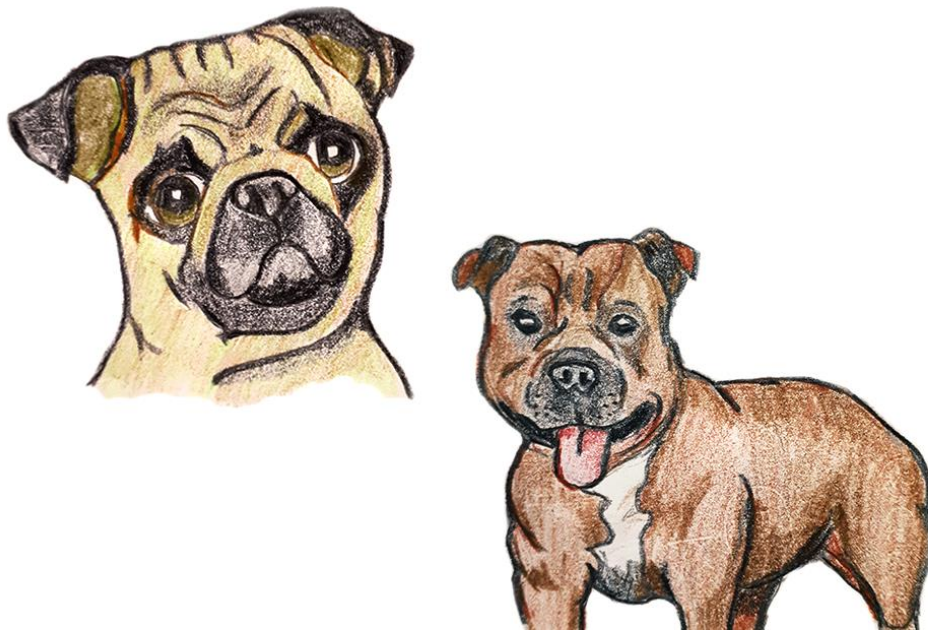


# Juvenil demodikos och dess association med MHC klass II

## Juvenile demodicosis and its association with MHC class II



*Katarina Gunnarsson*

*Uppsala  
2019*



# Juvenil demodikos och dess association med MHC klass II

## Juvenile demodicosis and its association with MHC class II

*Katarina Gunnarsson*

**Handledare:** Kerstin Bergvall, institutionen för kliniska vetenskaper

**Biträdande handledare:** Göran Andersson, institutionen för husdjursgenetik

**Examinator:** Helene Hamlin, institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0869

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2019

**Elektronisk publicering:** <https://stud.epsilon.slu.se>

**Omslagsillustration:** Katarina Gunnarsson

**Nyckelord:** juvenil demodikos, DLA, MHC, Staffordshire bullterrier, mops

**Key words:** juvenile demodicosis, DLA, MHC, Staffordshire bullterrier, pug

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper



## SAMMANFATTNING

Demodikos är en hudsjukdom hos hund orsakad av hårsäckskvalstret *Demodex*. Normalt sett ingår *Demodex* i hudens normalflora men då kvalstret, på grund av ett förändrat immunförsvar, får möjlighet att proliferera ohämmat uppstår sjukdomen demodikos. Sjukdomen kan klassas som lokal eller generell beroende på lesionernas storlek och lokalisation. Det finns även två olika ålderskategorier; juvenil och adult demodikos. Den juvenila formen av sjukdomen drabbar hundar innan 12–18 månaders ålder. Bakgrunden är multifaktoriell och det har sedan länge varit en teori att det finns genetiska komponenter inblandade i patogenesen. Dessa genetiska faktorer verkar vara kopplade till immunförsvaret och mycket tyder på att en ärftlig T-cellsdefekt har stor betydelse för utveckling av sjukdomen.

Syftet med den här studien var att undersöka en eventuell association mellan Major Histocompatibility Complex klass II och en ökad eller minskad risk för att utveckla juvenil demodikos. Målet var att finna alleler och/eller haplotyper vilka utgör en risk eller uppvisar en skyddande faktor med avseende på sjukdomsutveckling. I studien ingick 215 hundar, 90 stycken av rasen mops och 125 stycken av rasen Staffordshire bullterrier. Bland mopsarna var 40 hundar fall och 50 hundar kontroller. För rasen Staffordshire bullterrier var motsvarande antal 43 stycken fall och 82 stycken kontroller. Från blod extraherades genomiskt DNA vilket sedan sekvenserades med avseende på generna DLA-DRB1, DLA-DQA1 samt DLA-DQB1.

Inom studiepopulationen för rasen mops hittades fyra DRB1-alleler, tre DQA1-alleler och sju DQB1-alleler. 14 olika haplotyper kunde identifieras. DRB1\*01501, DQA1\*00601 samt DQB1\*02301 var de alleler som förekom med högst frekvens inom studiepopulationen. Bland haplotyperna var DRB1\*01501/DQA1\*00601/DQB1\*02301 den vanligaste. En riskallel kunde identifieras; DQB1\*02601, och en allel uppvisade skyddande effekt; DQB1\*02301. Haplotyp DRB1\*01502/DQA1\*00601/DQB1\*02301 var associerad med minskad risk för sjukdom.

Inom studiepopulationen för rasen Staffordshire bullterrier hittades nio DRB1-alleler, sex DQA1-alleler och tio DQB1-alleler. Totalt hittades 39 haplotyper. DRB1\*00101, DQA1\*00101 samt DQB1\*00201 var de mest frekvent förekommande allelerna och bland haplotyperna var DRB1\*00101/DQA1\*00101/DQB1\*00201 den vanligaste. Allel DRB1\*01301 var associerad med en skyddande effekt.

Den här studien konfirmerar en genetisk association mellan DLA klass II och juvenil demodikos. Med statistiskt signifikant säkerhet identifierades inom studiepopulationen en riskallel, två alleler med skyddande effekt och en haplotyp med skyddande effekt. Baserat på resultaten går det att uttala sig om en ökad eller minskad risk gällande utveckling av sjukdom men det är viktigt att påpeka att juvenil demodikos är en multifaktoriell sjukdom. Flera olika genetiska riskfaktorer och miljöfaktorer har betydelse, sjukdomsutvecklingen är således inte enbart beroende av den genetiska uppsättningen hos DLA klass II.

## SUMMARY

Demodicosis is a canine skin disease caused by *Demodex*, a genus of mites. Normally, *Demodex* is part of the skin flora, but when the mite due to an altered immune response is allowed to replicate unchecked, it causes demodicosis. The disease can be classified as localized or generalized, depending on the size and location of the lesions. There are two age categories of the disease; juvenile demodicosis and adult demodicosis. Affected dogs younger than 12–18 months of age are classified as being affected by juvenile demodicosis. Juvenile demodicosis is a multifactorial disease and a well-known theory implicates a hereditary T-cell defect as an important part of the pathogenesis.

The aim of this study was to investigate associations between the Major Histocompatibility Complex class II and juvenile demodicosis. The goal was to identify alleles and/or haplotypes associated with the disease. There were two breeds included in the study with a total study population of 215 dogs. 90 of them were pugs and 125 were Staffordshire bull terriers. The pugs consisted of 40 cases and 50 controls and among the Staffordshire bull terriers, there were 43 cases and 82 controls. Blood was used to extract genomic DNA and the genes DLA-DRB1, DLA-DQA1 and DLA-DQB1 were sequenced.

In the pug study population, there were four DRB1-alleles, three DQA1-alleles and seven DQB1-alleles. In total, 14 different haplotypes were identified. DRB\*01501, DQA1\*00601 and DQB1\*02301 were the most common alleles in the population. Among the haplotypes, DRB1\*01501/DQA1\*00601/DQB1\*02301 was the most frequent. According to this study, DQB1\*02601 was a risk allele and DQB1\*0231 a protective allele. One haplotype, DRB1\*01502/DQA1\*00601/DQB1\*02301, was associated with a lower risk of developing juvenile demodicosis. No other alleles or haplotypes were statistically significantly associated with the disease. A greater study population could possibly reveal further associations.

In the Staffordshire bullterrier population, there were nine DRB1-alleles, six DQA1-alleles and ten DQB1-alleles. In total 39 haplotypes were found. Among the alleles, DRB1\*00101, DQA1\*00101 and DQB1\*00201 were the most frequent and among the haplotypes DRB1\*00101/DQA1\*00101/DQB1\*00201 was the most common. Only one allele, DRB1\*01301, showed statistically significant associations with juvenile demodicosis, and according to the results of this study, the presence of this allele protects against development of the disease.

In conclusion, this study confirms a genetic association between DLA class II and the probability to develop juvenile demodicosis. However, it is important to emphasize that juvenile demodicosis is a multifactorial disease depending on several genetic risk factors, as well as environmental factors. The disease is not solely depending on the genetics of the DLA class II-region.

## INNEHÅLL

Introduktion .....	1
Litteraturoversikt .....	2
Demodikos .....	2
Etiologi och patogenes .....	2
Klassificering .....	4
Diagnostik .....	5
Behandling .....	6
Immunförsvaret och Major Histocompatibility Complex .....	7
MHC I .....	9
MHC II .....	10
MHC III .....	10
MHC och sjukdom .....	11
Material och metoder .....	13
Resultat .....	16
Mops .....	16
DLA klass II-alleler .....	16
Haplotyper .....	17
Staffordshire bullterrier .....	18
DLA klass II-alleler .....	18
Haplotyper .....	20
Diskussion .....	22
Populärvetenskaplig sammanfattning .....	26
Referenser .....	29





## INTRODUKTION

Juvenil demodikos är en hudsjukdom hos hund orsakad av hårsäckskvalstret *Demodex* som är ett genus av kvalster i familjen Demodicidae. Hos hund är *Demodex canis* den vanligaste förekommande arten. Normalt sett ingår en mindre mängd av dessa kvalster i hundens hudnormalflora, men när de får möjlighet att proliferera i onormalt stor utsträckning uppstår sjukdomen demodikos. Sjukdomen kan delas upp i två ålderskategorier - juvenil eller adult form, beroende på i vilken ålder sjukdomen bryter ut. Demodikos kan även klassas som lokal eller generell beroende på lesionernas utbredning (Miller *et al.*, 2012).

Att ett generellt nedsatt immunförsvar innebär en riskfaktor för att utveckla demodikos är sedan länge känt, men exakt vilka mekanismer och bakomliggande faktorer som gör att vissa hundar drabbas av sjukdomen är ännu ej helt klarlagt. En försämrad immunologisk kompetens anses dock vara inblandad i patogenesen. Sjukdomen är multifaktoriell och när den uppstår hos unga hundar utan andra kända sjukdomar har starka misstankar framförts om en ärftlig T-cellsdefekt i immunförsvaret (Miller *et al.*, 2012).

Major Histocompatibility Complex klass II (MHC II) kallas hos hund Dog Leukocyte Antigen klass II (DLA II) och är en grundläggande komponent i immunförsvaret med betydelse för presentation av antigener (Tizard 2012). Det är fastställt att varianter av DLA II utgör genetiska riskfaktorer kopplade till flertalet olika immunmedierade hundsjukdomar. Beroende på vilken genetisk uppsättning av MHC-genvarianter en individ har kan den vara mer eller mindre benägen att utveckla sjukdom (Kennedy *et al.*, 2002a).

Syftet med den här studien var att undersöka eventuell association med Major Histocompatibility Complex II och juvenil demodikos hos hundraserna mops och Staffordshire bullterrier. Målet var att finna alleler och/eller haplotyper vilka utgör en risk eller skyddande faktor med avseende på utveckling av sjukdomen.

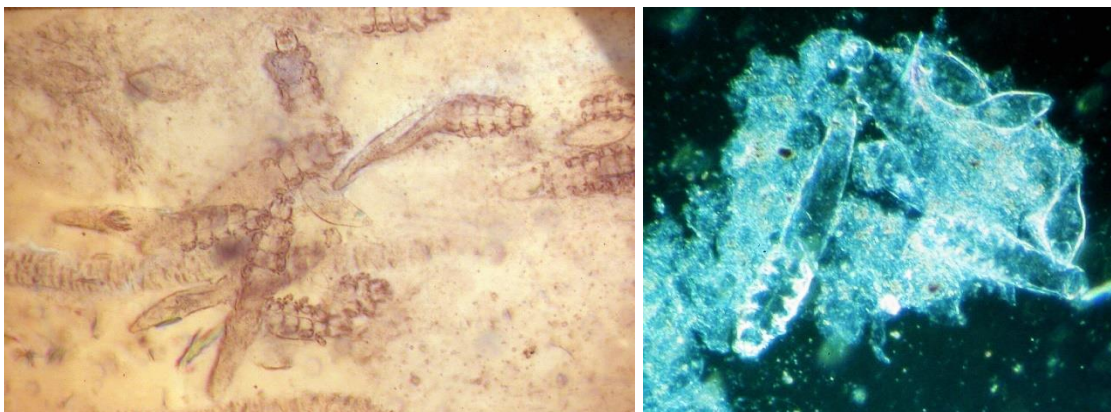
## LITTERATURÖVERSIKT

### Demodikos

#### *Etiologi och patogenes*

Demodikos är en sjukdom orsakad av en onormalt hög förekomst av hårsäckskvalster, *Demodex*, vilket är ett genus av kvalster i familjen Demodicidae. Demodexkvalster tillhör hudens normalflora i mindre mängd hos alla arter med hårsäckar, men det är när kvalstren får möjlighet att proliferera i onormalt stor utsträckning som sjukdomen demodikos uppstår. Parasiten lever, som namnet antyder, i hårsäckar och förekommer även ibland i talgkörtelgångar (Miller *et al.*, 2012). Hos hund anses valpar få parasiten överförd via sin direktkontakt med moderns hud under de två till tre första levnadsdygnen (Greve & Gaafar, 1966).

