

# Korrelation av kliniska och genetiska data hos älgar diagnostiserade med och utan Moose Wasting Syndrome

*Correlation of clinical and genetic data in moose diagnosed with  
and without Moose Wasting Syndrome*

Rosie Johannesson



Examensarbete • 30 hp

Agronomprogrammet - husdjur

Uppsala 2019



# Korrelation av kliniska och genetiska data hos älgar diagnosticerade med och utan Moose Wasting Syndrome

*Correlation of clinical and genetic data in moose diagnosed with and without Moose Wasting Syndrome*

Rosie Johannesson

<b>Handledare:</b>	Sofia Mikko, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjursgenetik
<b>Bitr. handledare:</b>	Margareta Stéen, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi
<b>Examinator:</b>	Erik Pelve, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi
<b>Omfattning:</b>	30 hp
<b>Nivå och fördjupning:</b>	Avancerad nivå, A2E
<b>Kurstitel:</b>	Självständigt arbete i husdjursvetenskap
<b>Kursansvarig inst.:</b>	Institutionen för husdjursgenetik
<b>Kurskod:</b>	EX0872
<b>Program/utbildning:</b>	Agronomprogrammet - husdjur
<b>Utgivningsort:</b>	Uppsala
<b>Utgivningsår:</b>	2019
<b>Omslagsbild:</b>	Rosie Johannesson
<b>Elektronisk publicering:</b>	<a href="https://stud.epsilon.slu.se">https://stud.epsilon.slu.se</a>
<b>Nyckelord:</b>	Älg, Moose Wasting Syndrome, undernäring, sjukdomsdata

**Sveriges lantbruksuniversitet**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi



## Sammanfattning

År 1985 upptäcktes en sjukdom som drabbade svenska älgar. Sjukdomen fick namnet *Moose Wasting Syndrome* (MWS). Älgarna som hittades var i mycket dålig kondition eller självdöda. Symptomen på MWS är anorexi, svaghet, nedsatt syn, minskad skygghet, utmärgling och diarré. Risken att dö i sjukdomen uppvisar ett starkt åldersberoende som ökar med stigande ålder, tjurar är minst lika drabbade som kor. Sjukdomen sågs dock i alla åldersklasser. Sjukdomen förekom över hela landet men har främst studerats i Älvsborgs län och kallas därför för Älvsborgssjukan. Än idag finns inget definitivt svar på vad som orsakar sjukdomen.

Hypoteser om vad som kan orsaka sjukdomen var flera. Foderrelaterade orsaker, med förändrade mineral- och metallhalter beroende på försurning, eller brist på foder beroende på en ökande population av växtätare, eller kontaminerat foder på grund av miljöföroreningar. En annan hypotes var värd-och parasitrelaterade (det vill säga, virus, bakterier, prioner). Då obduktions- och histologbilderna tydde på en virusinfektion var *Bovine Virus Diarré Virus* (BVDV), *Reovirus*, *Herpesvirus* eller *Retrovirus* några av de föreslagna virusen. Dessa virus kunde dock inte isoleras. Icke virala patogener som bakterier och prioner testades. Med de tester som då ställdes till buds kunde inte till exempel prionsjukdomar som tex, *Chronic Wasting Disease* (CWD) fastställas. Så ingen av de presenterade hypoteserna kunde visas vara orsaken. Broman *et al.* (2002a), föreslog att framtida studier behövde koncentrera sig på tre punkter: *i*: välformulerade kritiska tester på de olika hypoteserna, *ii*: testen på hypotesen kan endast bli framgångsrika om materialet eller djuren i undersökningen sant representerar en större population (större mängd data), *iii*: att fler än en faktor studeras samtidigt för att förklara fenomenet. Nya och kanske okända interaktioner kunde visa sig viktiga.

År 2016 studerade ett forskarteam på Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) och Linköpings universitet (LiU) om MWS kunde vara en atypisk (uppvisar inte exakt samma symptom som ursprungligen beskrivs) eller typisk (uppvisar samma symptom som ursprungligen beskrivs) form av CWD. Under samma period observerades det första fallet av CWD hos en norsk ren. Fram till den 2 april 2019 har nitton fall av klassisk CWD diagnosticerats hos vildren och sex fall av atypisk CWD hos älgar och en kronhjort i Norge samt tre fall av CWD hos älg i Sverige och ett fall i Finland. *Chronic Wasting Disease* och andra prionsjukdomar uppkommer genom omvandling av det cellulära prionprotein (PrP<sup>C</sup>) till en konformationsförändrad infektiös isoform, Proteinase K resistent prionprotein (PrP<sup>Sc</sup>).

Studier har genomförts för att undersöka sambandet mellan prionsjukdomen CWD och MWS då dessa visat sig ha liknade symtom. Syftet med den här studien är att med hjälp av de sjukdomsdata som finns om MWS kunna upptäcka genetiska korrelationer mellan genotyp, fenotyp och sjukdomsklass (klass 1–7, där 1 visar mycket tydliga symptom och där 7 representerar friska).

Viktiga mål för forskargruppen på SLU och LiU är att få klarhet i allel-frekvensen och den geografiska fördelningen av mutation i PRNP-genen hos älg som kodar för prionproteinet (PrP) och undersöka den möjliga kopplingen mellan det muterade PrP och MWS, samt om älgmutationen i PRNP påverkar aggregering, konformation och processningen av PrP i samband med Cu- och Zn-värden.

Studien bestod till största del av statistiska analyser på data ifrån 2331 älgar. Information fanns om lever-, njur- och blodvärden, insamlingsår, genotyp, sjukdomsklass, kön, ålder, proteinklyvning av PrP, fyndplats, avlivad eller självdöda, identitetsnummer, diagnos samt anamnes. Framförallt analyserades variablerna ålder utifrån 106 individer, sjukdomsklass utifrån 93 individer och alfaklyvning utifrån 49 individer. För att finna samband mellan variablerna användes linjära modeller och korrelationsmatrixs. Resultaten visade att äldre djur oftare drabbas av MWS än unga djur. Tolv av tretton individer med sjukdomsklass 1 (sjukast) och tretton av tretton med sjukdomsklass 2 var kor, vilket beror på den dåvarande strukturen av svenska älgstammen, med förhållandet sex kor per tjur. Skillnader finns mellan olika provperioder, som bland annat sjukdomsklass, då älgar med sjukdomen främst sågs under 1980–2000 talet. Vid analys av alfaklyvning kunde ett negativt samband ses avseende insamlingsår och sjukdomsklass. Resultat som tyder på att under 1980–2000-talet var alfaklyvningsprocenten högre. Individer som är mycket sjuka (klass 1–2) visar på en generellt högre alfaklyvningsprocent (90–100%) än de som är mindre sjuka. Resultaten i den här studien visade på att de individerna som drabbats hårdast av MWS hade höga värden av vissa mineraler och spårämnen gentemot de friska. Ingen antydning finns att en viss genotyp drabbas oftare än någon annan, men resultaten styrker tidigare resultat om att äldre djur drabbas oftare än yngre.

*Nyckelord: Älg, Moose Wasting Syndrome, hypoteser, sjukdomsdata*

## Abstract

In 1985, moose in Sweden were found affected by a disease called Moose Wasting Syndrome (MWS). The animals were in very poor condition or found dead. The symptoms of MWS were anorexia, weakness, impaired vision, decreased shyness, emaciation and diarrhoea. Hypotheses about the cause of the disease were at the time of the outbreak feed- or parasite (virus, bacteria or prion) related. When the autopsy and histologic image indicated a virus infection, *Bovine Virus Diarrhea Virus*, *Reovirus*, *Herpesvirus* or *Retrovirus* were some of the proposed viruses to cause MWS. However, these viruses could not be isolated. Non-viral pathogens were tested as bacteria and prions. With the tests that were then available, for example, Chronic Wasting Disease (CWD) could not be determined. So, none of the hypotheses presented could be proven to be the cause. Broman *et al.* (2002a) suggested that future studies needed to concentrate on three points: *i*: well-formulated critical tests on the various hypotheses, *ii*: the test on the hypothesis can only be successful if the material or animals in the study truly represent a larger population (larger amount of data), *iii*: that more than one factor is studied simultaneously to explain the phenomenon. New and perhaps unknown interactions could prove important.

Meanwhile the scientists at SLU and LiU studied if MWS may be an atypical (does not exhibit the same symptoms as originally described) or typical (exhibit the same symptoms as originally described), the first case of CWD appeared 2016 in a Norwegian reindeer. Until 2 April 2019, there are nineteen cases of classic CWD in wild Norwegian reindeer, as well as atypical CWD in six moose and a red deer and three cases of CWD in Sweden, and a moose in Finland. The impact of prion disease in Norway and therefore also in European cervids is worrying and is of uttermost interest and importance for society and wildlife in Europe. Chronic Wasting Disease and other prion diseases occur by converting the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) to a conformational altered infectious isoform, Proteinase K resistant prion protein (PrP<sup>Sc</sup>).

The scientist at SLU and Liu aimed to reveal the allele frequency and geographical distribution of the mutation in the PRNP gene encoding the moose prion protein (PrP) and investigate the possible link between the mutated PrP and MWS, as well as reveal how the moose mutation in PRNP affects the aggregation, conformation and processing of PrP along with altered Cu and Zn levels.

Studies has been conducted to investigate the correlation between the prion disease CWD and MWS, as these have been shown to have similar symptoms. The purpose of this study is to be able to find correlations between genotype, phenotype and disease class (class 1-7, where 1 shows prominent symptoms and 7 is considered healthy) using the disease data available on MWS.

The study consisted largely of statistical analyses of data from 2331 individuals. The information consisted of trace element values from liver, kidney and blood sam-

ples, year collection, genotype, disease class, gender, age, alpha cleavage of PrP, location, killed or deceased, identification number, diagnosis and anamnesis. The variables mainly analysed in the study are age based on 106 individuals, disease class based on 93 individuals and alpha cleavage based on 49 individuals. To find relationships between the variables, linear models and correlation matrices were used.

The results showed that older animals more often suffer from MWS than young ones. Twelve of thirteen individuals with disease class 1 (most ill) and thirteen of thirteen with disease class 2 were cows, which are due to the structure of the Swedish moose structure at that time, when the ratio was six cows per bull. Differences exist between different experimental periods, such as disease class, when moose with signs of disease occurred mainly during the 1980–2000 century. When analysing alpha cleavage, a negative correlation could be seen to collection years and disease class. This shows that in the 1980-2000 century, the alpha cleavage percentage was higher. The individuals with a high degree (1-2) of disease had a higher alpha cleavage percentage. The results in this study showed that the individuals most affected by MWS had high values of certain minerals and trace elements in relation to the healthy once. No suggestion that a genotype would suffer to MWS more often than another would, but the result strengthens the hypothesis that older animals are more often affected than younger once.

