiadis G., Fournel C., Rigal D., Monier J.C. & Grosse-wilde H. (1990). Systemic lupus-erythematosus in dogs - association to the major histocompatibility complex class-I antigen DLA-A7. *Clinical Immunology and Immunopathology*, vol. 55 (2), ss. 255-262.

- Tipold A. (1995). Diagnosis of inflammatory and infectious-diseases of the central-nervous-system in dogs - retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 9 (5), ss. 304-314. Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1995.tb01089.x/epdf> [2016-09-17]
- Tipold A. & Jaggy A. (1994). Steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs - long-term study of 32 cases. *Journal of Small Animal Practice*, vol. 35 (6), ss. 311-316. Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1994.tb03293.x/epdf> [2016-09-17]
- Tipold A. & Schatzberg S.J. (2010). An update on steroid responsive meningitis-arteritis. *Journal of Small Animal Practice*, vol. 51 (3), ss. 150-154. Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2009.00848.x/epdf> [2016-09-30]
- Tizard I.R. (2013). *Veterinary immunology*. 9. uppl. St. Louis: Elsevier.
- Vilson Å., Bonnett B., Hansson-Hamlin H. & Hedhammar Å. (2013). Disease patterns in 32,486 insured German shepherd dogs in Sweden: 1995-2006. *Veterinary Record*, vol. 173 (5). Tillgänglig: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/173/5/116.long> [2016-09-27]
- von Mühlen C.A. & Tan E.M. (1995). Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 24 (5), ss. 323-358. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049017295800042> [2016-10-17]
- White S.D., Rosychuk R.A.W. & Schur P.H. (1992). Investigation of antibodies to extractable nuclear antigens in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 53 (6), ss. 1019-1021.
- Wilbe M., Jokinen P., Hermanrud C., Kennedy L.J., Strandberg E., Hansson-Hamlin H., Lohi H. & Andersson G. (2009). MHC class II polymorphism is associated with a canine SLE-related disease complex. *Immunogenetics*, vol. 61 (8), ss. 557-564. Tillgänglig: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00251-009-0387-6> [2016-09-30]
- Wilbe M., Kozyrev S.V., Farias F.H.G., Bremer H.D., Hedlund A., Pielberg G.R., Seppala E.H., Gustafson U., Lohi H., Carlborg O., Andersson G., Hansson-Hamlin H. & Lindblad-Toh K. (2015). *Plos Genetics*, vol. 11 (6), ss. 27. Tillgänglig: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1005248> [2017-01-11]
- Yel L. (2010). Selective IgA deficiency. *Journal of Clinical Immunology*, vol. 30 (1), ss. 10-16. Tillgänglig: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10875-009-9357-x> [2016-09-30]