Hos hund är *Demodex canis* den mest frekvent förekommande arten, men andra - så som *Demodex injaj* och *Demodex cornei*, vilka ser annorlunda ut rent morfologiskt har också definierats (Chesney, 1999; Desch & Hillier, 2003). Dock har nyare forskning, där det fylogenetiska släktskapet undersökts med hjälp av sekvensering av parasiternas genom, visat på att *cornei* i själva verket är en morfologisk variant av *D. canis* (Sastre *et al.*, 2012). Oavsett morfologiskt utseende behandlas hudsjukdom associerad med kvalstren enligt samma regim och det har inte påvisats någon skillnad i behandlingsresultat oavsett typ av demodexkvalster, vilka kan förekomma i kombination med varandra (Mueller *et al.*, 2011; Forsythe, 2012).



Figur 1. *Demodex*kvalster i ljusmikroskop, K. Bergvall

Demodikos kan delas upp i två ålderskategorier – juvenil eller adult form, beroende på vid vilken ålder sjukdomen bryter ut. De hundar som drabbas av den juvenila formen är yngre än 12 till 18 månader (Forsythe, 2012). Dock kan gränserna vara diffusa; en hund mellan två till fyra år som får demodikos har per definition inte adult demodikos utan kan ha burit med sig sjukdomen odiagnostiserad sedan valpåldern. Om hunden får sitt första utbrott av demodikos efter fyra års ålder klassas sjukdomen däremot alltid som adult demodikos. Hos vuxna djur är sjukdomen allvarligare då någon form av generell, dämpande påverkan av immunförsvaret föreligger och ger kvalstren en chans att proliferera. Orsaker till utbrott i äldre åldrar kan vara exempelvis maligna neoplasier, leishmanios eller annan allvarlig allmänsjukdom. Om ingen underliggande orsak kan identifieras och korrigeras anses prognosen för sjukdomen vara sämre (Miller *et al.*, 2012).

En generellt nedsatt immunkompetens anses vara en starkt bidragande orsak till utveckling av adult demodikos, men att detta är fallet även för den juvenila formen är inte troligt. De unga djur som drabbas har som regel inte andra sjukdomar som skulle kunna förväntas orsaka immunosuppression och sjukdomen uppträder hos välnärda, väl uppfödda individer. Exakt vad det är som leder till att vissa hundar insjuknar i juvenil demodikos är ännu inte helt fastställt. De teorier som finns rör någon form av defekt i immunförsvaret som endast påverkar demodexkvalstrens förmåga att proliferera (Miller *et al.*, 2012).

Juvenil demodikos är en multifaktoriell sjukdom och genetiska riskfaktorer har sedan länge ansetts utgöra en viktig komponent i förloppet. Teorin grundar sig bland annat i att sjukdomen förekommer mer frekvent inom vissa hundraser och inom vissa familjelinjer. Exempelvis har hundar av raserna Staffordshire bullterrier, shar pei och amerikansk Staffordshire terrier högre risk för att utveckla demodikos jämfört med hundpopulationen i stort. Renrasiga hundar drabbas oftare än individer av blandrastyp. Vidare styrks också den genetiska kopplingens betydelse av den observerbara minskningen i sjukdomsfrekvens när drabbade djur plockas ur aveln. Noterbart är även det faktum att alla hundar som behandlas med immunosupprimerande medicin inte utvecklar demodikos varför andra faktorer, exempelvis en genetisk komponent skulle kunna utgöra en viktig del även för den adulta formen av sjukdomen (Miller *et al.*, 2012; Ferrer *et al.*, 2014).

Hos en frisk hund verkar immunförsvaret klara av att hålla kvalsterpopulationen under kontroll och inhibera en ohämmad proliferation utan att orsaka inflammation. Dock är varken mekanismerna för hur immunsystemet hos friska hundar kontrollerar kvalstren eller på vilket sätt det brister när sjukdom uppstår kända. En frekvent framförd teori pekar ut en ärftlig T-cellsdefekt som orsak, vilken just verkar vara kopplad till förmågan att hindra demodexkvalstren att proliferera (Miller *et al.*, 2012). Ett stort antal studier har utförts i syfte att förstå hur immunförsvarets agerar vid demodikos, problematiskt är dock att flertalet har genomförts i små grupper med varierande ålder och klinisk bild. Det medför svårigheter att utröna vad som triggar själva demodikosen och vilka förändringar som är sekundära, något som Ferrer *et al.* pekar ut i sin reviewartikel från 2014.

Gemensamt för hundar med generell demodikos verkar dock vara en så kallad utmattning av T-celler. Nästan alla förändringar karakteristiska för detta observerades hos hundar drabbade av generell demodikos i en studie av Yi *et al.* 2010. T-cellsutmattning innebär en stegvis och progressiv förlust av T-cellernas funktion. Förändringar typiska för detta innefattar höga nivåer av nedreglerande cytokiner (ex. IL10) samt TGF- $\beta$ , låg produktion av stimulerande cytokiner (ex. IL2 och IL21) samt ett lägre uttryck av CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-celler (Ferrer *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2010). Varför hundar med generell demodikos utvecklar denna typ av immunologisk utmattning är ännu ej helt klarlagt, även om flertalet studier på immunförsvaret under pågående demodikos har genomförts. I många av dessa studier användes metoden *in vitro* lymfocyt blastogenes (IVLB) och det faktum att metoden har sina brister gällande tillförlitlighet har lyfts fram av Miller *et al.* då resultaten kan variera beroende på hundarnas ras och ålder (Miller *et al.*, 2011).

En studie där andel CD8<sup>+</sup> T<sub>K</sub>- och CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-celler mättes i perifert blod med flödescytometri kunde konstatera att hundar med såväl generell som lokaliserad demodikos uppvisade förhöjda

halter av CD8+-celler och minskat antal CD4+-celler i jämförelse med den friska kontrollgruppen. Skillnaden var stegvis, där de hundar med generell demodikos uppvisade störst avvikelser. Att själva demodexkvalstret nedreglerar CD4+-cellernas aktivitet, ökar apoptos av dessa celler, inducerar en immunologisk utmattning eller en kombination av dessa faktorer framhålls som teorier till det sänkta antalet CD4+-celler. Förändringarna kvarstår inte när sjukdomen är behandlad, varför de inte verkar vara primära (Singh *et al.*, 2010). Att hundar med generell demodikos har större grad av prematur apoptos av leukocyter i blodet än friska hundar visades i en studie från 2011 (Singh *et al.*, 2011).

Nedsatt produktion av IL-2 hos hundar med generell demodikos var något som Lemarié & Horohov visade i en studie från 1996. I studien ingick tio stycken hundar, alla under ett år. IL-2 har en nyckelroll i det cellmedierade immunsvaret och dess uppgift är att se till att aktiverade T- och B-celler prolifererar, att makrofagers cytotoxiska förmåga ökar, att NK-celler aktiveras samt att CD8+-cellers tillväxt gynnas. Om IL-2 syntetiseras i otillräcklig mängd påverkas det cellmedierade försvaret negativt vilket är fördelaktigt för demodexkvalstren. En defekt i immunförsvarets antigenpresentation framhålls i artikeln som en tänkbar orsak till den bristande IL-2-responsen hos hundar med generell demodikos (Lemarié & Horohov, 1996).

Om en bakomliggande orsak till demodikos är en genetiskt betingad defekt kan det faktum att hundar som behandlats framgångsrikt som regel inte får återfall när behandlingen avslutas bara förklaras av att parasiten helt eliminerats med behandlingen. Med dagens möjligheter till känslig PCR-test avseende parasit-DNA har studier dock visat att detta inte sker. En teori gör istället gällande att defekten kan vara antigenberoende och när kvalstermängden reduceras till normalnivåer får immunförsvaret en chans att ta kontroll över situationen och T-cellerna kan då återfå normal funktion (Ferrer *et al.*, 2014; Zewe *et al.*, 2017).

### **Klassificering**

Förutom ålderskategorierna klassificeras även sjukdomen efter grad av utbredning i lokal eller generell form. Lokal demodikos innebär att hunden uppvisar ett fåtal lesioner, vanligtvis lokaliserade till ansikte och framben. Hos valpar beror detta på att dessa områden är mest exponerade för parasitöverföring från modern vid digivning. Kvalstren orsakar en ruptur av hudbarriären vilket leder till inflammation och hypersensitivitetsreaktion av typ IV. Spontan alopeci (hårlöshet) med eller utan erytem (rodnad) i huden är en klassisk presentation av associerade lesioner. Huden på affekterat område kan dessutom vara lätt flagande och uppvisar ibland djupt liggande pigmentering. Klåda förekommer i vissa fall (Miller *et al.*, 2012). För att sjukdomen ska klassas som lokal ska förändringarna proportionellt till hunden vara små och fåtaliga. Dessutom ska prover tagna på makroskopiskt oaffekterade områden vara negativa för parasiten.



Figur 2. Demodexlesioner hos två olika hundar, K. Bergvall

Om hunden har hårlösa områden på flertalet ställen, över en hel kroppsdel eller om de är särskilt utbredda klassas demodikosen istället som generell. Gränsen för när sjukdomen övergår från lokal till generell är inte fast definierad och skiljer sig åt i litteraturen. Enligt viss klassifikation räknas en individ med sex lesioner vanligen som lokal form, medan en individ med 12 eller fler lesioner övergår i generell. Däremellan finns en grupp som bedöms godtyckligt (Miller *et al.*, 2012). Andra författare har angett en snävare gränsdragning, där maximalt fyra lesioner med största diameter på 2,5 cm bedöms som lokal form (Mueller *et al.* 2011). The British Small Animal Veterinary Association (BSAVA) definierar lokal demodikos som en till fem separata lesioner (Forsythe, 2012).

Sekundär inflammation av varierande grad i hårsäcken (follikulit), abscesser i dermis (underhuden) – så kallade furunkler, samt bakteriell infektion i huden (pyodermi) är alla vanliga förändringar sekundärt till demodikosen vilka komplicerar sjukdomsförloppet.

Det finns en form av demodikos där lesionerna är lokaliserade till tassarna. Ibland har hunden även ökat parasitantal på övrig hud, men det är bara tassarna som uppvisar lesioner. Denna form, s.k. tassdemodikos, brukar klassificeras som generell form då den kan vara relativt svår att kontrollera och ofta kompliceras av sekundärinfektioner (Forsythe, 2012; Miller *et al.*, 2012). I undantagsfall kan *Demodex* även ge en extern otit och ibland förekommer inflammationen i öronens hud utan några lesioner på övriga kroppen (Forsythe, 2012).

### **Diagnostik**

Diagnos ställs med hjälp av hudskrap från affekterade områden. Huden bör pressas ihop och skrapen ska vara djupa, ned till kapillär blödning. Skrapprovet tas bäst med en oskarp skrapskalpell och mineralolja. Provet fördelas sedan på ett objektglas och inspekteras i mikroskop vid 40–100 x förstoring, med fördel bör kondensorn på mikroskopet vara stängd för bästa kontrast i bilden. Förekomst av vuxna parasiter, nymfer eller ägg verifierar diagnosen (Forsythe, 2012; Miller *et al.*, 2012).

Diagnostik kan också göras genom trikogram av hår som plockas från affekterade områden. Ett positivt resultat kan konfirmera diagnosen, dock är ett negativt svar aldrig uteslutande. Om hunden har samtidig djup follikulit eller furunkulos kan cytologi av exsudativt material från lesioner vara till hjälp. Ett sjukt djur uppvisar inte alltid *Demodex* på cytologiprov, men

förekomst av parasiten anses diagnostiskt. Analys av hudbiopsier kan vara värdefullt vid diagnostisering av sjukdomen, då folliklar innehållande kvalster kan ses. I vissa fall används biopsi för uteslutande av sjukdomen trots negativa hudskrap. Detta kan vara aktuellt för vissa hundraser, exempelvis shar pei, som kan ha påtaglig mucinansamling i huden vilket kan minska sensitiviteten i hudskrap. Det kan även vara aktuellt vid tassdemodikos eller när huden i affekterat område är kraftigt svullen eller flegmonös (Forsythe, 2012; Miller *et al.*, 2012).