*Keywords:* Moose, Moose Wasting Syndrome, hypothesis, disease data



## *Populärvetenskaplig sammanfattning*

I mitten på 1980-talet upptäcktes en sjukdom som drabbade svenska älgar. Många individerna undersöktes i markerna i dåvarande Älvsborgs län, i dag västra Götalands län. Älgarna var i mycket dålig kondition eller till och med hittades döda. I början av 1990-talet registrerades fler än 1000 fall av sjukdomen som fick namnet *Moose Wasting Syndrome* (MWS) men kallas även för Älvsborgssjukan. Symptomen för MWS är anorexi, svaghet, nedsatt syn, minskad skygghet, utmärgling, sår i munhåla, svalg, matstrupe, kraftiga mag-tarminflammationer och diarréer. De uppvisade även icke variga hjärnhinneinflammationer. Orsaken till sjukdomen är inte känd, men forskare hade hypoteser om att den antingen var foder- eller parasit (virus, bakterier, prioner) -relaterad.

Studier har genomförts för att testa de olika hypoteserna. Symptomen för MWS liknar de symptom som kan ses vid undernäring, virussjukdomar och sjukdomar som sätter ner immunförsvaret, som tex prionsjukdomar. De foderrelaterade, med förändrade mineral- och metallhalter troddes kunna bero på försurning, eller på brist på foder beroende på en ökande population av växtätare, eller kontaminerat foder på grund av miljöföroreningar. Hypotesen om värd- och parasitrelaterad (dvs, virus, bakterier, prioner) grundade sig på obduktions- och histologbilderna som tydde på en virusinfektion med virus som *Bovine Virus Diarré Virus* (BVDV), *Reovirus*, *Herpesvirus* eller *Retrovirus*, men dessa virus kunde inte isoleras. Icke virala patogener testades också som bakterier och prioner. Med de tester som användes på 1980-talet kunde till exempel inte prionsjukdomen *Chronic Wasting Disease* (CWD) påvisas. Så ingen av de presenterade hypoteserna kunde visa sig vara orsaken.

För att finna samband mellan genotyp, fenotyp, kemiska värden (lever-, njur- och blodvärden) och sjukdomsklass (klass 1-7, där 1 visar på kraftiga symptom och där 7 representerar friska) användes information från friska älgar och MWS-sjuka älgar insamlade i Sverige under åren 1980–2018. Parametrar som analyserades i den statistiska analysen var insamlingsår, genotyp, sjukdomsklass, kön, ålder, alfaklyvning och levervärden.

Ett tydligt samband kunde ses mellan sjukdomsklass och insamlingsår. Det vill säga att de flesta individerna som drabbats av MWS upptäcktes under 1980–2000 talet. Vid analys av alfaklyvning kunde ett negativt samband ses

till insamlingsår och sjukdomsklass. Detta tyder på att under 1980–2000-talet var alfaklyvningsprocenten högre. Likaså visar individer med hög sjukdomsgrad (klass 1–2) på en generellt hög alfaklyvningsprocent (90–100%) jämfört med de som var mindre sjuka. Ett samband sågs också mellan ålder och sjukdomsklass. Det betyder att äldre djur oftare var sjuka i MWS än vad yngre djur var. Resultatet visade också att de sjuka älgarna i den här studien främst var kor och endast ett fåtal tjurar som ingick i studien drabbades hårt av sjukdomen. Vilket enligt tidigare studier kan bero på fördelning mellan kor och tjurar i stammen vid den tidpunkten. Studien kunde inte heller hitta några tydliga samband mellan brist på mineraler och spårämnen utan snarare tvärt om. Analyserna visade på att de individerna som drabbats hårdast av MWS snarare hade höga värden av vissa mineraler och spårämnen.

Detta arbete ger inget slutgiltigt svar om vad som orsakar MWS, men stärker att äldre individer oftare drabbas än yngre.



# Innehållsförteckning

<b>Tabellförteckning</b>	<b>11</b>
<b>Figurförteckning</b>	<b>12</b>
<b>Förkortningar</b>	<b>14</b>
<b>1 Inledning</b>	<b>17</b>
<b>2 Litteraturöversikt</b>	<b>19</b>
2.1 <i>Moose wasting syndrome</i>	19
2.2 Mineraler och spårämnen	20
2.3 Kvalitet och kvantitet av föda	23
2.4 Parasiter (virus, bakterier, prioner och helminter)	23
2.5 Prionprotein	24
2.5.1 Prionsjukdomar	25
2.6 Alfaklyvning av prionproteinet	25
2.7 <i>Chronic Wasting Disease</i>	26
2.8 Variant K109Q	27
2.9 Bestämning av genotyp	27
<b>3 Material och metod</b>	<b>28</b>
3.1 Datamaterial	28
3.2 DNA preparation	30
3.3 Genotypning	31
3.4 Statistisk analys	31
<b>4 Resultat</b>	<b>33</b>
4.1 Genotypning	33
4.2 Korrelationsanalyser	34
4.2.1 Ålder	35
4.2.2 Sjukdomsklass	37
4.2.3 Alfaklyvning	40
<b>5 Diskussion</b>	<b>46</b>
5.1 Genotyp	46
5.2 Ålder	47
5.3 Sjukdomsklass	47

5.4	Alfaklyvning	48
5.5	Mineraler och spårämnen	49
5.6	Koppling lantbruk	49
<b>6</b>	<b>Slutsats</b>	<b>50</b>
	<b>Referenslista</b>	<b>51</b>



## Tabellförteckning

Tabell 1: Den ungefärliga mängden av viktiga mineraler och spårämnen i djurkroppen per kg kroppsvikt (McDonald et al., 2011).	22
Tabell 2. Datasetet Genotype 3b består av de variabler som användes under den statistiska analysen. Samma variabler men uppdelade utifrån insamlingsår användes även för dataseten genotyp80.98 samt genotyp05.18.	29
Tabell 3. Variablerna samt antal individer i dataseten använda till korrelationsmatrixen	29
Tabell 4. Klassificeringslista från klass 1–7 med yttre och inre symptom. Yttre: anamnestiska uppgifter, inre: fynd vid obduktion. Klassificeringen användes vid obduktion av älgar i fält under 1980–1990 talet (Personlig kommentar Stéen, M. 2019)	29
Tabell 5. Mängd (µl) Taqman® Universal PCR Master Mix, Taqman® Genotyping Assay, DNase-free H <sub>2</sub> O och DNA per prov för genotypning.	31

## Figurförteckning

- Figur 1. Schematisk bild på det cellulära prionproteinet (PrP<sup>C</sup>) samt vad som sker vid alfaklyvning. (A) PrP<sup>C</sup> med viktiga proteindomäner, N-terminal (aa 1–23, grå box), C-terminal (aa 230–254, grå box), oktamerisk repeteringsregion (aa 51–90, blå box), neurotoxisk domän (aa 105–125, lila box), hydrofob kärna (aa 111–134, grön box) samt N-glykan sidokedjor  $\leq 2$  stycken (aa 180 och 196). (B) Mogna PrP, där N och C terminalerna är borttagna. (C) Alfaklyvning sker på position aa 110/111–112, denna typ av klyvning förstör den neurotoxiska domänen (lila box) och leder till ett membranbundet C1-fragment via GPI-ankare och ett lösligt N1-fragment. Bild modifierad från Altmeyen et al., 2012. 26
- Figur 2: Den procentuella fördelningen mellan genotyperna AA, AC och CC inom de olika provperioderna utifrån totalt 1409 individer. Fördelningen av individer mellan de olika provperioderna är 1109 (1980-1989), 81 (1990-1999), 32 (2000-2009) och 187 (2010-2018). 34
- Figur 3. Korrelationsmatrix består av alla undersökta variabler från Genotype 3b. Blå cirkel tyder på en positiv korrelation, det vill säga om x ökar, ökar y. Negativ korrelation visas som röda cirkel. Vid en negativ korrelation minskar y när x ökar. Storlek på cirkel samt nyans på färg beskriver om det är en stark eller svag korrelation. 35
- Figur 4. Åldersfördelningen mellan individerna från 0,5 – 19,5 år utifrån 288 individer med angiven ålder i Genotyp 3 36
- Figur 5. Korrelationsmatrix på sjukdomsklass, ålder, LeMg, LeCd och LeMo utifrån Ålder, bestående av 106 individer. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3. 36
- Figur 6. Cirkeldiagram på sjukdomsklass från de insamlade individerna med angiven sjukdomsklass mellan åren 1980–2018 (258 av 2280 individer). Klass 1: tydliga yttre samt inre symtom, 2: tydliga yttre och svaga inre symptom, 3: svaga yttre och tydliga inre symtom, 4: inga yttre men tydliga inre symptom, 5: svaga yttre och inre symptom, 6: inga yttre samt svaga inre symptom, 7: inga yttre eller inre symptom (tabell 3). En standardavvikelse på 1,779. 37
- Figur 7. Fördelningen mellan sjukdomsklass och genotyperna AA, AC och CC med sjukdomsklass 1–7 utifrån 248 individer 38



- Figur 8. Stapeldiagram med sjukdomsklass 1–6 samt kön på individerna. Totalt 223 hondjur och 152 handjur med angiven sjukdomsklass 1 – 7. 39
- Figur 9. Korrelationsmatrix på sjukdomsklass, insamlingsår, ålder och LeCr utifrån 93 individer i det anpassade datasetet Newdata\_Disease\_class.clean. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3. 40
- Figur 10. Histogram på alfaklyvning i procent utifrån 208 individer i Genotype 3b. En standardavvikelse på 29,886. 40
- Figur 11. Fördelning av genotyperna AA, AC och CC när alfaklyvningen är 50–60% respektive 90–100% utifrån Genotyp 3 och 48 individer, 14 inom 50–60% och 34 inom 90–100%. 41
- Figur 12. Korrelationsmatrix av alfaklyvning, insamlingsår, ålder, genotyp och LeCo utifrån 49 observationer. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3. 42
- Figur 13. Korrelationsmatrix av alfaklyvning, sjukdomsklass och ålder utifrån 51 individer. Datasetet Genotype 5b (tabell 3) innehöll endast de individer som hade värden på genotyp, alfaklyvning, sjukdomsklass, ålder och kön. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3. 43
- Figur 14. Korrelationsmatrix av insamling åren genotyp, alfaklyvning, sjukdomsklass och ålder inom insamlingsåren 1980 - 1998 (genotyp80.98) utifrån 31 individer. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3. 44
- Figur 15. Korrelationsmatrix av genotyp, alfaklyvning och ålder inom insamlingsåren 2005 - 2018 (genotyp05.18) utifrån 72 individer. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3. 45

## Förkortningar

<b>Förkortning</b>	<b>Förklaring</b>
ALOV	Alces leukotropic oncovirus
BSE	Bovine Spongiform Encefalopati (Galna kosjukan)
BVD	Bovine Virusdiarré
Cd	Kadmium
CJD	Creutzfeldt-Jakobs sjukdom
Cr	Krom
Cu	Koppar
CWD	Chronic Wasting Disease
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fe	Järn
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
LeFe	Järn i lever
LeMg	Magnesium i lever
LeZn	Zink i lever
LeCa	Kalcium i lever
LeCu	Koppar i lever
LeMn	Mangan i lever
LeCd	Kadmium i lever
LeMo	Molybden i lever
LeCo	Kobolt i lever
LePb	Bly i lever
LeCr	Krom i lever
Mg	Magnesium
Mn	Mangan
Mo	Molybden
MWS	Moose Wasting Syndrome
PCR	Polymerase Chain Reaction

---

PrP	Prionprotein
PrP <sup>C</sup>	Cellulärt Prionprotein
PrP <sup>Sc</sup>	Proteinase K resistent Prionprotein
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SVA	Statens Veterinärmedicinska Anstalt
TSE	Transmissibla spongiforma encefalopatier
Zn	Zink

---



# 1 Inledning

Sverige har en älgstam på 300 000–400 000 älgar (*Alces alces*) sommartid och varje år skjuts runt 100 000 individer (Olsson., 2015). Konsumtionen av viltkött har legat stadigt under många årtionden och i Sverige konsumeras runt 3 kg viltkött (inklusive ben och inälv) per invånare och år (Cederlund., 2017).