Trots att parasiten ingår i hudens normalflora anses inte påvisande av *Demodex* i hudskrap, trikogram eller i biopsier hos en icke demodikosdrabbad hund vara normalt. De kan dock påvisas med känsligare metoder, så som PCR. I en studie från 2010 utfördes trikoscopi på 78 stycken friska hundar där *Demodex* endast påvisades hos en individ trots provtagning från ett flertal områden per hund (Fondati *et al.*, 2010). Vidare kunde parasiten endast påvisas i 13,9 % av 215 dermatologiskt friska hundar, trots 10 biopsier från olika områden per hund (Löwenstein & Kutzer, 1993). Med amplifiering av parasit-DNA via real-tids PCR kan dock även mycket små mängder DNA påvisas. Enligt en studie av Ravera *et al.* från 2013 verkar andelen hundar positiva för *Demodex* öka med antal testade områden. Om minst 20 områden testades med PCR-metoden kunde *Demodex*-DNA påvisas hos 90-100 % av hundarna i studiepopulationen, om än i låg mängd. Färre områden ger färre positiva hundar. I en studie av Zewe *et al.* från 2017 var endast 25–30 % av studiepopulationen positiva för *Demodex* om antalet områden begränsades till tre.

### **Behandling**

Lokal form av demodikos spontanläker oftast inom loppet av veckor till några månader och kräver ingen antiparasitär behandling. Ibland är sjukdomen intermittent återkommande under en period av några månader. Det finns ingen evidens för att behandling av lokal demodikos skulle kunna förhindra utveckling av generell demodikos. Om en sekundär pyodermi har uppstått till följd av demodikosen kan denna behandlas lokalt med ett antibakteriellt schampo, exempelvis innehållande klorhexidin. Det anses också viktigt att se över hundens övriga hälsotillstånd gällande bland annat nutrition och övrig parasitstatus då alla faktorer som kan medföra bristande immunokompetens kan försämra prognosen (Forsythe, 2012; Miller *et al.*, 2012).

Uppföljande klinisk undersökning och hudskrap för kontroll av kvalsterförekomst är lämpligt att genomföra med cirka en månads intervall. Då direktmikroskopiering av hudskrap är mer sensitiva jämfört med trikogram och cytologiprover, är detta att rekommendera för att följa avläkningsförloppet. Under avläkning förväntas först omogna stadier som larver och ägg minska och sedermera även adulter. Hår kan växa ut innan hunden uppvisar parasitfria prover. Om lesionerna blir fler eller mer utbredda och det totala kvalsterantalet inte minskar utgör det tecken på att sjukdomen håller på att övergå till generell form (Mueller *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2012).

Den generella formen av sjukdomen är betydligt allvarligare än den lokala och kan i värsta fall medföra sepsis och leda till avlivning. Sjukdomen kompliceras inte sällan av sekundära pyodermier och har tidigare klassificerats som svårbehandlad. Tiden från insjuknande till frisk är lång och kan ta upp till ett år. Det är viktigt att djurägaren är väl medveten om den långa

behandlingstiden (Forsythe, 2012; Miller *et al.*, 2012). Det finns dock fall där generell demodikos har avläkt spontant, något som setts hos framför allt yngre hundar. Om en förbättring inte kan detekteras på fyra till sex veckor utan behandling är det inte sannolikt att sjukdomen kommer läka utan antiparasitär behandling (Miller *et al.*, 2012).

Med dagens tillgång till antiparasitära preparat av typen isoxazoliner har prognosen även för generell demodikos drastiskt förbättrats. Tidigare har behandling skett med hjälp av antiparasitära medel, så som moxidektin, milbemycinoxim och doramectin, via perkutan administrering eller oralt. Preparat innehållande moxidektin i kombination med imidaklopid samt milbemycinoxim har indikation för demodikos hos hund i Sverige. Nackdelen med ovanstående preparat är att behandlingen måste ske frekvent, i vissa fall dagligen. Det har även förekommit off label-behandling med ivermectin vilket medför risk för allvarliga biverkningar. Detta gäller framför allt neurotoxisk påverkan vilket även kan uppstå hos hundar av raser som inte uppvisar en mutation i blod-hjärnbarriären (Fass Djurläkemedel, 2016–2018; Läkemedelsverket, 2014). Mutationen är en deletion i MDR-1-genen vilken kodar för ett transmembranprotein som fungerar som effluxpump i blod-hjärnbarriären. Mutationen är ärftlig och leder till ett icke funktionellt protein vilket i sin tur ger ökad känslighet mot flertalet läkemedel. Hundar som är drabbade uppvisar lägre tröskel för neurologisk toxicitet än andra raser (Geyer & Janko, 2012).

Ett flertal studier har visat på isoxazoliners goda effekt mot demodikos. Fördelen med denna typ av preparat är att de kan appliceras så sällan som en gång i månaden samt att biverkningsrisken förefaller lägre. Studier har gjorts på afoxolaner, sarolaner och lotilaner – samtliga uppvisade goda avläkningsresultat. I dessa studier har behandling skett en gång per månad i tre månader och klinisk förbättring har observerats redan efter första behandlingen (Six *et al.*, 2016; Snyder *et al.*, 2017; Lebon *et al.*, 2018).

I Sverige finns ett preparat innehållande isoxazoliner (sarolaner) med indikation för demodikos hos hund. Rekommendationen är att fortsätta behandlingen tills hudskrap är negativa under minst två på varandra följande månatliga tillfällen (Fass Djurläkemedel, 2017). Hudskrapen ska utföras på samma ställen varje gång för att en adekvat uppföljning ska kunna göras. Minst fyra till sex ställen ska vara parasitfria vid provtagning för att behandling ska kunna avslutas (Miller *et al.*, 2012). Det är viktigt av att fortsätta behandlingen trots klinisk förbättring, då risken för återfall annars är mycket stor (Forsythe, 2012). Det är viktigt att även behandla komplicerande, sekundära faktorer som pyodermi och seborré. Immunosupprimerande läkemedel bör undvikas i största möjliga utsträckning under behandlingstiden (Miller *et al.*, 2012). En hund anses inte frisk förrän efter ett år utan recidiv (Forsythe, 2012).

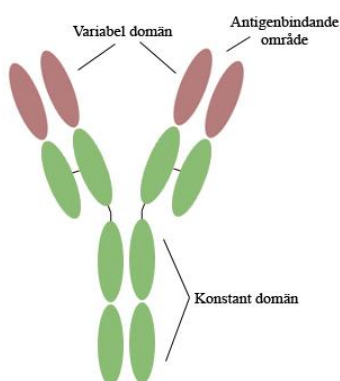
Att behandling reducerar, men inte eliminerar demodexkvalster styrks av det faktum att andelen hundar positiva för *Demodex* var oförändrad även efter avslutad isoxazolinbehandling i en studie av Zewe *et al.* från 2017.

## **Immunförsvaret och Major Histocompatibility Complex**

Kroppens immunförsvaret mot infektiösa agens är ett mycket komplext system som verkar genom flertalet olika vägar och på flera plan. Grovt sett kan det delas upp i tre delar: fysisk barriär, det medfödda immunförsvaret och det förvärvade immunförsvaret.

De fysiska barriärerna utgörs av päls, hud och slemhinnor. Om detta första initiala skydd har passerats kommer det medfödda immunförsvaret att reagera. Detta sker omgående, inom minuter till timmar, och svaret är ospecifikt. Responserna ser liknande ut oberoende av vilken typ av främmande struktur som har tagit sig in i kroppen och försvaret har inte någon minnesförmåga. Det medfödda immunförsvaret triggas av så kallade Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMPs) och Damage-Associated Molecular Pattern (DAMPs). PAMPs härrör från exogena inkräktare och DAMPs från skadade eller döende celler. PAMPs och DAMPs kommer binda till en typ av receptorer, kallade Pattern-recognition receptors (PRRs) som uttrycks på cellytan av så kallade vaktpostceller. Dessa celler, bland vilka makrofager, dendritiska celler och mastceller har en fundamental roll, patrullerar ständigt kroppen i sökandet efter främmande strukturer eller skadade celler. När en bindning sker mellan PRRs och DAMPs eller PAMPs aktiveras cellerna och stimuleras till att utsöndra olika molekyler, exempelvis cytokiner. Detta initierar inflammationsprocessen vilken ökar blodflödet och lockar fler defensiva celler, exempelvis neutrofila granulocyter, till platsen (Tizard, 2012).

Det förvärvade immunförsvaret tar längre tid på sig att reagera och är verksamt först efter dagar till veckor. Till skillnad från det medfödda försvaret har det ett minne vilket gör att igenkänning och eliminering av ett infektionsämne kan ske mycket snabbt om det infekterar kroppen upprepade gånger. Det förvärvade immunförsvaret har förmågan att känna igen ett mycket brett spektrum av främmande molekyler. Försvaret kan delas upp i två delar – det humoral, som agerar exogent, och det cellmedierade, som verkar endogent. Den humoral delen av immunförsvaret använder sig av antikroppar i sitt försvar. Antikroppar är så kallade immunoglobuliner som utsöndras från B-celler. Dessa har förmågan att binda specifikt till antigen och verka neutraliserande eller märka ut antigenet så immunförsvarsceller kan känna igen och eliminera det främmande ämnet. Det finns fem olika klasser av immunoglobuliner (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD) uppdelade med avseende på dess uppbyggnad (se figur 1), vilken är anpassad för i vilken miljö de ska verka i samt mot vilket infektionsämne de huvudsakligen är riktade mot (Tizard, 2012).



Figur 3. Schematisk bild av en antikropps uppbyggnad, enligt Tizard 2012.

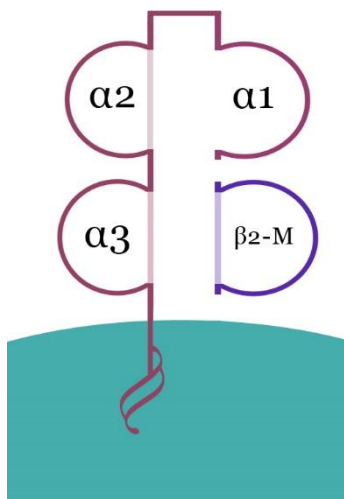
Aktivering av det förvärvade immunförsvaret sker då ett antigen har identifierats som främmande vilket sker genom så kallad MHC-beroende antigenpresentation. Denna presentation sker för T-celler och för att dessa ska kunna identifiera ett antigen måste detta först processas till korta peptidfragment som binder till så kallad MHC-molekyler vilka sedan



uttrycks på cellytan av en antigenpresenterande cell (APC). Flera olika celltyper kan ha en antigenpresenterande förmåga, men vissa celler klassas som professionella antigenpresenterande celler. Dessa utgörs av B-lymfocyter, makrofager och dendritiska celler. Denna MHC-beroende antigenpresentation av APC leder till aktivering av T-hjälparceller eller T-mördarceller (Tizard, 2012).

MHC står för Major Histocompatibility Complex och är en samling gener som kodar för de glykoprotein som MHC-molekylerna består av. MHC består av tre olika klasser (I-III) vilka är uppdelade efter de olika locin som finns (Zinkernagel & Doherty, 1974; 1997; Doherty & Zinkernagel, 1975). Hundens MHC kallas för DLA (Dog Leukocyte Antigen) och är lokaliserat på kromosom 12 (Eren & Travers, 2000; Tizard, 2012).

### **MHC I**



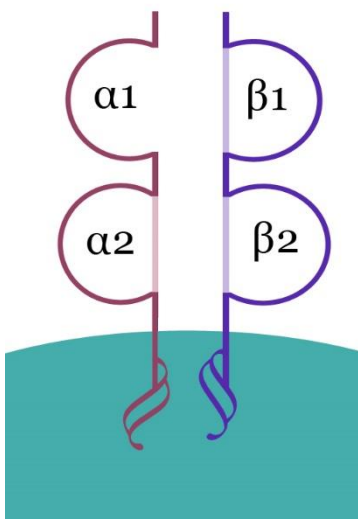
Figur 4. Schematisk bild av den antigenpresenterande delen MHC I enligt Lechler et al. (2002).

MHC I-molekylerna uttrycks på de flesta kärnförande celler, förutom neuronerna, och dess uppgift är framför allt att presentera endogent antigen – sådant som härstammar från intracellulära patogener, exempelvis virus och skadade celler. MHC klass I är uppbyggt av en alfakedja bestående av tre extracellulära domäner,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  och  $\alpha 3$ , varav  $\alpha 1$  och  $\alpha 2$  utgör den antigenbindande delen. Utöver dessa tre delar finns även transmembran och en cytoplasmisk domän. Kopplat till alfakedjan sitter en betydligt mindre kedja –  $\beta 2$ -mikroglobulin, vars uppgift är att verka stabiliserande. MHC I binder framför allt kortare antigenpeptider (se figur 2) (Eren & Travers, 2000; Tizard, 2012).

De T-celler som känner igen antigen presenterat på MHC I är så kallade cytotoxiska T-celler (CD8+). Hos vissa celler, exempelvis virusinfekterade eller tumöromvandlade celler, kan förmågan att uttrycka MHC I hämmas eller gå förlorad, något som NK-celler uppfattar. De kommer då inducera apoptos hos den drabbade cellen (Eren & Travers, 2000; Tizard, 2012).

## MHC II

MHC klass II-regionen hos hund är ungefär 711 Kb långt och utgörs av fyra MHC klass II-loci: DLA-DRA, DLA-DRB1, DLA-DQA1 och DLA-DQB1. DLA-DRA är monomorft, de övriga polymorfa. MHC är det gensystem hos däggdjur, fåglar och andra ryggradsdjur som uppvisar störst polymorfism (Borghans *et al.*, 2014). Det finns artvariationer mellan olika loci; exempelvis finns det ett extremt högt antal DRB-alleler hos människa men antalet hos hund är relativt lågt. MHC II uttrycks normalt endast på professionella antigenpresenterande celler vilka utgörs av dendritiska celler, makrofager och aktiverade B-celler. Hos andra celltyper kan MHC klass II-uttryck induceras genom bland annat  $\gamma$ -interferonberoende signaltransduktion. MHC II-beroende antigenpresentation sker för T-hjälparceller (CD4+) (Eren & Travers, 2000; Miller *et al.*, 2012; Tizard, 2012).



Figur 5. Schematisk bild av den antigenpresenterande delen MHC II enligt Lechler *et al.* (2002).

Strukturellt består MHC II av en alfakedja och en betakedja där båda passerar cellmembranet. Alfakedjan består av  $\alpha 1$  och  $\alpha 2$  och betakedjan består av  $\beta 1$  och  $\beta 2$ . Den antigenbindande delen utgörs av  $\alpha 1$  och  $\beta 1$  (se figur 3). Det är denna del, vilken utgör en sorts antigenbindande ficka, som uppvisar variation mellan individer, vilket är ett resultat av polymorfin hos MHC. MHC II har förmågan att binda längre peptider än MHC I (Eren & Travers, 2000).

När en T-cell introduceras för ett antigenfragment på MHC II krävs ytterligare aktiverings-signaler från komplementära molekyler och ligander. Cellen kommer då dela sig och producera fler T-hjälparceller och viktiga cytokiner, men även minnesceller och effektorceller som hjälper till att reglera immunförsvaret (Eren & Travers, 2000; Miller *et al.*, 2012; Tizard, 2012).

## MHC III

Den tredje klassen av MHC kodar för olika proteiner och inflammatoriska mediatorer, exempelvis komplementfaktorer. (Tizard, 2012)

## MHC och sjukdom

Som tidigare nämnts kan det förvärvade immunförsvaret reagera på ett mycket stort antal olika antigen. Förmågan är beroende av vilken alleluppsättning individen har, det vill säga vilka olika varianter av MHC-molekyler generna kodar för. Detta innebär att hundar som är heterozygota visar upp ett bredare spektrum av MHC-molekyler än de som är homozygota och således kan de reagera mot ett större antal antigen. Polymorfismen inom MHC II är omfattande, även om det i vissa fall endast skiljer enstaka baspar mellan olika alleler. Resistens mot infektioner och evolutionär fitness är drivande faktorer bakom polymorfin och det är biologiskt fördelaktigt att ära vissa allelkombinationer (Eren & Travers, 2000; Kennedy *et al.*, 2002a; 2002b; Tizard, 2012).

En samling specifika alleler kallas för haplotyp. Inom en hundras är variationen mellan haplotyper ofta liten och homozygoti är därför inte ovanligt. Detta till skillnad från humansidan, där homozygoti är extremt ovanligt. Många nya hundraser har skapats genom avel på kort tid och inte sällan härstammar de från en liten genpool på grund av hård selektion och inavel. Homozygota individer är mer frekvent förekommande inom ovanliga raser. Generellt sett uppvisar MHC klass II hos hund en homozygotigrad på över 35 %. Mellan olika hundraser är avvikelser i haplotyper mer omfattande och vissa haplotyper verkar vara bundna till en specifik hundras. MHC klass II uppvisar en stark kopplingsojämvikt vilket innebär att generna ofta kan ses i vanligt förekommande uppsättningar. Detta betyder att en specifik DRB1 ofta nedärvs tillsammans med specifika alleler vid närliggande DQA1 och DQB1-loci. Detta leder till att vissa kombinationer av DRB1, DQA1 och DQB1 bildar haplotyper. Överkorsningar sker dock i regionen och DQA uppvisar en större variation i sina kombinationer med DQB. Skillnader i MHC-uppsättning är en sannolik förklaring till det faktum att immunrespons skiljer sig mellan individer och hundraser, exempelvis vid vaccination eller i försvaret mot olika sjukdomar. (Kennedy *et al.*, 2002a; 2002b; 2007a; 2007b; Wilbe *et al.*, 2010)

Det är sedan tidigare känt att MHC klass II utgör en genetisk riskfaktor kopplad till flertalet olika sjukdomar av autoimmun karaktär hos hund. Beroende på vilken alleluppsättning en individ har kan det innebära en risk eller utgöra en skyddande faktor för utvecklingen av en viss sjukdom (Kennedy *et al.*, 2002a).

Gällande juvenil demodikos och dess koppling till MHC klass II har endast en studie genomförts på hund. Den gjordes 2010 av It *et al.* och där användes mikrosatelliter för att identifiera alleler kopplade till juvenil demodikos. Studiepopulationen utgjordes av 56 individer bestående av boxer, argentinska mastiffer och blandrashundar. Författarna identifierade två alleler vilka var statistiskt signifikant associerade med ökad risk för sjukdom (It *et al.*, 2010). På humansidan har korrelation mellan HLA (human leukocyte antigen) och demodikos studerats och kopplingar mellan MHC-I-alleler och sjukdomen påvisats. I en studie sågs även ett minskat antal NK-celler hos personer med riskalleler i jämförelse med kontrollgruppen (Akilov & Mumcuoglu, 2003; Mumcuoglu & Akilov, 2005).

Leishmanios är en annan parasitärorsakad sjukdom som misstänks ha kopplingar till MHC II. Hos hund orsakas sjukdomen av *Leishmania spp.* som är en intracellulär, vektorburen parasit vilken även smittar till människa. Parasiten ger upphov till både ett cellulärt och humoralt

immunförsvar, men det är det cellulära som är essentiellt för bekämpning av sjukdomen. Ett kraftigt antikroppssvar är ofta kontraproduktivt och associerat med allvarigare sjukdomssymtom. Varför vissa individer drabbas hårdare än andra av leishmanios är inte helt klarlagt, men ett nedsatt immunförsvar eller ung ålder innebär riskfaktorer hos människa, detta är dock ännu ej utvärderat hos hund (Quinnell *et al.*, 2003; Soutter *et al.*, 2018).

Något som styrker misstanken om att en genetisk faktor skulle ha betydelse för leishmanios är det faktum att alla hundraser inte verkar drabbas lika hårt av sjukdomen. Exempel på detta är Ibizaian hound. Hundar från denna ras verkar vara resistenta mot sjukdomen och det har visats att deras immunförsvar klarar av att motverka klinisk sjukdom vid exponering (Martínez-Orellana *et al.*, 2017). I en av de studier som genomförts avseende MHC klass II:s koppling till leishmanios undersöktes naturligt infekterade hundar i ett område där leishmanios förekom endemiskt. Hundarna bestod av två grupper; en med seronegativa hundar från det aktuella området, samt en grupp med hundar från ett icke endemiskt område som förflyttades till studieområdet. Under studietiden undersöktes hundarna med avseende på klinisk bild, parasitdetektion med PCR samt IgG-nivåer och lymfoproliferativ respons. En DLA-DRB1-allel kunde associeras med större sannolikhet för positivt PCR-resultat samt höga IgG-nivåer. Däremot kunde inga signifikanta kopplingar till den kliniska bilden påvisas (Quinnell *et al.*, 2003). Ytterligare en studie utfördes 2018 av Soutter *et al.* där 90 stycken klinisk infekterade beaglar ingick. Hundarna grupperades sedan utefter infektionsdos. Klinisk bild, ELISA och detektion av parasiten med PCR användes som diagnostiska parametrar. Resultatet i denna studie var varierande och det sågs ingen koppling mellan klinisk bild och DLA. En haplotyp kunde associeras med höga antikropps-nivåer, men detta var inte förekommande i alla grupper. Författarna drog slutsatsen om att ytterligare studier på större populationer krävs för att definitivt kunna fastställa en koppling mellan leishmanios och DLA. Ingen av hundarna i studien hade den DLA-DRB1-allel Quinnell *et al.* pekat ut som en potentiell riskfaktor i sin studie från 2003 (Soutter *et al.*, 2018).

Diabetes, hypoadrenokorticism, immunmedierad hemolytisk anemi, symmetrisk lupoid onychodystrofi och nektrotiserande meningoencephalit är exempel på sjukdomar med autoimmun komponent vilka också har ett samband mellan MHC klass II hos vissa hundraser. För dessa har både skyddande och riskhaplotyper identifierats (Kennedy *et al.*, 2006a; 2006b; 2006c; Greer *et al.*, 2010; Wilbe *et al.*, 2010). Då denna koppling tydligt visats för andra sjukdomar var målet med denna studien att utröna om sådana associationer föreligger även för juvenil demodikos och MHC klass II.

## MATERIAL OCH METODER

I studien ingick totalt 215 hundar, 90 stycken mopsar och 125 stycken Staffordshire bullterrier (se Tabell 1). Inklusionskriterierna för friska kontroller innefattade att hunden uppnått en ålder av minst tre år och djurägaren intygade att hunden aldrig diagnostiserats med demodikos. Majoriteten av de friska kontrollerna (>90 %) genomgick vid tillfället för blodprovstagning dessutom klinisk undersökning och uppvisade djupa skrapprover samt trikogram negativa avseende demodexkvalster vid direktmikroskopering. Definitionen för fall utgjordes av att hundarna skulle ha eller ha haft demodikos och där diagnosen ställts på en klinik av veterinär med hjälp av kliniska symtom och påvisande av parasiten i hudprov före ett och ett halvt års ålder. I de flesta fall medgav djurägarna tillgång till journalkopia. Vid provtagningstillfället kunde fallen vara vid vilken ålder som helst.

Tabell 1. *Fördelning av antal fall och kontroller av hundarna i studiepopulationen, avseende på hundras och kön*

Provmaterial	Staff. Bullterrier, antal	Mops, antal
<b>Fall</b>	43	40
♀ / ♂ / okänt	31 / 0 / 12	0 / 32 / 8
<b>Kontroll</b>	82	50
♀ / ♂ / okänt	8 / 4 / 70	2 / 9 / 38

Från samtliga hundar togs blodprov i 4ml EDTA-rör. Genomiskt DNA extraherades sedan från dessa med hjälp av QIAasyphony DSP DNA Midi Kit (QIAGEN). Koncentrationen av preparerat DNA bestämdes med hjälp av spektrofotometri (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific) och koncentrationerna varierade mellan 61ng/μl - 166ng/μl. Samtliga prover spädades sedan i en 1:20-spädning med nukleasfritt vatten.

PCR och sekvensering genomfördes med BigDye Direct Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, 2018) och protokollet var det samma för DLA-DRB1, DLA-DQA1 och DLA-DQB1. Primrarna som användes var märkta med en M13-sekvens (se Tabell 2 för primrar som användes vid PCR, komponenter som användes i PCR-reaktion 1 i Tabell 3 samt vilket temperaturprotokoll som användes för PCR-reaktion 1 i Tabell 4).

Tabell 2. *Primrar som användes i studien, enligt Kennedy et al. 2007*

	Forward	Reverse
<b>DLA-DRB1</b>	gat ccc ccc gtc ccc aca g	cgc ccg ctg cgc tea
<b>DLA-DQA1</b>	taa ggt tct ttt ctc cct ct	gga cag att cag tga aga ga
<b>DLA-DQB1</b>	ctc act ggc ccg gct gtc tc	cac ctc gcc gct gca acg tg
<b>M13</b>	tgt aaa acg acg gcc agt	cag caa aca gct atg acc

## PCR 1

Tabell 3. Komponenter för PCR-reaktion 1

Komponenter	Volym
Genomiskt DNA (koncentration ca 4ng/μl)	1μl
PCR primermix (0,8μM per primer)	1,5μl
Big Dye® Direct PCR Master Mix	5μl
Nukleasfritt vatten	2,5μl
Total volym per reaktion	10μl

Tabell 4. Temperaturprotokoll för PCR-reaktion 1

Temperatur	Tid
95°C	5 min
96°C	30 s
62°C	45 s
68°C	45 s
72°C	2 min

} x 35

## PCR 2

För varje reaktion tillsattes sedan reagenser definierade i Tabell 5 nedan. I Tabell 6 ses temperaturprotokoll för PCR-reaktion 2.

Tabell 5. Komponenter tillsatta inför PCR-reaktion 2

	Volym
Big Dye® Sequencing Master Mix	2μl
Big Dye® Direct M13 Fwd. primer <i>eller</i> Big Dye® Direct M13 Rev. primer	1μl
<b>Total volym tillsatt per reaktion</b>	<b>3μl</b>

Tabell 6. Temperaturprotokoll för PCR-reaktion 2

Temperatur (°C)	Tid
37°C	15 min
80°C	2 min
96°C	1 min
96°C	10 s
50°C	5 s
60°C	75 s

} x 25

## **Rening**

Innan kapillärelektroforesen genomfördes ett reningssteg för att rena bort överflödiga deoxynukleotidfosfater. Komponenter för reningssteg ses i Tabell 7.

Tabell 7. *Reningskomponenter tillsatta till reaktioner innan kapillärelektrofores*

<b>Komponenter</b>	<b>Volym</b>
SAM™ Solution	45µl
XTerminator® Solution	10µl
<b>Total volym tillsatt per reaktion</b>	<b>55µl</b>

Proverna vortexades vid 2500rpm i 15 min och centrifugerades därefter i två minuter, 1000 x g.