År 1985 upptäcktes en ny sjukdom som drabbade svenska älgar (Stéen *et al.*, 1993). Älgar befanns i mycket dålig kondition eller hittades döda. I början av 1990-talet registrerades fler än 1000 fall av sjukdomen (Merza *et al.*, 1994). Sjukdomen fick namnet *Moose Wasting Syndrome* (MWS) och förekom i flera delar av Sverige men studerades främst i Älvsborg och benämns därför även för Älvsborgssjukan (Frank, 2004). Symptomen på MWS är bland annat anorexi, svaghet, nedsatt syn, minskad skygghet, utmärgling och diarré (Stéen *et al.*, 1993). Denna massdöd av älgar orsakade stor oro främst bland jägarna och ledde till en tiofaldig ökning av älgar som lämnades in för rutinmässig obduktion till Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA). Trots detta finns inget tydligt svar på vad som kan vara orsaken till sjukdomen. Det finns flera hypoteser om vad som kan leda till MWS, bland annat att sjukdomen skulle vara foder- eller parasitrelaterad (virus, bakterier, prioner eller helminter). Hypoteserna har testats genom bland annat mätning av mineraler och spårämnen i njure och lever, observationer av tillgänglig föda för älgar, obduktioner och parasitologi (Broman *et al.*, 2002).

Då ingen av de presenterade hypoteserna har kunnat visa sig vara orsaken föreslog Broman *et al.* (2002a) tre punkter vad framtida studier behövde koncentrera sig på: *i*: välformulerade kritiska tester på de olika hypoteserna, *ii*: testen på hypotesen kan endast bli framgångsrika om materialet eller djuren i undersökningen sant representerar en större population (större mängd data), *iii*: att flera än en faktor studeras samtidigt för att förklara fenomenet. Nya och kanske okända interaktioner kunde visa sig viktiga.

Då några av symptomen för MWS liknar symptomen för den sen tidigare kända prionsjukdomen *Chronic Wasting Disease* (CWD) därför har studier genomförts för att undersöka MWS relation till prion proteinet (PrP) (Wik *et al.*, 2012). *Chronic*

*Wasting Disease* är en så kallad prionsjukdom och påträffas hos hjortdjur (Williams & Young, 1980). År 2016 studerade ett forskarteam på Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) och Linköpings universitet (LiU) om MWS kunde vara en atypisk (uppvisar inte exakt samma symptom som ursprungligen beskrivs) eller typisk (uppvisar samma symptom som ursprungligen beskrivs) form av CWD. Under samma period observerades det första fallet av CWD hos en norsk ren. Fram till den 3 december 2019 har nitton fall av klassisk CWD diagnosticerats hos vildren och sex fall av atypisk CWD hittats hos älgar och en kronhjort i Norge samt tre fall av CWD hos älg i Sverige och ett fall i Finland. Sjukdomen kan i tidigt stadium ses som viktminskning och beteendeförändring (Sigurdson, 2008).

Syftet med studien är att med hjälp av insamlade sjukdomsdata för MWS upptäcka genetiska korrelationer mellan genotyp, fenotyp, sjukdomsklass och kemiska värden. Detta genom att studera om svåra symptom av MWS är korrelerade med mineralbrist, en viss genotyp och alfaklyvningsprocent.

## 2 Litteraturöversikt

### 2.1 *Moose wasting syndrome*

Under 1980 – 1990 talet uppträdde en sjukdom på svenska älgar med okänd orsak som fick namnet *Moose Wasting Syndrome* (MWS). Sjukdomen kallas även för Älvsborgssjukan då många älgar studerades i Älvsborgs län. Älvsborgs län var vid den tiden också starkt påverkat av försurning (Frank *et al.*, 1994). Symptomen på MWS yttrar sig som anorexi, svaghet, nedsatt syn, minskad skygghet, utmärgling och diarré. Sjukdomen karaktäriseras av störningar i centrala nervsystemet, sjukliga förändring på slemhinnorna i matsmältningssystemet och atrofierade lymfatiska organ (Stéen *et al.*, 1993).

Det har framförts olika hypoteser om vad som kan vara anledningen till MWS. De foderrelaterade hypoteserna handlar om att alla faktorer som skapar obalans i kvalitet och kvantitet av föda kan orsaka MWS. Detta kan ske genom förändrade mineral- och metallhalter beroende på försurning, brist på föda beroende på ökande populationer av växtätare eller kontaminerad föda på grund av miljöföroreningar. En annan hypotes menar att infektioner av till exempel virus, bakterier, svamp, protozoer och även prioner (agens som parasiterar på kroppen) kan leda till nedsatt immunförsvar vilket i sin tur skulle kunna orsaka sjukdomar som uttrycker sig som MWS. (Broman *et al.*, 2002)

Sjukdomen drabbar vanligen äldre djur men har även setts på kalvar så unga som 0-6 månader (Stéen *et al.*, 1993). De individer som främst drabbades var äldre kor, men detta förklaras med den rådande ålders- och könsstrukturen i den dåvarande svenska älgstammen. Jakten koncentrerades då främst på tjurar och ledde till en ökning av äldre kor, förhållandet var sex kor per tjur (Steen *et al.*, 1989 se Rehbinder *et al.*, 2004). I en studie av Rehbinder *et al.* (2004) genomfördes obduktioner i fält

på tjugofem avlivade älgar (fyra tjurar och tjugoen kor/kvigor) som uppvisat onormalt beteende och var i dålig kondition. Resultaten från obduktionerna av de sjuka individerna visade att de hade mycket dåliga näringsvärden eller var utmärglade. Utmärbling kännetecknades av stor förlust av muskulatur, kraftig atrofi av benmärg och förlust av koronärt fett. I löpmagen sågs allvarlig hyperemi (ökat blodinnehåll), utvidgning av lymfkärlen och ödem hos alla sjuka individer. En annan skada som kunde ses var utvidgning av Brunnerkörtlarna i tunntarmen och även abnorma förändring i njurar och lever. Hos fjorton av de sjuka individerna kunde cerebellära lesioner (hjärnskada) och andra milda lesioner i hjärnan konstateras hos fem sjuka individer (Rehbinder *et al.*, 2004).

Författarna kunde vid obduktion inte konstatera inflammatoriska förändringar som kunde tas som intäkt på en överförbar sjukdom (som av till exempel virus). Förändringarna som sågs kunde liknas med tecken som uttrycks vid undernäring. Undernäring kan leda till underskott av sekundära spårämnen vilka i sin tur kan resultera i syndrom och olika skador (Rehbinder *et al.*, 2004). Studier genomförda på älgkalvar födda av kor som var misstänkt drabbade av MWS, visar på kliniska patologiska och histopatologiska fynd som starkt överensstämmer med de som ses hos MWS-sjuka älgar. Detta skulle tyda på att det är en överförbar sjukdom (Kallunki Nyström, 2018)

Frank *et al.* (1994) visade att under åren 1982 till 1992 minskade flera viktiga essentiella och icke essentiella metaller hos älgar. Koppar (Cu) i levern minskade successivt med 50%. Även kadmium (Cd) minskade med 25 – 35% medan molybden (Mo) ökade med 20–40% i levern. Obalans av spårämnen i växterna kan i sin tur påverka hälsan hos de drabbade älgarna. Kliniska och patologiska tecken av MWS har starka likheter med vissa symptom som uppträder vid koppar, krom, järn, mangan och magnesiumbrist hos nötkreatur. Symptom som uppträder vid både MWS och mineralbrist är till exempel viktngång, diarré, slöhet, förändringar på slemhinnor i mag- och tarmsystemet och neurologiska symptom (Frank *et al.*, 1994).

## 2.2 Mineraler och spårämnen

Mineraler behövs för reglering av många processer i kroppen till exempel upprätthålla skelettstyrka, styra nerv-och muskelimpulser, men också för att upprätthålla blodtrycket. Några viktiga mineraler är kalcium (Ca), fosfor (P), svavel (S), kalium (K), natrium (Na), klor (Cl) och magnesium (Mg) men också så kallade spårämnen vilka är mineraler som krävs i mindre mängd (Tabell 1). Exempel på spårämnen är järn (Fe), zink (Zn), koppar (Cu), selen (Se), jod (I), kobolt (Co), krom (Cr), mangan



(Mn) och molybden (Mo) (McDonald *et al.*, 2011). Många spårelement har betydelse för upptag och aktiviteter hos andra spårelement. Fram till 1995 hade 25 mineraler klassificerats som essentiella för normal tillväxt och hälsa hos djur.

Spårämnen som Cu, Mo, Fe, Zn, och Mn spelar bland annat en viktig roll hos olika enzymer och i enzymfunktioner (McDonald *et al.*, 2011). Vissa spårämnen har unika metaboliska funktioner, som Co. Kobolt är nödvändigt för tillverkningen av vitamin B12, vilken är en viktig tillväxtfaktor (Staaland & Sæbø, 1993). Brist på Co kan ge sämre tillväxt, minskad vikt (O'Dell & Sunde, 1997), anemi, fettdegenerering av levern (Underwood, 1999) samt ge lägre resistens mot infektioner (Paterson & MacPherson, 1990). Mangan finns i mycket små mängder i djurkroppen men är ändå väldigt viktigt för skelett, koordination hos nyfödda, reproduktion samt glukosutnyttjande (McDonald *et al.*, 2011). Även brist på Mn kan leda till hämmad tillväxt.