## **Sekvensering och analys**

Kapillärelektrofores användes för sekvensering av PCR-produkterna och utfördes med en 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Elektroferogrammen tolkades och bearbetades i programmet Codon Code Aligner (Codon Code Corporation) och för identifiering av DLA klass II exon 2-sekvenserna användes Basic Local Aligner Search Tool (BLAST!) (NCBI US National Library for Medicine, 2018) mot NCBI's genbank (NCBI, 2018) samt databasen IPD-MHC (EMBL-EBI, 2018). För prover insamlade och karakteriserade vid ett tidigare tillfälle användes programmet MatchToolNavigator och sekvenserna identifierades sedan med hjälp av en databas för allelidentifikation.

## **Statistik**

För de statistiska beräkningarna i arbetet användes ett program tillgängligt på VassarStats hemsida (VassarStats, 2018). Med hjälp av en Chi square 2x2-tabell beräknades Yates p-värde samt Odds ratio.

## RESULTAT

### Mops

#### *DLA klass II-alleler*

##### *DLA-DRB1*

Bland de totalt fyra DRB1-allelerna var DRB1\*01501 den överlägset vanligaste med en frekvens på 49,5 %. Även DRB1\*01502 och DRB1\*010011 var ofta förekommande med frekvenser på 29,4 % respektive 17,8% (se Tabell 8). Ingen av DRB1-allelerna uppvisade ett statistiskt signifikant samband gällande ökad eller minskad risk för att utveckla juvenil demodikos. En ny allel identifierades, vilken förekom i homozygot form hos en individ och kallas i denna studie för DRB1\*01501DH1.

##### *DLA-DQA1*

DQA1\*00601 var mycket vanlig, hade en frekvens på 78,9% och utgjorde majoriteten av de tre DQA1-allelerna (se Tabell 8). Inte heller här sågs något statistiskt signifikant samband mellan allel och fall eller kontroller.

##### *DLA-DQB1*

Åtta olika DQB1-alleler identifierades bland mopsarna i studien och majoriteten (41,1%) av dessa utgjordes av DQB1\*02301, följt av DQB1\*02601 (23,3%) samt DQB1\*01501 (18,9%). DQB1\*02301 uppvisade en statistisk signifikant skyddande effekt ( $p=0,0155$ ) och \*02601 utgjorde en statistisk signifikant riskallel ( $p=0,0386$ ) (se Tabell 8).

Tabell 8. *DLA klass II-alleler och dess frekvens i studiepopulationen, mops*

<b>Allel DRB1</b>	<b>Totalandel (antal)</b>	<b>Andel fall (antal)</b>	<b>Andel kontroller (antal)</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>p-värde</b>
<b>*01501</b>	49,5% (89)	52,5% (42)	47% (47)	1,2464	0,5598
<b>*010011</b>	17,8% (32)	22,5% (18)	14% (14)	1,7834	0,1990
<b>*00601</b>	3,3% (6)	2,5% (2)	4% (4)	0,6154	-
<b>*01502</b>	29,4% (53)	22,5% (18)	35% (35)	0,5392	0,0960
(4)	(180)	(80)	(100)		
<b>Allel DQA1</b>					
<b>*00601</b>	78,9% (142)	75% (60)	82% (82)	0,6585	0,3375
<b>*00201</b>	17,8% (32)	22,5% (18)	14% (82)	1,7834	0,1990
<b>*005011</b>	3,3% (6)	2,5% (2)	4% (4)	0,6154	-
(3)	(180)	(80)	(100)		
<b>Allel DQB1</b>					
<b>*01501</b>	17,8% (32)	23,8% (19)	13% (13)	2,0845	0,0931
<b>*02301</b>	41,1% (74)	30% (24)	50% (50)	0,4286	0,0155
<b>*02601</b>	23,3% (42)	31,2% (25)	17% (17)	2,2193	0,0386
<b>*02201</b>	6,7% (12)	7,5% (6)	6% (6)	1,2703	0,9203



<b>*00701</b>	3,9% (7)	2,5% (2)	5% (5)	0,4872	-
<b>*02002</b>	2,2% (4)	2,5% (2)	2% (2)	1,2564	-
<b>*00301</b>	3,9% (7)	2,5% (2)	5% (5)	0,4872	-
<b>*01501DH1</b>	1,1% (2)	(0)	2% (2)	0	-
(8)	(180)	(80)	(100)		

Huruvida homozygoti innebar en fördel eller nackdel för den skyddande respektive riskallelen undersöktes också. DQB1\*02301 uppvisade en tendens till att utgöra en fördel för homozygota individer, men effekten var ej statistiskt signifikant ( $p=0,0534$ ) (se Tabell 9).

Tabell 9. *Förekomst av homozygoti avseende riskallel och allel med skyddande effekt, mops*

<b>Homozygoti DQB1-allel</b>	<b>Antal fall</b>	<b>Antal fall homozygota</b>	<b>Antal kontroller</b>	<b>Antal kontroller homozygota</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>p-värde</b>
<b>*02301</b>	24	2	50	16	0,1932	0,0534
<b>*02601</b>	25	1	17	2	0,3125	-

### **Haplotyper**

Hos mops kunde 12 olika DLA klass II-haplotyper identifieras (se Tabell 10). Två haplotyper, varav den ena inkluderade den tidigare nämnda nya allelen (DRB1\*01501DH1), förekom enbart hos två olika hundar. Dessa klassas i tabellen nedan som ej numrerade haplotyper då de är i för litet antal för att kunna dra några statistiska slutsatser ifrån. De är dock inkluderade i det totala antalet kontroller.

Den vanligaste haplotypen i populationen var haplotyp 3;

DRB1\*01501/DQA1\*00601/DQA1\*02301 med en frekvens på 23,3 %.

Därefter följde haplotyp 1, DRB1\*01502/DQA1/\*00601/DQB1\*02301, och haplotyp 2, DRB1\*010011/DQA1\*00201/DQB1\*01501, med frekvenser på 18,3 % respektive 17,2 %.

Haplotyp 1, DRB1\*01502/DQA1/\*00601/DQB1\*02301, uppvisade en skyddande effekt ( $p=0,0169$ ) (se Tabell 11). Det gick inte att dra några slutsatser om huruvida homozygoti av aktuell haplotyp var fördelaktigt (se Tabell 12).

Tabell 10. *De 12 haplotyper identifierade i studiepopulationen, mops*

<b>DRB1</b>	<b>DQA1</b>	<b>DQB1</b>	<b>Haplotyp</b>
*01502	*00601	*02301	<b>1</b>
*010011	*00201	*01501	<b>2</b>
*01501	*00601	*02301	<b>3</b>
*01501	*00601	*02601	<b>4</b>
*01502	*00601	*02601	<b>5</b>
*01501	*00601	*02201	<b>6</b>

*00601	*005011	*00701	<b>7</b>
*01501	*00601	*02002	<b>8</b>
*01501	*00601	*00301	<b>9</b>
*01502	*00601	*02201	<b>10</b>
*01501	*00601	*01501	<b>11</b>
*01501	*00601	*00701	<b>12</b>

Tabell 11. *Frekvens av förekommande haplotyper, mops*

Haplotyp	Totalandel (antal)	Andel sjuka (antal)	Andel friska (antal)	Odds ratio	p-värde
<b>1</b>	18,3% (33)	10% (8)	25% (25)	0,3333	0,0169
<b>2</b>	17,2% (31)	22,5% (18)	13% (13)	1,9429	0,1389
<b>3</b>	23,3% (42)	20% (16)	26% (26)	0,5234	0,0954
<b>4</b>	13,9% (25)	20% (16)	9% (9)	2,5278	0,0571
<b>5</b>	8,9% (16)	11,2% (9)	7% (7)	1,6841	0,4624
<b>6</b>	5% (9)	6,2% (5)	4% (4)	1,6	-
<b>7</b>	2,9% (5)	2,5% (2)	3% (3)	0,8291	-
<b>8</b>	2,2% (4)	2,5% (2)	2% (2)	1,2564	-
<b>9</b>	3,3% (6)	2,5% (2)	4% (4)	0,6154	-
<b>10</b>	1,1% (2)	1,3% (1)	1% (1)	1,2532	-
<b>11</b>	1,1% (2)	1,3% (1)	1% (1)	1,2532	-
<b>12</b>	1,1% (2)	0% (0)	2% (2)	0	-
<b>Ej numrerad</b>	1,7% (3)	0% (0)	3% (3)	0	-
	(180)	(80)	(100)		

Tabell 12. *Förekomst av homozygoti avseende skyddande haplotyp, mops*

Homozygoti haplotyp	Antal fall	Antal fall homozygota	Antal kontroller	Antal kontroller homozygota	Odds ratio	p-värde
1	8	0	25	3	0	-

## Staffordshire bullterrier

### DLA klass II-alleler

Hos 35 av hundarna utgick DQB1 då sekvensering av dessa misslyckades trots upprepade försök.

### DLA-DRB1

I studien identifierades nio stycken DRB1-alleler. Bland dessa var DRB1\*00101 den vanligaste med en frekvens på 33,5 %. Därefter följde DRB1\*00201 och DRB1\*01501 med frekvenser på 21,8 respektive 17,8 %. DRB1\*01301 uppvisade en skyddande effekt ( $p=0,0178$ ) och utgjorde

14,9 % av DRB1-allelererna (se Tabell 13). Det innebar inte något ökat skydd att vara homozygot för den aktuella allelen (se Tabell 14).

#### *DLA-DQA1*

Sex stycken DQA1-alleler identifierades hos Staffordshire bullterrierpopulationen och det var allel DQA1\*00101 som förekom i högst frekvens (50 %) (se Tabell 13). Ingen statistiskt signifikant association varken för ökad risk eller skyddande effekt kunde ses hos någon av DQA1-allelererna.

#### *DLA-DQB1*

Bland de tio DQB1-alleler som hittades förekom DQB1\*00201 samt DQB1\*00101 mest frekvent, 51,8 % respektive 26,5 %. Två nya DQB1-alleler hittades i studien, vilka här namnges DQB1\*02301DH1 och DQB1\*02301DH2 (se Tabell 13). Liksom för DQA1 kunde inga associationer till förhöjd risk eller skyddande faktorer göras för DQB1-allelererna.

Tabell 13. *DLA klass II-alleltyper och dess frekvens i studiepopulationen, Staffordshire bullterrier*

<b>Allel DRB1</b>	<b>Totalandel (antal)</b>	<b>Andel fall (antal)</b>	<b>Andel kontroller (antal)</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>p-värde</b>
<b>*01501</b>	17,8% (44)	15,1% (13)	19,1% (31)	0,7525	0,5376
<b>*01301</b>	14,9% (37)	7% (6)	19,1% (31)	0,3169	0,0178
<b>*01801</b>	4% (10)	3,5% (3)	4,3% (7)	0,8003	-
<b>*00201</b>	21,8% (54)	17,3% (15)	24,1% (39)	0,6663	0,2965
<b>*00101</b>	33,5% (83)	38,4% (33)	30,9% (50)	1,2898	0,4424
<b>*00601</b>	4,4% (11)	8,1% (7)	2,5% (4)	3,5	-
<b>*01503</b>	1,6% (4)	4,7% (4)	0% (0)	$\infty$	-
<b>*010011</b>	0,4% (1)	1,2% (1)	0% (0)	$\infty$	-
<b>*01502</b>	1,6% (4)	4,7% (4)	0% (0)	$\infty$	-
(9)	(248)	(86)	(162)		
<b>Allel DQA1</b>					
<b>*00901</b>	36% (88)	33,3% (28)	37,5% (60)	0,7062	0,2878
<b>*00101</b>	50% (122)	46,4% (39)	51,9% (83)	0,804	0,5023
<b>*01501</b>	0,8% (2)	0% (0)	1,1% (2)	0	-
<b>*00601</b>	8,3% (20)	9,5% (8)	7,5% (12)	0,8022	0,8415
<b>*005011</b>	3,3% (8)	6% (5)	2% (3)	3,3122	-
<b>*00401</b>	1,6% (4)	4,8% (4)	0% (0)	$\infty$	-
(6)	(244)	(84)	(160)		
<b>Allel DQB1</b>					
<b>*00201</b>	51,8% (90)	47,3% (35)	55% (55)	0,7343	0,3929
<b>*00101</b>	26,5% (46)	27% (20)	26% (26)	1,0542	1

<b>*02301</b>	8% (14)	4,1% (3)	11% (11)	0,3419	0,1670
<b>*00802</b>	4% (7)	4,1% (3)	4% (4)	1,0141	-
<b>*00701</b>	4,7% (8)	5,3% (4)	4% (4)	1,3714	-
<b>*02301DH1</b>	1,1% (2)	2,7% (2)	0% (0)	$\infty$	-
<b>*02301DH2</b>	1,1% (2)	2,7% (2)	0% (0)	$\infty$	-
<b>*01303</b>	1,1% (2)	2,7% (2)	0% (0)	$\infty$	-
<b>*01701</b>	1,1% (2)	2,7% (2)	0% (0)	$\infty$	-
<b>*02001</b>	0,6% (1)	1,4% (1)	0% (0)	$\infty$	-
(10)	(174)	(74)	(100)		

Tabell 14. *Förekomst av homozygoti avseende skyddande allel, Staffordshire bullterrier*

<b>Homozygoti DRB1-allel</b>	<b>Antal fall</b>	<b>Antal fall homozygota</b>	<b>Antal kontroller</b>	<b>Antal kontroller homozygota</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>p-värde</b>
<b>*01301</b>	6	0	31	3	0	-

### **Haplotyper**

Hos Staffordshire bullterrier kunde 17 olika haplotyper identifieras (se Tabell 15). Två av haplotyperna innehåller de nya DQB1-allelerna som nämns i stycket ovan. 22 haplotyper förekom endast en gång hos separata hundar och har således inte inkluderats i haplotyplistan nedan. De bidrar endast till den totala mängden fall och kontroller och klassas då som ej numrerade.