Koppar är grundläggande för biokemiska funktioner hos många organismer och är ett essentiellt spårämne som behöver tillföras genom födointag. Koppar har en viktig funktion i bland annat hemoglobinbildningen, men även hos erythrocytprotein, ett annat protein i blodet som har en betydande roll i syremetabolismen (McDonald *et al.*, 2011). Eftersom Cu måste tillföras till kroppen via födan kan svält leda till brist (Rehbinder *et al.*, 2004). Symtomen på Cu-brist är dålig tillväxt, anemi, infertilitet, diarré, förlust av pälspigment, störningar i mag- och tarmsystemet samt lesioner på hjärnstam och ryggrad. Det metalliska grundämnet Mo kan vara begränsande för upptaget av Cu. Molybden begränsar den kopparbehållande förmågan i närvaro av svavel. Denna process minskar mängden tillgängligt Cu och kan leda till sekundär Cu-brist. Järn är ett annat ämne som har stor betydelse för det syretransporterande proteinet hemoglobin. Brist på Fe kan påverka bildningen av proteinet och detta kan i sin tur leda till anemi. (McDonald *et al.*, 2011)

Andra viktiga spårämnen är Cr och Zn. Krom har betydelse för kroppens omsättning av glukos genom att bilda komplex mellan insulin och receptorerna. Ämnet har också en betydande roll i lipidsyntesen samt i protein- och nukleinsyrametabolismen. Brist på Cr kan resultera i sänkning av serumkolesterol och ökning av lipoproteinkolesterol med hög densitet (HDL). Hexavalent Cr kan vara giftigt i för höga doser och kan då skada DNA, leda till sämre tillväxt samt lever och njurskador som har setts hos råttor i laborativa försök. Förutom att vara en viktig komponent i enzymer medverkar Zn även i produktion, lagring och utsöndring av hormoner, elektrolytbalans samt är involverad i immunsystemet. Hos grisar kan Zn-brist ge onormal tillväxt, minskad aptit, parakeratos (förändringar i anslutning till hudcellerna) och en försämrad foderomvandlingsförmåga. Hos nötkreaturskalvar kan Zn-brist ge stelhet i leder, parakeratos, inflammationer i mule och mun samt svullnad kring klövarna. (McDonald *et al.*, 2011)

Kalcium förekommer i stor mängd i djurkroppen och är viktig för normal utveckling av benstomme och tänder. Hos växande djur kan Ca-brist ge försämrad

tillväxt, missbildningar, hälta och stelhet medan hos äldre djur ge benskörhet. (McDonald *et al.*, 2011). Hos vitsvanshjort har Ca-brist visat sig påverka hornutveckling och tillväxt (French *et al.*, 1956). Magnesium är viktig för bland annat effektiviteten av kolhydrat- och fettmetabolismen och Mn är även involverad i cellandningen och flera andra cellulära reaktioner. Brist på Mg kan leda till hypomagnesaemi tetani som är associerat med låga värden i blodet. Denna bristsjukdom har under senaste år fått stor uppmärksamhet för sin höga dödlighet. Symptomen är nervositet, ryckningar i ansiktsmuskler, darrningar, ostabil gång samt kramper (McDonald *et al.*, 2011). Ett överskott av Mg är ovanligt, i alla fall hos nötkreatur. Ett överskott kan minska foderintaget samt ge diarré (NRC, 2001).

Det finns även giftiga ämnen som till exempel kadmium (Cd) och bly (Pb). Kadmium är en tungmetall. Metallen lämnar kroppen långsamt och ackumuleras främst i njurarna där den kan orsaka skada (NRC, 2001). Symptom på Cd-förgiftning är bland annat anemi, försenad testikelutveckling, fjällande hud, förstörade leder, lever- och njurskador, sänkt tillväxt samt ökad dödlighet (Miller, 1971; Powell *et al.*, 1964). Blyförgiftning är den vanligast rapporterade förgiftningen bland lantbrukets djur och främst hos nötkreatur (Ammerman *et al.*, 1973 se Neathery & Miller, 1975). Symptom på Pb-förgiftning kan vara blindhet, muskelspänningar, krampanfall, depressioner samt ge påverkan på det centrala nervsystemet, mag-tarmkanalen, koordination och den röda blodcellssyntesen. (Siegmund, 1973; NRC, 1972)

Tabell 1: Den ungefärliga mängden av viktiga mineraler och spårämnen i djurkroppen per kg kroppsvikt (McDonald *et al.*, 2011).

<b>Mineraler</b>	<b>g/kg</b>
Kalcium	15,0
Fosfor	10,0
Kalium	2,0
Natrium	1,6
Klor	1,1
Svavel	1,5
Magnesium	0,4
<b>Spårämnen</b>	<b>mg/kg</b>
Järn	20–80
Zink	10–50
Koppar	1–5
Molybden	1–4
Selen	1–2
Jod	0,3–0,6
Mangan	0,2–0,5

## 2.3 Kvalitet och kvantitet av föda

För normal funktion och tillväxt är det viktigt med bra kvalitet och kvantitet på föda. En hypotes till *Moose Wasting Syndrome* var att sjukdomen orsakades av intaget av kvantitativ och kvalitativt mineralfattig föda, genom svält eller av förgiftning (Broman *et al.*, 2002). I samband med utbrottet av MWS upptäcktes en ökning av barkning av gran (*Picea abies*) av älg, i Älvsborgs län (Bergström & Hjeljord, 1987). Detta indikerade på en minskning av tillgänglig föda och eller av lågt intag av mineraler, då gran vanligtvis avvisas av älg. Dock kunde ingen generell överbetning ses (Faber & Pehrson, 2000; Cederlund, 1994). Undersökningar visade på att älgkalvar inom områden med mycket barkning hade en högre slaktvikt än kalvar där det inte förekom barkning, vilket också kunde ses hos äldre älgar. Däremot, hade älgar i områden med hög frekvens av barkning och MWS totalt lägre mängd fettdepåer (i sämre kondition) i jämförelse med älgar i områden med ingen barkning och låg frekvens av MWS. Detta överensstämde med hypotesen om minskad mängd tillgänglig föda (Cederlund, 1994).

Under den här tiden var markerna kring Älvsborgs län också påverkade av förorening vilket påverkade pH i både vatten och jord. Koncentrationen av bland annat Cu mättes i lever och njurar från älgar för att undersöka om förändringar i mineraler var orsaken till barkningen av gran och MWS. En minskning av Cu i levern (30%) hittades hos till synes friska älgar (Adrian *et al.*, 1994). Detta kan tyda på att föroreningen påverkade mängden Cu i jord och vatten, vilket i sin tur kan leda till Cu-brist hos älgarna (Blood & Radostits, 1989).

## 2.4 Parasiter (virus, bakterier, prioner och helminter)

Parasiter är organismer som är beroende av att ha en värd som den lever på eller i. En typ av symbios, där parasiten utnyttjar värden på ett sådant sätt att värden tar skada (Willey *et al.*, 2009). En av hypoteserna kring MWS var associerad med parasiter (virus, bakterier, prioner) (Stéen *et al.*, 1993; Reh binder *et al.*, 1991; Feinstein *et al.*, 1987), där en individ utsatt för agens skulle på grund av nedsatt immunförsvar ha större risk att drabbas av MWS.

Vid undersökning med klassisk parasitologi, det vill säga av helminter, kunde Reh binder *et al.* (2004) konstatera att hos 25 döda älgar i dålig kondition, jämfört med 5 referensindivider, så var endast två av de sjuka djuren kraftigt infekterade av parasiter i form av rundmaskarter, *Ostertagia leptospicularis* och/eller *Spiculopterga alcis*. De andra individerna var måttligt eller lågt infekterade.

Virus är en mikroorganism som inte har någon egen ämnesomsättning. Virus kräver därför en levande värdcell för att växa och reproducera sig. Det är ett smittoämne som får värdens kropp att producera nya celler med arvsmassan från viruset. Viruset kan genom detta föröka sig och fortsätta att sprida sig och därmed orsaka sjukdom (Willey *et al.*, 2009).

Då obduktions- och histologibilden i Reh binder *et al.* (2004) tydde på en virusinfektion var *Bovine Virus Diarré Virus* (BVDV), *Reovirus*, *Herpesvirus* eller *Retrovirus* några av de föreslagna viroserna. Den patologiska och kliniska bilden av MWS liknar den för BVDV, en sjukdom som orsakas av *pestivirus* hos nötkreatur (Reh binder *et al.*, 1991). Kliniska tecken på nötkreatur som drabbats av BVDV kan vara diarré, håla, feber, hornhinneödem, noserosioner, avmagring samt grov, skrovlig och torr päls (Constable *et al.*, 2017). Antikroppar mot BVDV hittades hos några älgar som postmortem visade MWS (Feinstein *et al.*, 1987). Däremot påvisades inga BVD-virus. Trots likheterna tycks MWS oftast drabba äldre älgar medan BVD drabbar yngre nötkreatur. Även neurologiska sjukdomstecknen som ses hos MWS drabbade älgar ses inte hos nötkreatur drabbade av BVD (Constable *et al.*, 2017; Stéen *et al.*, 1993).

Merza *et al.* (1994) kunde isolera ett retrovirus, *Alces Leucotropic Oncovirus* (ALOV) från totalt fyra älgar (en referensindivid samt tre sjuka individer) hos älgar med MWS. Resultatet ifrågasattes då ALOV senare visade sig finnas hos både friska och sjuka älgar (Simonsson *et al.*, 1999).

Icke virala patogener i form av bakterier och prioner testades, men med de tester som fanns tillgängliga då kunde inte prioner vilka bl.a. orsakar CWD fastställas (Broman *et al.*, 2002). *Moose Wasting Syndrome* har inte heller visat sig bero på någon specifik bakterieinfektion vilket skulle tyda på att bakterier var orsaken till sjukdomen (Stéen *et al.*, 1993; Reh binder *et al.*, 1991).

## 2.5 Prionprotein

Prionprotein (PrP) tillhör klassen amyloidbildande proteiner som i vissa fall kan associeras med vissa Transmissibla Spongiforma Encefalopatier (TSE)-sjukdomar. Cellulärt prionprotein (PrP<sup>C</sup>) är membranassocierade protein som förekommer i eukaryota celler och är starkt konserverade hos däggdjur, vilket pekar på att de har en viktig funktion för organismen (Kupfer *et al.*, 2009). Då PrP<sup>C</sup> har flera viktiga funktioner föreslogs det 2017 att det skulle ingå i listan bland multifunktionella proteiner (Linsenmeier *et al.*, 2017). Det cellulära prionproteinet har bland annat funktioner inom celladhesion (biomolekylära processer vilket innebär att celler kan binda till varandra och känna av sin omgivning) (Schmitt-Ulms *et al.*, 2001) och neuroskyddande funktioner (Roucou *et al.*, 2004).

Prionsjukdomar uppkommer genom omvandling av PrP<sup>C</sup> till en konformationsförändrad infektiös isoform, Proteinase K resistent prionprotein (PrP<sup>Sc</sup>). Detta innebär att en begränsning av proteasdigestion resulterar i en proteasresistent molekyl. Den proteasresistenta kärnan kan bilda amyloider och aggregat (Prusiner *et al.*, 1983).