Tabell 15. *De 17 haplotyper som identifierades i studiepopulationen, Staffordshire bullterrier*

<b>DRB1</b>	<b>DQA1</b>	<b>DQB1</b>	<b>Haplotyp</b>
*01301	*00101	*00201	<b>1</b>
*00101	*00101	*00201	<b>2</b>
*01501	*00601	*02301	<b>3</b>
*00201	*00901	*00101	<b>4</b>
*00101	*00101	*00101	<b>5</b>
*01501	*00901	*00201	<b>6</b>
*00201	*00101	*00101	<b>7</b>
*00201	*00901	*00201	<b>8</b>
*00601	*005011	*00701	<b>9</b>
*01503	*00601	*002301DH1	<b>10</b>
*01801	*00101	*00802	<b>11</b>
*00601	*00901	*00701	<b>12</b>
*01801	*00901	*00802	<b>13</b>
*01501	*00901	*02301	<b>14</b>

*00201	*00601	*00101	<b>15</b>
*01301	*00901	*00201	<b>16</b>
*01503	*00601	*02301DH2	<b>17</b>

Den vanligaste DLA klass II-haplotypen i populationen var haplotyp 2; DRB1\*00101/DQA1\*00101/DQA1\*00201 med en frekvens på 22,2 %.

Därefter följde haplotyp 1, DRB1\*01301/DQA1\*00101/DQB1\*00201, och haplotyp 5, DRB1\*00101/DQA1\*00101/DQB1\*00101, med haplotypfrekvenser på 13,1 % respektive 10,2 % (se Tabell 16).

Det gick inte att definiera någon statistiskt signifikant koppling mellan någon av haplotyperna och dess förekomst hos fall respektive kontroller.

Tabell 16. *Frekvens av förekommande haplotyper i studiepopulationen, Staffordshire bullterrier*

Haplotyp	Totalandel (antal)	Andel sjuka (antal)	Andel friska (antal)	Odds ratio	P-värde
<b>1</b>	10,2% (18)	5,3% (4)	14% (14)	0,3413	0,1003
<b>2</b>	22,2% (39)	19,8% (15)	24% (24)	0,7787	0,6242
<b>3</b>	5,1% (9)	2,6% (2)	7% (7)	0,3591	-
<b>4</b>	4% (7)	5,3% (4)	3% (3)	1,7963	-
<b>5</b>	13,1% (23)	15,8% (12)	11% (11)	1,241	0,7913
<b>6</b>	7,4% (13)	11,9% (9)	4% (4)	3,2239	0,0931
<b>7</b>	4% (7)	2,6% (2)	5% (5)	0,5135	-
<b>8</b>	6,3% (11)	6,6% (5)	6% (6)	1,1033	-
<b>9</b>	1,7% (3)	3,9% (3)	0% (0)	$\infty$	-
<b>10</b>	1,1% (2)	2,6% (2)	0% (0)	$\infty$	-
<b>11</b>	2,8% (5)	2,6% (2)	3% (3)	0,8739	-
<b>12</b>	1,7% (3)	1,3% (1)	2% (2)	0,6533	-
<b>13</b>	1,1% (2)	1,3% (1)	1% (1)	1,32	-
<b>14</b>	1,7% (3)	0% (0)	3% (3)	0	-
<b>15</b>	2,3% (4)	0% (0)	4% (4)	0	-
<b>16</b>	2,8% (5)	1,3% (1)	4% (4)	5,5	-
<b>17</b>	1,1% (2)	2,6% (2)	0% (0)	$\infty$	-
<b>Ej numrerade</b>	11,4% (22)	14,5% (13)	9% (9)		
	(176)	(76)	(100)		

## DISKUSSION

Hos rasen mops kunde i denna studie en riskallel (DQB1 \*02601,  $p=0,0386$ ) och en allel med skyddande effekt (DQB1 \*02301,  $p=0,0155$ ) samt en haplotyp med skyddande effekt (DRB1\*01502/DQA1/\*00601/DQB1\*02301,  $p=0,5376$ ) identifieras.

Hos Staffordshire bullterrier hittades en allel med skyddande effekt (DRB1\*01301,  $p=0,0178$ ) (se Tabell 17). Det är dessa alleler och haplotyp som uppvisar ett statistiskt signifikant resultat och således endast dessa det går att dra några slutsatser av rörande deras betydelse för utvecklingen av juvenil demodikos. Huruvida en homozygot individ drar fördel av att ha dubbel uppsättning av skyddande alleler/haplotyp eller om en individ är homozygot avseende på en riskallel utgör ökad risk att utveckla sjukdom i jämförelse med en heterozygot går inte att fastställa. Resultatet indikerar att det är tillräckligt att vara heterozygot för den skyddande MHC klass II-typen för att kunna få en aktiv immunrespons mot, i detta fall, *Demodex*parasiten. Hos mops uppvisar den skyddande allelen DQB1\*02301 en tendens till att vara fördelaktig för de homozygota individerna men  $p$ -värdet ligger strax över 0,05, varför sådana slutsatser ej bör dras från denna studie.

Bland hundarna av rasen Staffordshire bullterrier kunde en skyddande allel ses, dock ingen riskallel eller riskhaplotyp. En tänkbar orsak till detta skulle kunna vara det faktum att det finns en riskallel eller riskhaplotyp men att denna är för frekvent förekommande i rasen och således finns den även hos ett stort antal friska hundar vilket gör att den inte kan identifieras.

Tabell 17. Sammanställning av alleler och haplotyp med ökad risk eller skyddande effekt i studien

Allel	Ras	Totalandel (antal)	Andel fall (antal)	Andel kontroller (antal)	Odds ratio	p-värde	Risk/skyddande
<b>DQB1*02301</b>	Mops	41,1% (74)	30% (24)	50% (50)	0,4286	0,0155	Skyddande
<b>DQB1*02601</b>	Mops	23,3% (42)	31,2% (25)	17% (17)	2,2193	0,0386	Risk
<b>DRB1*01301</b>	Staff. bullterrier	14,9% (37)	7% (6)	19,1% (31)	0,3169	0,0178	Skyddande
<b>Haplotyp</b>							
<b>DRB1*01502/ DQA1*00601/ DQB1*02301</b>	Mops	18,3% (33)	10% (8)	25% (25)	0,3333	0,0169	Skyddande

I studiepopulationen identifierades två nya alleler (DQB1\*02301DH1 och DQB1\*02301DH2) och det finns även ett flertal haplotyper som endast identifierats hos enstaka individer. I studien har dessa bidragit till totalantalet av fall och kontroller men eftersom de är så sällsynt förekommande har ingen undersökning av den specifika haplotypens association till juvenil demodikos gjorts. Det går inte att utröna om en sådan haplotyp innebär en ökad risk eller har en skyddande effekt då den endast förekommer hos en hund. Sannolikheten att den skulle ha

betydelse är liten med tanke på i vilken låg frekvens den förekommer i jämförelse med andra haplotyper.

I studien uppstod problematik vid sekvensering av DQB1 hos vissa hundar inom Staffordshire Bullterrierpopulationen. Totalt var det 35 hundar av 125 där sekvensering av DQB1 misslyckades trots flertalet försök. Av dessa utgjordes ca 9 % av fall och 35 % av kontroller. Det är tänkbart att detta bortfall har haft en effekt på resultaten i studien. Den allel (DRB1\*01301) som uppvisade statistiskt signifikant association med juvenil demodikos påverkas inte av detta, men att resultaten för DQB1-allelerna samt de olika haplotyperna skulle sett annorlunda ut går inte att utesluta. Att ytterligare studiematerial i form av fler hundar avseende DQB1-alleler och haplotyper skulle kunna bidra till identifikationen av ytterligare alleler och/eller haplotyper vilka uppvisar en statistisk signifikant association med juvenil demodikos är möjligt. För att utvärdera detta krävs en felsökning av sekvenseringen för de saknade DQB1-allelerna, något som ej kunde utföras inom tidsramen för detta projekt.

Generellt sett i studiepopulationen ses en viss grad av homozygoti, 16 av 90 stycken bland mopsarna är homozygota sett till haplotyp och motsvarande siffra är 13 av 88 hundar tillhörande rasen Staffordshire bullterrier. Det ses ingen uppenbar övervikt av homozygoter hos fall- eller kontrollgruppen hos någon av raserna. Siffran för generell homozygoti av MHC II hos hund som anges av Kennedy *et al.* i en artikel från 2002 är över 35 %. I jämförelse med denna siffra uppvisar hundarna i denna studie en lägre grad av homozygoti, 17,8 % (mops) respektive 14,8 % (Staffordshire bullterrier). Det faktum att den generella siffran av homozygoti är så pass hög beror på selekterad avel från en liten ursprungspopulation. Varje specifik hundras, till skillnad från populationer hos människa, är i olika grad inavlade populationer vilket bidrar till homozygotin. Det finns dock exempel på homozygoti även hos utavlade populationer där det innebär en evolutionär fördel. Ett sådant exempel har setts i studier av MHC klass II och sjukdomen malaria hos människa. Där har homozygoti avseende vissa alleler visats vara fördelaktigt för individen (Hill *et al.*, 1995).

För DLA klass II-haplotyper är det generellt sett stor skillnad mellan olika hundraser vilket återspeglas i denna studie då det endast finns två haplotyper som förekommer hos båda raserna; DRB1\*01501/DQA1\*00601/DQB1\*02301 samt DRB1\*00601/DQA1\*005011/DQB1\*00701 (Kennedy *et al.*, 2002a).

Det har inte utförts någon släktskapsundersökning gällande hundarna som ingår i studiepopulationen. En nackdel med att inte veta hundarnas släktmässiga relation är risken för ett stratifierat resultat. Om fall och kontroller har sitt ursprung från separata subpopulationer kan detta innebära att resultatet feltolkas och att ett eventuellt sjukdomssamband inte är sant. Den genetiska skillnaden mellan fall och kontroll skulle i ett sådant fall kunna bero på det faktum att hundarna härstammar från olika subpopulationer och ej är associerat med sjukdom. Insamlingen i denna studie har genomförts på ett geografiskt oberoende sätt, på bland annat rasträffar, vilket innebär att studiepopulationen kommer från flera olika familjelinjer och således minskar risken för ett stratifierat resultat. Risken för stratifiering i denna studie bedöms därför som mindre sannolikt men för att utesluta detta faktum skulle en genome wide associationsstudie kunna utföras.

Urvalet av fall och kontroller i denna studien är till stor del baserat på djurägarens uppgift avseende hundens hälsostatus och tidigare diagnostik. Potentiellt kan en hund felaktigt definieras som fall eller kontroll om djurägaren givit felaktiga uppgifter avseende hundens tidigare sjukdomshistorik.

Som tidigare nämnts har det tidigare endast genomförts en genetisk associationsstudie på juvenil demodikos och dess eventuella association till MHC klass II. Den gjordes 2010 av It *et al.* I studien användes mikrosatelliter för att identifiera alleler kopplade till sjukdomen. Studiepopulationen utgjordes av 56 individer bestående av 19 boxrar, 8 argentinska mastiffer och 29 blandrashundar. Författarna fann två alleler vilka uppvisade en statistiskt signifikant ökad risk för juvenil demodikos hos blandrashundar (It *et al.*, 2010). En svaghet med denna studie är den ringa studiepopulationen, en större studiepopulation hade gett mer tyngd åt resultaten. I studien användes alleler vid mikrosatellitloci i MHC klass II-regionen vilka analyserades med avseende på association för att utveckla juvenil demodikos. Det har inte genomförts någon sekvensering av nukleotidsekvenserna vilket gör att det inte går att säga vilka specifika MHC klass II-alleler respektive individ var bärare av. Således går det endast att uttala sig om att det finns mikrosatellitalleler associerade med en ökad risk för juvenil demodikos och att dessa är associerade med MHC II-regionen, men inte vilka specifika MHC klass II-alleler som förekom på dessa haplotyper. Detta innebär att It *et al.*s studie och resultatet från den här redovisade studien inte är jämförbara med varandra. För att detta ska kunna ske krävs en DLA klass II-genotypning av hundarna som ingick i It *et al.*s studie.

En allel och en haplotyp förekommande i denna studie återfinns även i andra publikationer rörande MHC II och sjukdom hos hund.

Haplotypen DRB1\*01502/DQA1/\*00601/DQB1\*02301, som i denna studie uppvisar en skyddande effekt för juvenil demodikos hos mops, identifierades i en studie rörande hypo-adrenokorticism hos rasen Nova Scotia duck tolling retriever. Dock utgör den där istället en ökad risk för utveckling av sjukdom (Hughes *et al.*, 2010).