### 2.5.1 Prionsjukdomar

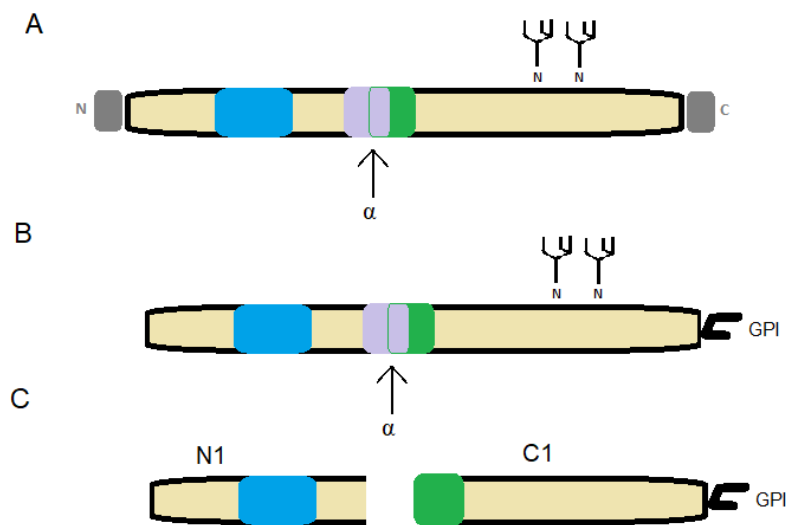
Vanligtvis har TSEs lång inkubationstid men när symptom som beteendeförändringar, depression och okoordinerade rörelser (Sigurdson, 2008) uppträder går förloppet ofta snabbt och leder till hjärnskador och död (Prusiner, 1991). Prionsjukdomar kan drabba både djur och människor. Exempel på prionsjukdomar hos människor är *Creutzfeldt-Jakob Disease* (CJD) vilket är den vanligaste av alla prionsjukdomar hos människor (Wik, 2012). Exempel på prionsjukdomar hos djur är *Scrapie* som drabbar får, *Bovine Spongiform Encephalopathy* (BSE) som drabbar nötkreatur och *Chronic Wasting Disease* (CWD) som kan ses hos hjorddjur (Wik, 2012). Vid kritiska positioner i PrP kan en mindre variation i aminosyrasekvensen ha ett stort inflytande på prionsjukdomens inkubationstid, patologi, mottaglighet samt möjligheten att sjukdomen överförs från en art till en annan (Westaway *et al.*, 1987).

## 2.6 Alfaklyvning av prionproteinet

Det cellulära prionproteinet består av två olika delar. N-terminalen (mindre definierad struktur) samt den globulära C-terminalen. Viktiga funktionella och strukturella beståndsdelar i PrP<sup>C</sup> är N- och C-terminalerna, den hydrofoba kärnan, upp till två N-glukan-sidokedjor, oktamerisk repeterade regioner samt den neurotoxiska domänen (Figur 1). Prionproteinet är beläget i kolesterol- och sfingolipidberikade membran och är fäst på den yttre delen av det cellulära membranet via glykosylfosfatidylinositolankare (GPI) (Figur 1) (Altmeppen *et al.*, 2012).

Alfaklyvningen sker på aminosyrapositionen 110/111–112 hos människor (Mangé *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1995) och på 109 hos möss (Millhauser, 2014). Det bildas då ett N1-fragment samt ett C1-fragment som fortfarande är bundet till membranet via GPI-ankaret. Vid denna typ av klyvning förstörs den neurotoxiska domänen (Figur 1) (Altmeppen *et al.*, 2012). En förutsättning för omvandling från PrP<sup>C</sup> till PrP<sup>Sc</sup> under en prionsjukdom är den neurotoxiska domänen (lila box i Figur 1) (Chen *et al.*, 1995). I och med att denna förstörs under klyvningen kan detta betraktas som en skyddsmekanism mot prionutbredning (Lewis *et al.*, 2009). Anledningen till att alfaklyvning sker är fortfarande okänd (Altmeppen *et al.*, 2012).

Alfaklyvning som skett naturligt i vävnaden kvantifieras med formeln  $(C1/(Hela\ längden\ på\ PrP^C + C1)) * 100\%$ ), där resultatet presenteras i procent.



Figur 1. Schematisk bild på det cellulära prionprotein (PrP<sup>C</sup>) samt vad som sker vid alfaklyvning. (A) PrP<sup>C</sup> med viktiga proteindomäner, N-terminal (aa 1–23, grå box), C-terminal (aa 230–254, grå box), oktamerisk repeteringsregion (aa 51–90, blå box), neurotoxisk domän (aa 105–125, lila box), hydrofob kärna (aa 111–134, grön box) samt N-glykan sidokedjor  $\leq 2$  stycken (aa 180 och 196). (B) Mogna PrP, där N och C terminalerna är borttagna. (C) Alfaklyvning sker på position aa 110/111–112, denna typ av klyvning förstör den neurotoxiska domänen (lila box) och leder till ett membranbundet C1-fragment via GPI-ankare och ett lösligt N1-fragment. Bild modifierad från Altmeyen *et al.*, 2012.

## 2.7 Chronic Wasting Disease

*Chronic Wasting Disease* (CWD) är en prionsjukdom eller TSE som förekommer hos hjort, rådjur och älg, både viltlevande och i hägn och upptäcktes för första gången 1967. Först 1978 beskrevs sjukdomen som en TSE grundat på histopatologi på hjärnan (Williams & Young, 1980). Sjukdomen har endast kända fall i Nordamerika, Sydkorea och nu i Skandinavien. I tidigt stadium visar sig sjukdomen genom viktminskning och beteendeförändring (Sigurdson, 2008). *Chronic Wasting Disease* anses vara den prionsjukdom på djur som har den snabbaste spridningen. Proteinase-K-resistent prionprotein (PrP<sup>Sc</sup>) tillväxer i skelettmuskulatur, blod, saliv, urin och avföring. Hur CWD sprids är fortfarande oklart men hypoteser varierar mellan spridning via direktkontakt, förmultnade kadaver eller via intag av föda från prioninfekterade områden (Wik, 2012).

Genetiska studier har visat att det finns en korrelation mellan aminosyrasekvensen hos PrP och känslighet för CWD-infektion (Johnson *et al.*, 2006). Genen *PRNP*

sekvenserades och den translaterade proteinsekvensen jämfördes mellan olika hjortdjur. Hos den europeiska älgen framträder en unik variant i PrP kodon 109, och aminosyravariationerna homozygot (K/K och Q/Q) och heterozygot (K/Q) upptäcktes av Wik *et al.* (2012). Potentiellt kan denna mutation påverka PrP biokemiskt.

## 2.8 Variant K109Q

För att undersöka om det finns någon koppling mellan K109Q-varianten och MWS-sjuka djur bestämdes genotypen på älgar med konstaterad MWS och friska djur. Resultatet visade att proportionen heterozygoter K/Q var högre hos de MWS-sjuka djuren än hos de friska. När genotyperna A/C och C/C jämfördes så var den större andelen av sjuka djur A/C. Ett samband mellan MWS och K109Q-varianten kunde därför konstateras (Wik *et al.*, 2012).

## 2.9 Bestämning av genotyp

Genotypning sker med hjälp av en assay som upptäcker varianter av en nukleotidsekvens. Genom att ha två prober närvarande i reaktionen gör det möjligt att genotypa två möjliga varianter (alleler) vid en mutation i målsekvensen. TaqMan® SNP Genotyping Assay består av en forward och en reverse primer och två allelspecifika prober som dektekterar de två allelerna. Vid denaturering sker en annealing (fästning) av forward primern, reverse primern och den probe som passar provets genotyp på DNA templet och en signal genereras (Thermo Fisher Scientific Inc, 2016).

## 3 Material och metod

### 3.1 Datamaterial

Materialet innehöll data från 2331 älgar insamlade från stora delar av Sverige, mellan åren 1980 och 2018, och innehöll både kor och tjurar i olika åldrar. Information innehöll data från friska samt sjuka individer, både avlivade på grund av dålig kondition, skjutna under jakt eller hittade självdöda. Data i form av resultat från kemiska analyser av lever, njure samt blodvärden, insamlingsår, genotyp, sjukdomsklass (Tabell 3), kön, ålder, alfaklyvning, fyndplats, avlivad eller självdöda, identitetsnummer, diagnos (frisk eller sjuk) samt anamnes fanns tillgängligt. Från vissa individer fanns även tillgång till vävnadsprover i form av till exempel muskelvävnad, blod eller hjärna. Sveriges lantbruksuniversitet, Sveriges veterinärmedicinska anstalt samt Stockholms universitet är insamlarna av datamaterialet.

Variablerna från datasetet *Genotyp 3b* (Tabell 2) användes i den statistiska analysen. Två nya dataset innehöll samma variabler som *Genotype 3b* men delades upp utifrån insamlingsår 1980–1998 (*genotyp80.98*) samt 2005–2018 (*genotyp05.18*), för att jämföra data inom provtagningsperioderna. Under analysens gång utformades nya dataset anpassade för korrelationsmatrixen (Tabell 3).



Tabell 2. Datasetet Genotype 3b består av de variabler som användes under den statistiska analysen. Samma variabler men uppdelade utifrån insamlingsår användes även för dataseten genotyp80.98 samt genotyp05.18.

<b>Genotype 3b</b>	
Insamlingsår (1980 – 2018)	Genotypkod (0: AA, 1:AC,2:CC)
PrP Alfaklyvning	Sjukdomsklass (1 – 7)
Ålder	LeMg
LeFe	LeZn
LeCa	LeCu
LeMn	LeCd
LeMo	LeCo
LePb	LeCr

Tabell 3. Variablerna samt antal individer i dataseten använda till korrelationsmatrixen

	<b>Ålder</b>	<b>Sjukdomsklass</b>	<b>Alfaklyvning</b>	<b>Genotyp 5b</b>
	Ålder	Sjukdomsklass	Alfaklyvning	Alfaklyvning
	Sjukdomsklass	Insamlingsår	Insamlingsår	Sjukdomsklass
	LeMg	Ålder	Ålder	Ålder
	LeCd	LeCr	LeCo	Genotyp
	LeMo		Genotyp	Kön
Antal individer	106	93	49	51

Tabell 4. Klassificeringslista från klass 1–7 med yttre och inre symptom. Yttre: anamnestiska uppgifter, inre: fynd vid obduktion. Klassificeringen användes vid obduktion av älgar i fält under 1980–1990 talet (Personlig kommentar Stéen, M. 2019)

<b>Sjukdomsklassificering</b>	<b>Symptom</b>
<b>1</b>	Tydliga yttre och inre symptom: cirkelgång, avmagring, ostadiga rörelser samt fula tarmar, tunn mjälte och slemhinnesår
<b>2</b>	Tydliga yttre och svaga inre symptom: cirkelgång, avmagring, ostadiga rörelser samt lindriga förändringar i tarm och normal mjälte

---

3	Svaga yttre och tydliga inre symptom: ostadig gång men tydliga tarm- och slemhinneskador
4	Inga yttre och tydliga inre symptom: fula tarmar, tunn mjälte och slemhinnesår i övrigt normal
5	Svaga yttre och svaga inre symptom: något oskygg och ostadig med lindriga tarmförändringar
6	Inga yttre och svaga inre symptom: normal älg som vid urtagning befinns ha tarmblödningar och förminskad mjälte
7	Inga yttre och inga inre symptom

---

### 3.2 DNA preparation

Genomiskt DNA preparerades från 130 fallviltsprover insamlade av SVA under 2016–2018. Vävnadsproverna (muskel eller hjärna) förbereddes för DNA-preparering genom att 25 mg vävnad överfördes till ett 2 ml mikrocentrifugrör. Därefter tillsattes 220 µl ATL-buffert samt 20 µl proteinas K (20 mg/ml) till mikrocentrifugrören. Rören placerades i ett värmeblock med skakning vid 900 varv per minut (rpm), 56°C i 1–2 timmar tills vävnaden var helt lyserad. Sedan överfördes 220 µl supernatant till provrör anpassade till QIASymphony-roboten. Förutom vävnadsprover användes även blodprover från sju andra individer ifrån studien för att preparera DNA. Blodproverna förbereddes genom att 350 µl blod överfördes från provröret till ett provrör anpassat till QIASymphony-roboten. Alla provrör fördes sedan in i QIASymphony-robot och DNA preparerades med kittet Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP för kitversion 1 (QIAGEN, Hilden, Tyskland, 2015). QIASymphony är en robot som utnyttjar magnetiska partikelteknologi för att automatiskt isolera och rena DNA från biologiska prov (QIAGEN, Hilden, Tyskland, 2015).

För att kvantifiera halten av DNA i lösningen samt dess renhet användes Nanodrop 8000 spektrofotometer (optiskt mätinstrument) på de första 24 proverna för att försäkra att isoleringen och reningen av DNA:t lyckats.

### 3.3 Genotypning

En individs arvs massa och ansvarar för den ärftliga variationen. En gen kan ha två eller flera olika varianter, vilket kallas för alleler. Med genotypning är det möjligt att särskilja de olika allel kombinationerna och därmed utforska de genetiska variationerna (Griffiths *et al.*, 2012).

Realtidsinstrumentet StepOnePlus användes för att bestämma genotypen av den kända mutationen K109Q med Taqman-prober som tidigare beskrivits av Wik *et al.* (2012). Då A allelen är den vanligaste och C är den ovanliga, antas att C är mutanten.

Inför genotypningen blandades TaqMan® Universal PCR Master Mix, TaqMan® SNP Genotyping Assay och DNase-free H<sub>2</sub>O (katalognummer AM9937) (ThermoFisher scientific, Waltham, MA USA) i ett provrör för det antal prover som skulle förberedas utifrån (Tabell 5), plus tillägg för 5% överskott. 13,5 µl av de blandade reagenserna överfördes till antalet brunnar som skulle användas i en MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate. Därefter tillsattes 1,5 µl DNA per brunn. Utöver det DNA som skulle genotypas valdes en kontroll ut för vardera av genotyperna AC, AA och CC samt en negativ kontroll.

Tabell 5. Mängd (µl) Taqman® Universal PCR Master Mix, Taqman® Genotyping Assay, DNase-free H<sub>2</sub>O och DNA per prov för genotypning.

	<i>Per 1 prov (µl)</i>
<i>Taqman® Universal PCR Master Mix</i>	7,48
<i>Taqman® Genotyping Assay</i>	0,37
<i>DNase-free H<sub>2</sub>O</i>	5,61
<i>Per brunn</i>	13,5
<i>DNA</i>	1,5
<i>Total Volym (µl) per brunn</i>	15

### 3.4 Statistisk analys

Programmet Rstudio v1.1.463, R versionen 3.5.1 (RStudio, Inc) användes för databehandling samt den statistiska analysen. R-paket som användes var bland annat *Stats* för statistiska beräkningar, och *Corrplot* för visualisering av korrelationsmatrix. Data i form av insamlingsår, genotyp, alfaklyvning, sjukdomsklass, ålder, blodkemi och kemvärden från lever och njurar användes i analysen. Cirkeldiagram för att visa sjukdomsklass och genotyp, stapeldiagram med sjukdomsklass och kön,

sjukdomsklass och genotyp på individerna samt genotyp och alfaklyvning, konstruerades med hjälp av Microsoft Excel.

Det fanns normalfördelade, snedfördelade (fördelning med huvuddelen av frekvenserna i ena änden och en ”svans” i andra) samt binomialfördelade variabler. För vidare analys genomfördes transformation (Bilaga 1) då alla variabler inte var normalfördelade. Transformer används vanligen så att uppgifterna tycks uppfylla antagandena för de statistiska analyserna eller för att förbättra tolkbarheten.

På grund av mängden observationer där det inte fanns värden för vissa variabler, begränsades antalet variabler till insamlingsår, genotyp kod, alfaklyvning, sjukdomsklass, ålder och levervärden LeFe, LeMg, LeZn, LeCa, LeCu, LeMn, LeCd, LeMo, LeCo, LePb och LeCr (Tabell 2). I den här studien lades fokus på ålder, sjukdomsklass och alfaklyvning, då dessa var av störst intresse.

Mängden data utan värde (NA) var alldeles för omfattande för vidare korrelationsanalys. Därför genomfördes en rensning av data där alla individer med NA i de variabler som analyserades i de olika korrelationsmatrix togs bort. Nya dataset formades med de variablerna som mest korrelerade med den beroende faktorn. De nya dataseten kallades *Ålder*, *Sjukdomsklass* och *Alfaklyvning*. Efter rensningen reducerades antalet individer drastiskt, *Ålder* innehöll 106 individer, *Sjukdomsklass* innehöll 93 individer och *Alfaklyvning* innehöll 49 individer (Tabell 3). De nya anpassade dataseten användes för en illustration av sambanden i en korrelationsmatrix. För att göra en korrelationsmatrix användes R-paketet ”corrplot”.

För vidare analys med samband mellan alfaklyvning, genotyp, sjukdomsklass, ålder och kön utformades ett nytt dataset. Det nya datasetet *Genotyp 5b* innehöll endast individer som hade värden på alla variabler (alfaklyvning, genotyp, sjukdomsklass, ålder och kön). Datasetet kom då att innehålla observationer från 51 individer (Tabell 3). Därefter gjordes korrelationsmatrixer för visualisering av sambanden mellan de olika variablerna utifrån alfaklyvning, sjukdomsklass och ålder.

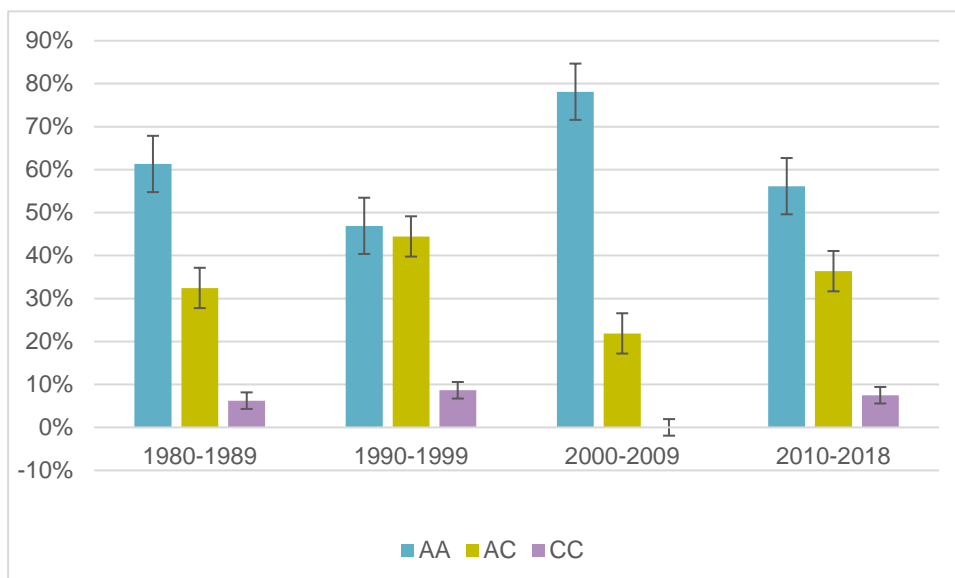
Vid analys inom de olika provperioderna 1980 – 1998 (*genotyp80.98*) samt 2005 – 2018 (*genotyp05.18*) kunde endast variablerna insamlingsår, genotyp kod, alfaklyvning, sjukdomsklass och ålder analyseras på grund antalet NA i vardera datasetet. Antalet individer i dataseten reducerades till 31 för *genotyp80.98* och 72 för *genotyp05.18* där alla individer hade data på alla variabler.

## 4 Resultat

### 4.1 Genotypning

Genotypning av totalt 149 individer med TaqMan® prober gav resultaten 86 AA, 49 AC, 5 CC samt 9 individer där inget resultat gick att få fram.

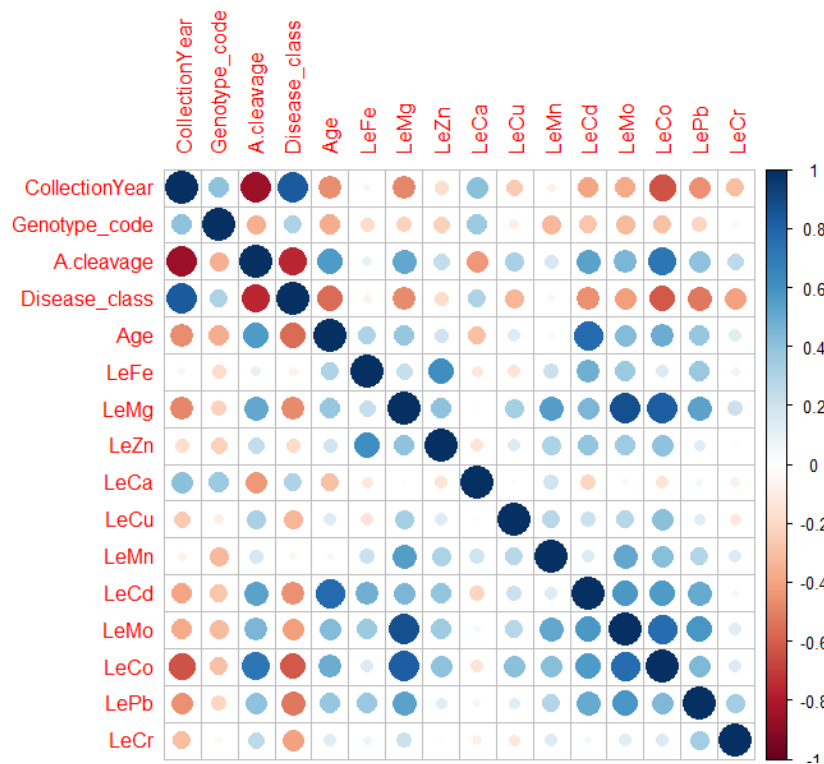
Totalt i datasetet *Genotype 3* hade 1409 individer angiven genotyp. Fördelningen var totalt 848 AA, 471 AC och 90 CC under åren 1980–2018. Figur 2 visar den procentuella fördelningen mellan genotyperna (AA, AC och CC) under de olika provperioderna. Fördelningen av individerna mellan provperioderna är 1109 individer år 1980–1989, 81 individer år 1990–1999, 32 individer år 2000–2009 och 187 individer år 2010–2018. Fördelningen mellan provperioderna varierar inom genotyperna med, AA mellan 47-78%, AC mellan 22-44% och CC mellan 0-9%. Detta med undantag för provperioden 2000–2009 där andelen AA ligger på 80%, AC på 20% och CC på 0%.