Allelen DRB1\*01502 är en vanligt förekommande allel hos båda hundraserna som ingick i studien. Det finns dock ingen statistiskt signifikant koppling mellan DRB1-allelen och fall eller kontroller i någon av studiepopulationerna. I en studie rörande Leishmanios, en annan parasit-sjukdom, och dess koppling till DLA utförd på blandrashundar nämns också DRB1\*01502. Där klassas den som en riskallel. Författarna diskuterar i sin artikel den starka kopplingsjämvikten som förekommer inom MHC och det faktum att det finns en möjlighet att en annan allel inom samma haplotyp skulle kunna utgöra den sanna risken. Då kopplingsjämvikten leder till att den potentiellt sanna riskallelen alltid nedärvs i kombination med DRB1\*01502 innebär det att DRB1\*01502 felaktigt pekats ut som en riskallel. Detta inkluderar även alleler utöver DQA1 och DQB1, exempelvis tumour necrosis factor (TNF)-alleler (Quinnell *et al.*, 2003).

En slutsats som kan dras från denna studie är att den genetiska uppsättningen av MHC klass II spelar roll för huruvida en individ utvecklar juvenil demodikos eller ej.

Det identifieras så väl en riskallel (DQB1\*02601 hos mops) samt en skyddande haplotyp (DRB1\*01502/DQA1/\*00601/DQB1\*02301 hos mops) och två alleler associerade med



minskad risk för att utveckla sjukdom (DQB1 \*02301 hos mops, DRB1\*01301 hos Staffordshire bullterrier). Det kunde inte påvisas något samband gällande ökad risk eller skyddande effekt om hunden var homozygot för allelen/haplotypen i fråga. Fler alleler och haplotyper uppvisade tendenser till att ha betydelse för risk att utveckla juvenil demodikos men resultatet var inte statistiskt signifikant vilket gör att det inte går att dra några slutsatser om detta. Tänkbart är att en utökad studiepopulation skulle kunna utröna deras roll.

Den genetiska association med juvenil demodikos som ses i denna studie kan uttala sig om en förhöjd eller minskad risk gällande utveckling av sjukdom. Det är dock viktigt att påpeka att juvenil demodikos är en multifaktoriell sjukdom beroende på flera genetiska riskfaktorer samt miljöfaktorer och är således inte enbart beroende av den genetiska uppsättningen hos DLA klass II. Detta innebär att det finns hundar med DLA klass II-riskalleler/haplotyper som blir sjuka och vice versa. Avelsråd baserade endast på vilken DLA-genotyp en hund innehar är därför inte lämpligt. Ett sådant urval skulle istället kunna bidra till en selektion av andra genetiska betingade sjukdomar. Studien är en fall-kontrollstudie vilket innebär att frekvensen i studien avseende sjukdom och haplotyper inte reflekterar den totala frekvensen inom mops- eller Staffordshire bullterrierpopulationen.

Denna studie konfirmerar en genetisk association mellan DLA klass II och risk att utveckla juvenil demodikos men för att ytterligare fastställa samband mellan specifika DLA klass II-alleler och haplotyper krävs vidare studier på fler hundar och andra hundraser. En genome wide associationsstudie skulle bidra till säkrare resultat avseende exempelvis stratifiering och bidra med mer information kring sjukdomsassociationen.

## POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

### Juvenil demodikos

Demodikos är en sjukdom orsakad av hårsäckskvalstret *Demodex*. Kvalstret förekommer normalt sett i liten mängd på huden även hos friska hundar men kan orsaka sjukdom när det på grund av ett förändrat immunförsvar får tillfälle att föröka sig i ohämmad mängd (Miller *et al.* 2012). Hos hund överförs parasiten till valparna från moderns hud under de två till tre första levnadsdygna (Greve & Gaafar, 1966).

Demodikos kan delas upp i två ålderskategorier – så kallad juvenil form eller adult form, beroende på när i hundens liv sjukdomen bryter ut. Hundar som utvecklar demodikos innan 12 till 18 månaders ålder klassas som juvenil form (Forsythe, 2012). Gränserna mellan juvenil och adult form är diffusa då vissa hundar bär med sig den juvenila formen odiagnostiserat upp i vuxen ålder. Hundar äldre än fyra år drabbas alltid av den adulta formen. Hos äldre djur är sjukdomen alltid allvarligare då den kan kopplas samman med någon form av generell nedsättning av immunförsvaret vilket ger kvalstren en chans att föröka sig. Orsaker till det generellt nedsatta immunförsvaret kan vara sjukdomar som påverkar hela djuret, exempelvis cancer, parasitsjukdomen leishmanios eller liknande. Detta generellt nedsatta immunförsvaret ses inte hos individer med den juvenila formen (Miller *et al.*, 2012).

Det finns flertalet bakomliggande orsaker till juvenil demodikos och att sjukdomen bryter ut beror sannolikt på en kombination av olika faktorer, så väl genetiska som miljörelaterade. Vissa hundraser har större risk att utveckla juvenil demodikos än hundpopulationen i stort. En ärftlig defekt i immunförsvaret kopplad till dess förmåga att hindra kvalstren att föröka sig ohämmat har pekats ut som en viktig faktor. En typ av immunförsvarsceller, så kallade T-celler, verkar vara involverad i processen (Miller *et al.*, 2012; Ferrer *et al.*, 2014).

Juvenil demodikos klassificeras även utefter sin utbredning och förekommer i lokal eller generell form. Lokal demodikos innebär att hunden har ett fåtal mindre förändringar lokaliserade till ansikte och framben. Klassiskt utseende på förändringarna hos en hund med demodikos är hårlöshet och rodnad i huden. Ibland förekommer klåda. Om hunden istället har förändringar på flertalet ställen, över en hel kroppsdel eller om de är särskilt utbredda klassas demodikosen istället som generell (Miller *et al.*, 2012). Det är inte ovanligt att hundarna dessutom utvecklar komplikationer sekundärt till sjukdomsförloppet i form av sekundära inflammationer och infektioner.

### Immunförsvaret och Major Histocompatibility Complex

Kroppens immunförsvar är ett mycket komplext system som verkar genom flertalet olika vägar och på flera plan. Grovt sett kan det delas upp i tre delar: fysisk barriär, det medfödda immunförsvaret och det förvärvade immunförsvaret. De fysiska barriärerna utgörs av päls, hud och slemhinnor. Om detta första initiala skydd passerar kommer det medfödda immunförsvaret att reagera. Detta sker omgående, under minuter till timmar, och svaret är ospecifikt. Responsen ser liknande ut oberoende av vilken typ av främmande struktur som har tagit sig in i kroppen och försvaret har inte någon minnesförmåga (Tizard, 2012).

Det förvärvade immunförsvaret tar längre tid på sig att reagera och är verksamt först efter dagar till veckor. Till skillnad från det medfödda försvaret har det ett minne vilket gör att igenkänning och eliminering av ett infektiösaämne kan ske mycket snabbt om det infekterar kroppen upprepade gånger. Det förvärvade immunförsvaret har förmågan att känna igen ett mycket brett spektrum av främmande molekyler. Försvaret kan delas upp i två delar – det humoral och det cellmedierade. Det humoral försvaret använder sig av sig antikroppar i sitt försvar. Antikroppar är en typ av proteiner som utsöndras från en viss typ av celler, så kallade B-celler. Det cellmedierade immunförsvaret består av olika typer av celler och bägge delarna arbetar i samverkan (Tizard, 2012).

För att det förvärvade immunförsvaret ska kunna aktiveras måste kroppen identifiera ett infektiösaämne som främmande. Detta sker genom så kallad antigenpresentation vilket innebär att vissa typer av celler kan plocka upp ett främmande ämne, antigen, och presentera det för immunförsvaret. Det främmande ämnet presenteras på en struktur på cellytan vilken består av så kallade MHC-molekyler. MHC står för Major Histocompatibility Complex och är en samling gener vilka fungerar som bruksanvisning för hur de olika MHC-molekylerna ska byggas upp. Det finns olika klasser av MHC men denna studien fokuserar på MHC klass II. Hundens MHC kallas för DLA (Dog leukocyte antigen) och är lokaliserat på kromosom 12. MHC II regionen är uppdelad på positioner på kromosomen och kallas för DLA-DRA, DLA-DRB1, DLA-DQA1 och DLA-DQB1. DLA-DRA ser likadan ut hos olika individer, medan DRB1, DQA1 och DQB1 varierar. De olika varianterna av generna som finns kallas för alleler. En samling specifika alleler kallas för haplotyp (Eren & Travers, 2000; Tizard, 2012).

Som tidigare nämnt kan det förvärvade immunförsvaret reagera på ett mycket stort antal olika antigen. Förmågan är beroende av vilken alleluppsättning individen har, det vill säga vilka olika varianter av MHC-molekyler generna kodar för. Varje hund har två olika allelvarianter av samma gen. Detta innebär att hundar som har olika allelvarianter, så kallade heterozygota, visar upp ett bredare spektrum av MHC-molekyler än de med likadana alleler, så kallade homozygota, och således kan de heterozygota reagera mot ett större antal främmande ämnen (se Figur 1) (Eren & Travers, 2000; Kennedy *et al.*, 2002a; Tizard, 2012).

	Heterozygot hund		Homozygot hund	
<b>DLA-DRB1</b>	Allel A	Allel B	Allel A	Allel A
<b>DLA-DQA1</b>	Allel C	Allel D	Allel C	Allel C
<b>DLA-DQB1</b>	Allel E	Allel F	Allel E	Allel E

Figur 1. Schematiskt exempel på alleluppsättning av MHC klass II.

Till skillnad från populationer hos människa är hundraser inavlade i en mycket större utsträckning vilket gör att homozygota individer är vanligt. Många nya hundraser har skapats genom avel på kort tid och inte sällan härstammar de från en liten genpool på grund av hård selektion. Homozygota individer är mer frekvent förekommande inom ovanliga raser (Kennedy *et al.*, 2002a).

Det är sedan tidigare känt att MHC klass II utgör en genetisk riskfaktor kopplad till flertalet olika sjukdomar av autoimmun karaktär hos hund. Beroende på vilken alleluppsättning en individ har kan det innebära en risk eller utgöra en skyddande faktor för utvecklingen av en viss sjukdom (Kennedy *et al.*, 2002a; 2006a; 2006b; 2006c; Greer *et al.*, 2010; Wilbe *et al.*, 2010). Syftet med denna studie var att utröna om association mellan MHC klass II och sjukdom föreligger även hos juvenil demodikos.

I studien ingick 215 hundar, 90 stycken av rasen mops och 125 stycken av rasen Staffordshire bullterrier. Hundarna delades upp i grupper beroende på om de har eller haft juvenil demodikos (fall) eller om de var helt friska (kontroller). Bland mopsarna utgjorde 40 stycken hundar fall och 50 stycken kontroller. Respektive siffror inom Staffordshire bullterrierpopulationen var 43 fall och 82 kontroller. Blodprov togs från samtliga hundar och från dessa extraerades DNA. Genom att tillsätta flertalet kemiska komponenter och utsätta proverna för olika temperaturer kunde sedan hundarnas genetiska kod avseende MHC klass II-området identifieras. Sekvenserna matchades sedan mot en databas av tidigare kända sekvenser för att kunna identifiera aktuella alleler.

Inom rasen mops hittades totalt fyra DRB1-alleler, tre DQA1-alleler och åtta DQB1-alleler. Det fanns 14 olika haplotyper inom studiepopulationen. En riskallel identifierades – DQB1\*02601, och en uppvisade skyddande effekt – DQB1\*02301. Gällande haplotyper var DRB1\*01502/DQA1\*00601/DQB1\*02301 associerad med minskad risk för juvenil demodikos (se Tabell 17). Inom studiepopulationen av rasen Staffordshire bullterrier hittades totalt nio DRB1-alleler, sex DQA1-alleler och tio DQB1-alleler. Totalt hittades 39 olika haplotyper. Allel DRB1\*01301 associerades med en minskad risk för juvenil demodikos.

Tabell 17. Sammanställning av alleler och haplotyp med ökad risk eller skyddande effekt i studien

Allel	Ras	Totalandel	Andel fall	Andel kontroller	Risk/ skyddande
<b>*02301</b>	Mops	41,1 %	30 %	50 %	Skyddande
<b>*02601</b>	Mops	23,3 %	31,2 %	17 %	Risk
<b>*01301</b>	Staff. B.	14,9 %	7 %	19,1 %	Skyddande
<b>Haplotyp</b>					
<b>DRB1*01502/ DQA1*00101/ DQB1*00201</b>	Mops	18,3 %	10 %	25 %	Skyddande

Slutsatsen som kan dras från denna studie är att den genetiska uppsättningen av MHC klass II har betydelse för utveckling av juvenil demodikos. Trots att en association med den genetiska uppsättning av MHC klass II hos hund och juvenil demodikos sågs i studien är det viktigt att påpeka att sjukdomen är multifaktoriell och således inte enbart beroende av den genetiska uppsättningen. Detta innebär att det finns hundar med riskalleler/haplotyper som ej utvecklar sjukdom och vice versa. Det går därför inte att basera avelsråd endast på vilken DLA-genotyp en hund innehar. Ett sådant urval av avelshundar skulle istället kunna bidra till selektion av andra genetiskt betingade sjukdomar.

## REFERENSER

- Akilov, O.E. & Mumcuoglu, K.Y. (2003). Association between human demodicosis and HLA class I. *Clinical and Experimental Dermatology*, 28:70–73. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2003.01173.x>
- Borghans, J.A.M., Beltman, J.B. & De Boer, R.J. (2004). MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics*, 55:732–739. <https://doi.org/10.1007/s00251-003-0630-5>
- Chesney, C.J. (1999). Short form of Demodex species mite in the dog: occurrence and measurements. *Journal of Small Animal Practice*, 40:58–61. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1999.tb03037.x>
- Desch, C.E. & Hillier A. (2003). Demodex injai: a new species of hair follicle mite (Acari: Demodicidae) from the domestic dog (Canidae). *Journal of Medical Entomology*, 40:146-149
- Doherty, P.C. & Zinkernagel, R.M. (1975). A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet*, 1(7922):1406–9. PMID: 49564
- EMBL-EPI (2018). *IDP-MHC*. <https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/> [Accessed November 2018]
- Eren, E. & Travers, P. (2000). The Structure of the Major Histocompatibility Complex and its molecular interactions. I: Lechler R., Warrens A (ed), *HLA in Health and Disease*, 2nd edition. London: Academic Press, 23-33.
- Fass Djurläkemedel, 2016. *Interceptor*, <https://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=20090428000076> [181018]
- Fass Djurläkemedel, 2017. *Simparica*, <https://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=20141223000065> [181018]
- Fass Djurläkemedel, 2018. *Advocate*, <https://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=20030402000036> [181018]
- Ferrer, L., Ravera, I. & Silbermayr, K. (2014). Immunology and pathogenesis of canine demodicosis. *Veterinary Dermatology*, 25:427-434. <https://doi.org/10.1111/vde.12136>
- Fondati, A., De Lucia, M., Furiani, N., Monaco, M., Ordeix, L. & Scarampella, F. (2010). Prevalence of Demodex canis- positive healthy dogs at trichoscopic examination. *Veterinary Dermatology*, 21:146–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00769.x>
- Forsythe, P.J. (2012). Demodicosis I: Jackson H. A., Marsella R. (eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology*, 3rd edition. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 164-172.
- Geyer, J. & Janko, C. (2012). Treatment of MDR1 mutant Dogs with Macrocytic Lactones. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13:969-986. <https://doi.org/10.2174/138920112800399301>
- Greer, K.A., Wong, A.K., Liu, H., Famula, T.R., Pedersen, N.C., Ruhe, A., Wallace, M. & Neff, M.W. (2010). Necrotizing meningoencephalitis of Pug dogs' associates with dog leukocyte antigen class II and resembles acute variant forms of multiple sclerosis. *Tissue Antigens*, 76(2):110-8. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01484.x>
- Greve J.H. & Gaafar S.M. (1966). Natural transmission of Demodex canis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 148:1043-1045.
- Hill, A.V., Allsopp, C.E., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, P., Rowe, P.A., Bennett, S., Brewster, D., McMichael, A.J., & Greenwood, B.M. (1991). Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, 352:595-600.

- Hughes, A.M., Jokinen, P., Bannasch, D.L., Lohi, H. & Oberbauer, A.M. (2010). Association of a dog leukocyte antigen class II haplotype with hypoadrenocorticism in Nova Scotia Duck Tolling Retrievers. *Tissue Antigens*, 75:684–690. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01440.x>
- It, V., Barrientos, L., López Gappa, J., Posik, D., Díaz, S., Golijow, C. & Giovambattista, G. (2010). Association of canine juvenile generalized demodicosis with the dog leukocyte antigen system. *Tissue Antigens*, 76:67-70. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01463.x>
- Kennedy, L.J., Barnes, A., Happ, G.M., Quinnell, R.J., Bennett, D., Angles, J.M., Day, M.J., Carmichael, N., Innes, J.F., Isherwood, D., Carter, S.D., Thomson, W. & Ollier, W.E.R., (2002a). Extensive interbreed, but minimal intrabreed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs. *Tissue Antigens*, 59:194–204. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2002.590303.x>
- Kennedy, L.J., Barnes, A., Happ, G.M., Quinnell, R.J., Courtenay, O., Carter, S.D. & Ollier, W.E.R., Thomson, W. (2002b). Evidence for extensive DLA polymorphism in different dog populations. *Tissue Antigens*, 60:43–52. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2002.600106.x>
- Kennedy, L.J., Barnes, A., Ollier, W.E.R. & Day, M.J. (2006a). Association of a common dog leukocyte antigen class II haplotype with canine primary immune-mediated haemolytic anaemia. *Tissue Antigens*, 68:502–508. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2006.00715.x>
- Kennedy, L.J., Barnes, A., Short, A., Brown, J.J., Lester, S., Seddon, J., Fleeman, L., Francino, O., Brkljacic, M., Knyazev, S., Happ, G.M. & Ollier, W.E.R. (2007a). Canine DLA diversity: 1. New alleles and haplotypes. *Tissue Antigens*, 69:272–288. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2006.00779.x>
- Kennedy, L.J., Barnes, A., Short, A., Brown, J.J., Lester, S., Seddon, J., Happ, G.M. & Ollier, W.E.R. (2007b). Canine DLA diversity: 2. Family studies. *Tissue Antigens*, 69:289–291. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2006.00780.x>
- Kennedy, L.J., Davison, L.J., Barnes, A., Short, A.D., Fretwell, N., Jones, C.A., Lee, A.C., Ollier, W.E.R. & Catchpole, B. (2006b). Identification of susceptibility and protective major histocompatibility complex haplotypes in canine diabetes mellitus. *Tissue Antigens*, 68:467–476. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2006.00716.x>
- Kennedy, L.J., Quarmby, S., Happ, G.M., Barnes, A., Ramsey, I.K., Dixon, R.M., Catchpole, B., Rusbridge, C., Graham, P.A., Hillbertz, N.S., Roethel, C., Dodds, W.J., Carmichael, N.G. & Ollier, W.E.R. (2006c). Association of canine hypothyroidism with a common major histocompatibility complex DLA class II allele. *Tissue Antigens*, 68:82–86. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2006.00614.x>
- Kennedy, L.J. (2007). 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report on joint study on canine DLA diversity. *Tissue Antigens*, 69, Suppl 1:269-271.
- Lebon, W., Beccati, M., Bourdeau, P., Brement, T., Bruet, V., Cekiera, A., Crosaz, O., Darmon, C., Guillot, J., Mosca, M., Pin, D., Popiel, J., Pomorska Handwerker, D., Larsen, D., Tielemans, E., Beugnet, F. & Halos, L. (2018). Efficacy of two formulations of afoxolaner (NexGard® and NexGard Spectra®) for the treatment of generalised demodicosis in dogs, in veterinary dermatology referral centers in Europe. *Parasites & Vectors*, 11(1):506. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3083-2>
- Lemarié, S.L. & Horohov, D.W. (1996). Evaluation of interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in dogs with generalized demodicosis. *Veterinary Dermatology*, 7:213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.1996.tb00249.x>

- Läkemedelsverket (2014). *Ekto- och endoparasiter hos hund och katt – ny rekommendation*. 2014:25 (supplement): 4-23.
- Löwenstein, M. & Kutzer, E. (1993) Vorkommen von Demodex-Milben bei klinisch hautgesunden Hunden und Katzen. *Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie*, 15:61-66.
- Martínez-Orellana, P., Quirola-Amores, P., Montserrat-Sangrà, S., Ordeix, L., Lull, J., Álvarez-Fernández, A. & Solano-Gallego, L. (2017). The inflammatory cytokine effect of Pam3CSK4 TLR2 agonist alone or in combination with Leishmania infantum antigen on ex-vivo whole blood from sick and resistant dogs. *Parasites & Vectors*, 10:123. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2062-3>
- Miller W., Griffin C. & Campbell K. (2012), *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*, 7th edition. W B Saunders Co Ltd
- Mueller, R.S., Bensignor, E., Ferrer, L., Holm, B., Lemarié, S., Paradis, M. & Shipstone, M.A., (2012). Treatment of demodicosis in dogs: 2011 clinical practice guidelines: Demodicosis treatment. *Veterinary Dermatology*, 23:86-96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2011.01026.x>
- Mumcuoglu, K.Y. & Akilov, O.E. (2005). The Role of HLA A2 and Cw2 in the Pathogenesis of Human Demodicosis. *Dermatology*, 210:109–114. <https://doi.org/10.1159/000082565>
- NCBI (2018). *GenBank*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [Accessed November 2018]
- NCBI, US National Library of Medicine (2018). *Basic Local Alignment Search Tool*. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [Accessed November 2018]
- Quinnell, R.J., Kennedy, L.J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L.M., Shaw, M.-A., Carter, S.D., Thomson, W. & Ollier, W.E.R. (2003). Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, 55:23–28.
- Ravera, I., Altet, L., Francino, O., Sánchez, A., Roldán, W., Villanueva, S., Bardagí, M. & Ferrer, L. (2013). Small Demodex populations colonize most parts of the skin of healthy dogs: Demodex canis in skin of healthy dogs. *Veterinary Dermatology*, 24:168-172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01099.x>
- Sastre, N., Ravera, I., Villanueva, S., Altet, L., Bardagí, M., Sánchez, A., Francino, O. & Ferrer, L. (2012). Phylogenetic relationships in three species of canine Demodex mite based on partial sequences of mitochondrial 16S rDNA: Phylogenetics of canine Demodex mites. *Veterinary Dermatology*, 23:509-514. <https://doi.org/10.1111/vde.12001>
- Seddon, J.M., Berggren, K.T. & Fleeman, L.M. (2010). Evolutionary history of DLA class II haplotypes in canine diabetes mellitus through single nucleotide polymorphism genotyping. *Tissue Antigens*, 75:218–226. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2009.01426.x>
- Singh S. K., Dimri U., Sharma M. C., Sharma B. & Saxena M. (2010). Determination of CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of dogs with demodicosis. *Parasitology*, 137(13):1921-1924. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000879>
- Singh, S.K., Dimri, U., Sharma, M.C., Swarup, D., Sharma, B., Pandey, H.O. & Kumari, P. (2011). The role of apoptosis in immunosuppression of dogs with demodicosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144:487–492. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.008>
- Six, R.H., Becskei, C., Mazaleski, M.M., Fourie, J.J., Mahabir, S.P., Myers, M.R. & Sloodmans, N. (2016). Efficacy of sarolaner, a novel oral isoxazoline, against two common mite infestations in

- dogs: *Demodex* spp. and *Otodectes cynotis*. *Veterinary Parasitology*, 222:62–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.027>
- Smerdel-Ramoya, A., Finholt, C., Lilleby, V., Gilboe, I.-M., Harbo, H.F., Maslinski, S., Førre, Ø., Thorsby, E. & Lie, B.A. (2005). Systemic lupus erythematosus and the extended major histocompatibility complex—evidence for several predisposing loci. *Rheumatology*, 44:1368–1373. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei015>
- Snyder, D.E., Wiseman, S. & Liebenberg, J.E. (2017). Efficacy of lotilaner (Credelio™), a novel oral isoxazoline against naturally occurring mange mite infestations in dogs caused by *Demodex* spp. *Parasites & Vectors*, 10:532. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2472-2>.
- Soutter, F., Martorell, S., Solano-Gallego, L. & Catchpole, B. (2018). Inconsistent MHC class II association in Beagles experimentally infected with *Leishmania infantum*. *The Veterinary Journal*, 235:9–15. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.03.001>
- Tizard I. (2012). *Veterinary Immunology, an Introduction*. 9th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co Ltd.
- Thermo Fisher Scientific (2018). *BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit*. [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms\\_091370.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_091370.pdf) [Accessed November 2018]
- VassarStats (2018). *Website for Statistical Computation*. <http://vassarstats.net/> [Accessed November 2018]
- 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*, 61:557–564. <https://doi.org/10.1007/s00251-009-0387-6>
- Wilbe, M., Ziener, M.L., Aronsson, A., Harlos, C., Sundberg, K., Norberg, E., Andersson, L., Lindblad-Toh, K., Hedhammar, Å., Andersson, G. & Lingaas, F. (2010). DLA class II alleles are associated with risk for canine symmetrical lupoid onychodystrophy (SLO). *PLoS ONE*, 5(8):e12332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012332>
- Yi, J.S., Cox, M.A. & Zajac, A.J. (2010). T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion: T-cell exhaustion. *Immunology*, 129:474–481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x>
- Zewe, C.M., Altet, L., Lam, A.T.H. & Ferrer, L. (2017). Afoxolaner and fluralaner treatment do not impact on cutaneous *Demodex* populations of healthy dogs. *Veterinary Dermatology*, 28:468-472. <https://doi.org/10.1111/vde.12453>
- Zinkernagel R.M. & Doherty P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(5450):701-2. PMID: 4133807
- Zinkernagel R.M & Doherty P.C. (1997). The discovery of MHC restriction. *Immunology Today*, 18(1):14-7. PMID: 9018968