Figur 2: Den procentuella fördelningen mellan genotyperna AA, AC och CC inom de olika provperioderna utifrån totalt 1409 individer. Fördelningen av individer mellan de olika provperioderna är 1109 (1980-1989), 81 (1990-1999), 32 (2000-2009) och 187 (2010-2018).

## 4.2 Korrelationsanalyser

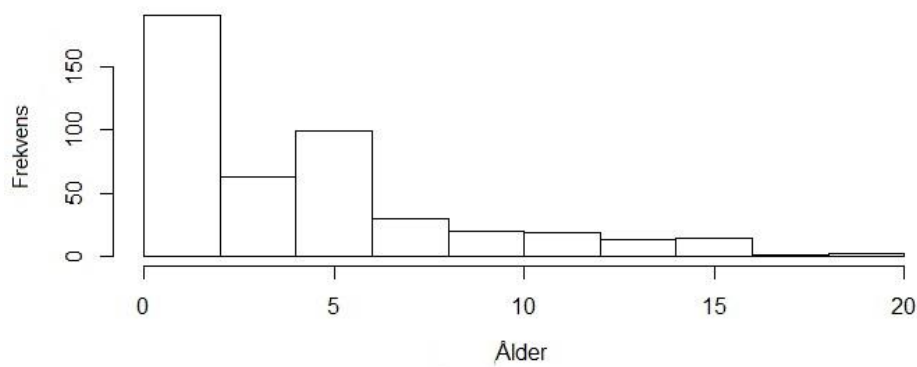
Den statistiska analysen genomfördes på variablerna insamlingsår, genotyp, alfaklyvning, sjukdomsklass, ålder, LeFe, LeMg, LeZn, LeCa, LeCu, LeMn, LeCd, LeMo, LeCo, LePb samt LeCr ifrån datasetet *Genotype 3*. Korrelationsmatrix (Figur 3) ger en överblick på hur de olika variablerna är korrelerade. Bland annat kan starka positiva samband ses mellan LeMg och LeMo vilket kan tyda på att vid hög anrikning av Mg i levern kan också Mo anrikas i hög grad. Det samma gäller även för LeMg och LeCo. Ett positivt samband kan även ses mellan LeCd och ålder, vilket tyder på att äldre individer har en högre anrikning av Cd i levern i jämförelse med yngre individer. Starkt negativt samband ses mellan alfaklyvning och insamlingsår så även mellan LeCo och insamlingsår.



Figur 3. Korrelationsmatrix består av alla undersökta variabler från Genotype 3b. Blå cirkel tyder på en positiv korrelation, det vill säga om x ökar, ökar y. Negativ korrelation visas som röda cirklar. Vid en negativ korrelation minskar y när x ökar. Storlek på cirkel samt nyans på färg beskriver om det är en stark eller svag korrelation.

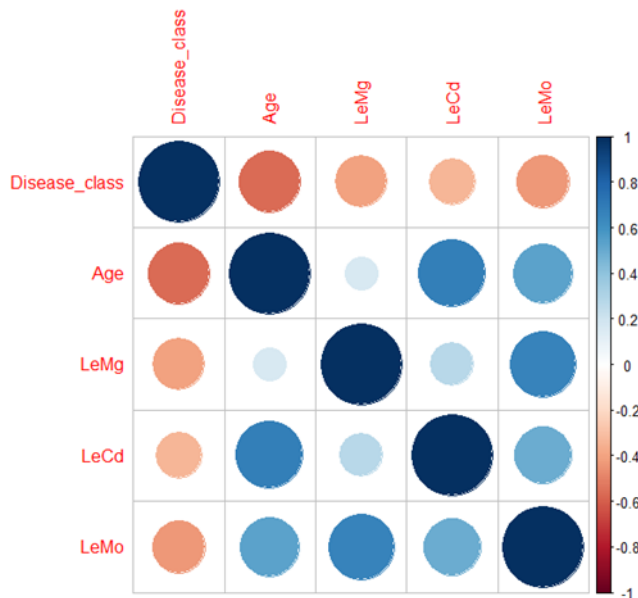
#### 4.2.1 Ålder

Det ursprungliga datasetet (*Genotype 3b*) bestod av totalt 2331 individer. Därav hade 288 individer registrerad ålder mellan 0,5 – 19,5 år. Dessa användes i histogrammet för att visa åldern på individerna. Majoriteten av individerna med angiven ålder är yngre än två år, därefter sjunker antalet individer för varje ålderskategori efter fem års ålder (Figur 4).



Figur 4. Åldersfördelningen mellan individerna från 0,5 – 19,5 år utifrån 288 individer med angiven ålder i Genotyp 3

Sambandet mellan ålder och variablerna sjukdomsklass, LeMg, LeCd och LeMo (Tabell 3) undersöktes genom en korrelationsmatrix (Figur 5). Resultatet visar en negativ korrelation i förhållande till sjukdomsklass ( $-0,57$ ;  $p = 0,001$ ) samt en positiv korrelation till LeCd ( $0,69$ ;  $p = 0,001$ ), LeMo ( $0,53$ ;  $p = 0,001$ ) och en svag korrelation till LeMg ( $0,17$ ;  $p = 0,001$ ). Resultatet visar att med en ökad ålder så anrikas högre halter av Cd och Mo i levern samt att äldre djur uppvisar en högre sjukdomsgrad (dvs sjukdomsklass 1-2,) än yngre djur.

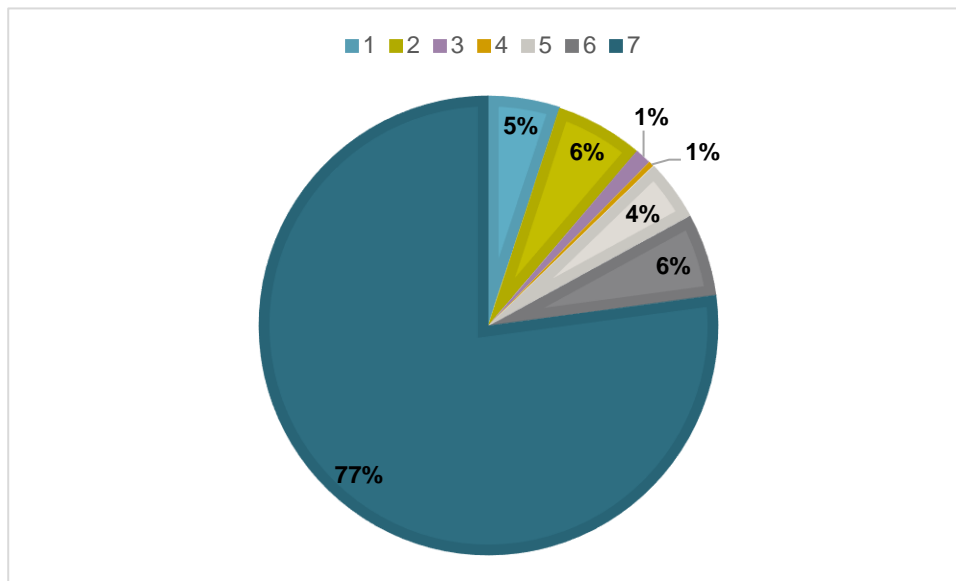


Figur 5. Korrelationsmatrix på sjukdomsklass, ålder, LeMg, LeCd och LeMo utifrån Ålder, bestående av 106 individer. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3.



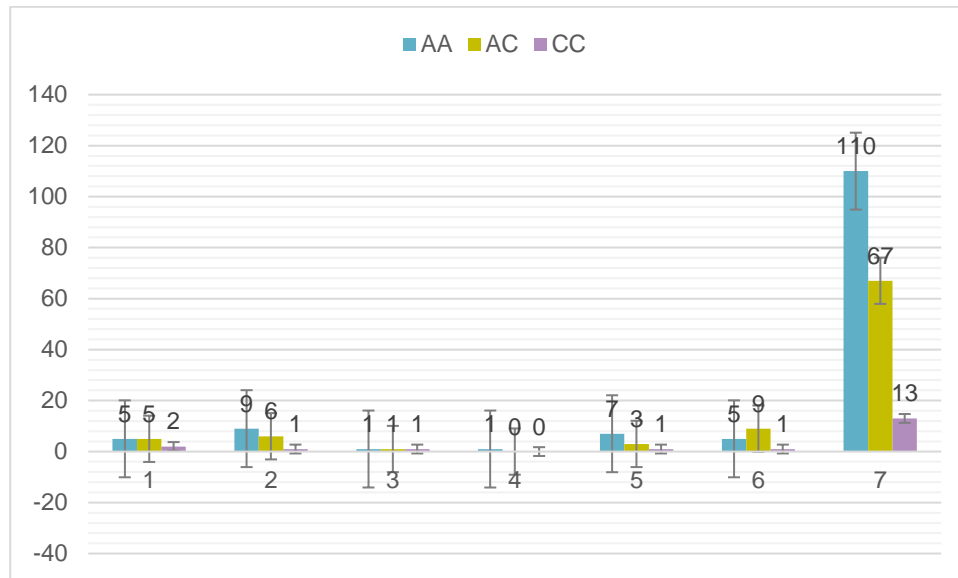
#### 4.2.2 Sjukdomsklass

Vid analys av fördelningen mellan sjukdomsklasserna användes alla individer i *Genotype 3* med angiven sjukdomsklass, vilket resulterade i 258 individer. Resultatet visar på att 77% av individerna med angiven sjukdomsklass var friska utan inre eller yttre symtom. Svaga inre symtom men inga yttre (klass 6) kunde ses hos 6 % och svaga inre samt yttre symptom (klass 5) kunde ses på 4%. Hos 1% av individerna kunde inga yttre symtom ses men tydliga inre skador (klass 4) och 1% visade även på svaga yttre och tydliga inre symtom (klass 3). Klass 1 (5%) och 2 (6%) visar på tydliga yttre symptom samt tydliga till svaga inre symptom (Tabell 4) (Figur 6).



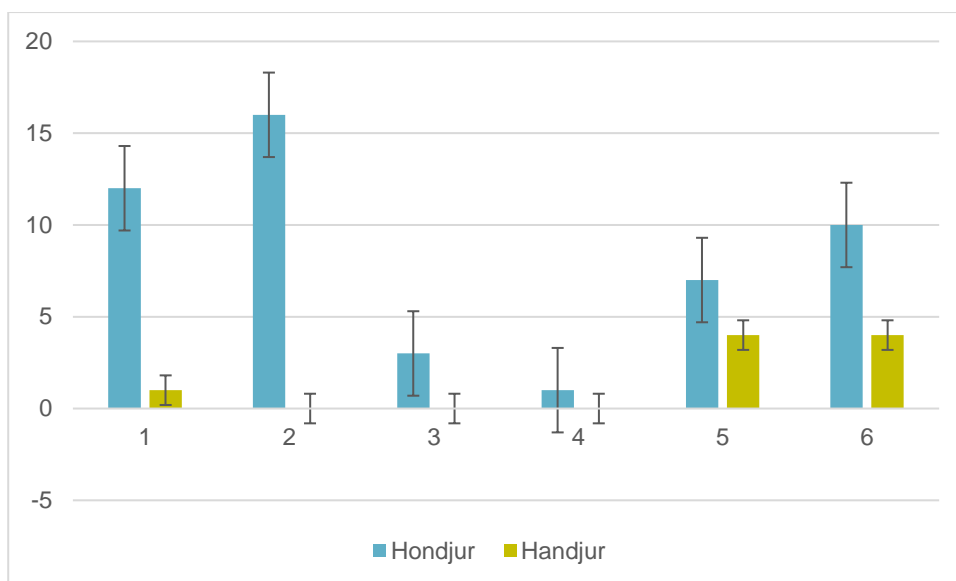
Figur 6. Cirkeldiagram på sjukdomsklass från de insamlade individerna med angiven sjukdomsklass mellan åren 1980–2018 (258 av 2280 individer). Klass 1: tydliga yttre samt inre symtom, 2: tydliga yttre och svaga inre symptom, 3: svaga yttre och tydliga inre symtom, 4: inga yttre men tydliga inre symptom, 5: svaga yttre och inre symptom, 6: inga yttre samt svaga inre symptom, 7: inga yttre eller inre symptom (tabell 3). En standardavvikelse på 1,779.

För fördelningen mellan genotyp och sjukdomsklasserna (Tabell 4) analyserades 248 individer med angiven sjukdomsklass och genotyp utifrån *Genotype 3b* (Figur 7). Flest individer i datamaterialet hade den angivna sjukdomsklassen 7, alltså friska, totalt 190 individer. Andelen individer med genotyp AA är 56%, AC är 37% medan CC endast står för 7%.



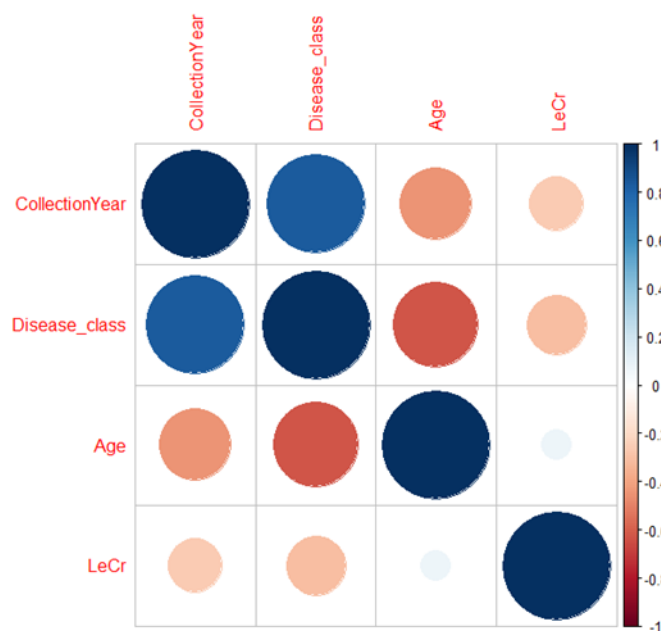
Figur 7. Fördelningen mellan sjukdomsklass och genotyperna AA, AC och CC med sjukdomsklass 1–7 utifrån 248 individer

Fördelningen mellan individerna i *Genotype 3b* med angivet kön, innehållande 223 hondjur och 152 handjur. Stapeldiagrammet visar endast de individer med sjukdomsklass 1–6 då andelen individer med sjukdomsklass 7 bestod av hela 77% i jämförelse med de andra sjukdomsklasserna som totalt stod för 23% (Figur 6). Resultatet i den här studien visar att kor drabbats oftare än tjurar i varje angiven sjukdomsklass (Figur 8).



Figur 8. Stapeldiagram med sjukdomsklass 1–6 samt kön på individerna. Totalt 223 hondjur och 152 handjur med angiven sjukdomsklass 1 – 7.

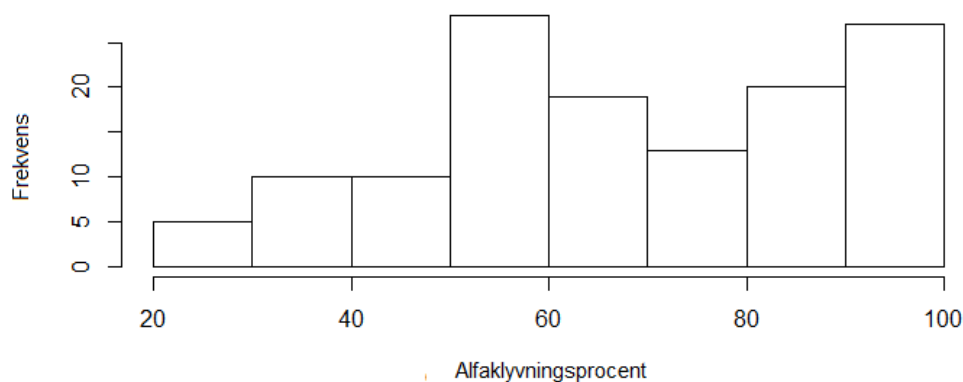
Analysen genomfördes på 93 individer utifrån det anpassade datasetet *Sjukdomsklass* (Tabell 3). Resultatet visar på en stark positiv korrelation mellan sjukdomsklass och insamlingsår (0,84;  $p = 0,001$ ). Vid senare insamlingsår ökar andelen individer med mindre sjuka djur. Detta visar att vid tidigare insamlingsår var fler djur drabbade av MWS än vid senare insamlingsår. Analysen visar även på negativ korrelation mellan sjukdomsklass och ålder (-0,63;  $p = 0,001$ ), det vill säga att äldre individer generellt har en lägre sjukdomsklass (klass 1–2), det vill säga är sjukare än yngre individer. Sjukdomsklass visar även på ett samband till LeCr (-0,31;  $p = 0,05$ ), vilket tyder på att sjukare djur har mer anrikat Cr i levern i jämförelse med friska individer (Figur 9).



Figur 9. Korrelationsmatrix på sjukdomsklass, insamlingsår, ålder och LeCr utifrån 93 individer i det anpassade datasetet *Newdata\_Disease\_class.clean*. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3.

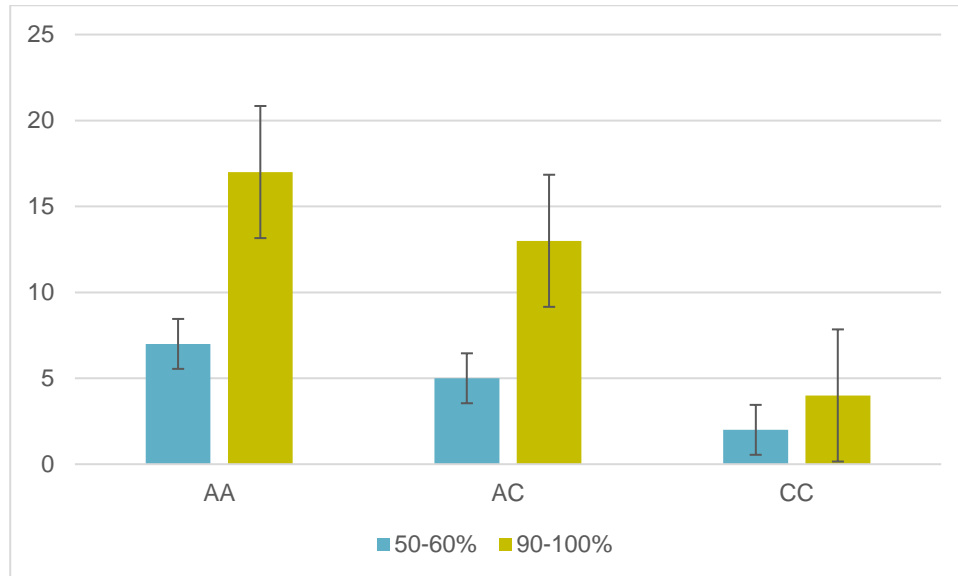
#### 4.2.3 Alfaklyvning

Fördelningen av alfaklyvning analyserades på 208 individer med angiven alfaklyvning i datasetet *Genotype 3*. Hög procentsats tyder på att en hög andel av prionproteinet har kluvits. Motsatsen gäller vid låg procentsats då en låg andel av prionproteinet har kluvits. Fördelningen är ojämn men en högre frekvens kan ses vid 50 – 60 % samt 90 – 100%. (Figur 10)



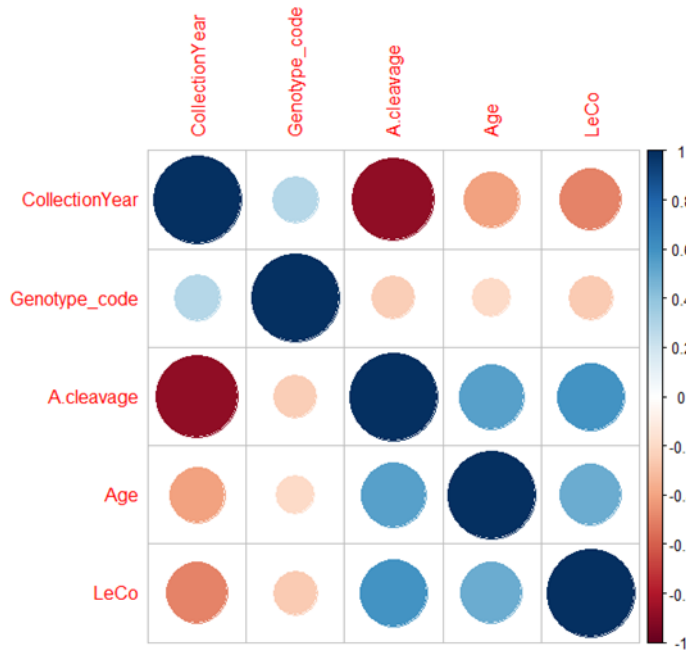
Figur 10. Histogram på alfaklyvning i procent utifrån 208 individer i *Genotype 3b*. En standardavvikelse på 29,886.

Genotypfrekvens i de två topparna 50–60% och 90–100% i Figur 10 analyserades för de individer med angiven alfaklyvningsprocent inom de två topparna samt angiven genotyp. Resultatet utifrån totalt 48 individer (14 individer inom 50–60% och 34 individer inom 90–100%) utifrån *Genotyp 3* visar på en likande fördelning av genotypfrekvenserna som i Figur 2. Inom intervallet 50–60% är antalet AA sju (50%), AC fem (36%) och CC två (14%) och fördelningen inom 90–100% är, AA sju (50%), AC tretton (38%) och CC fyra (12%) (Figur 11).



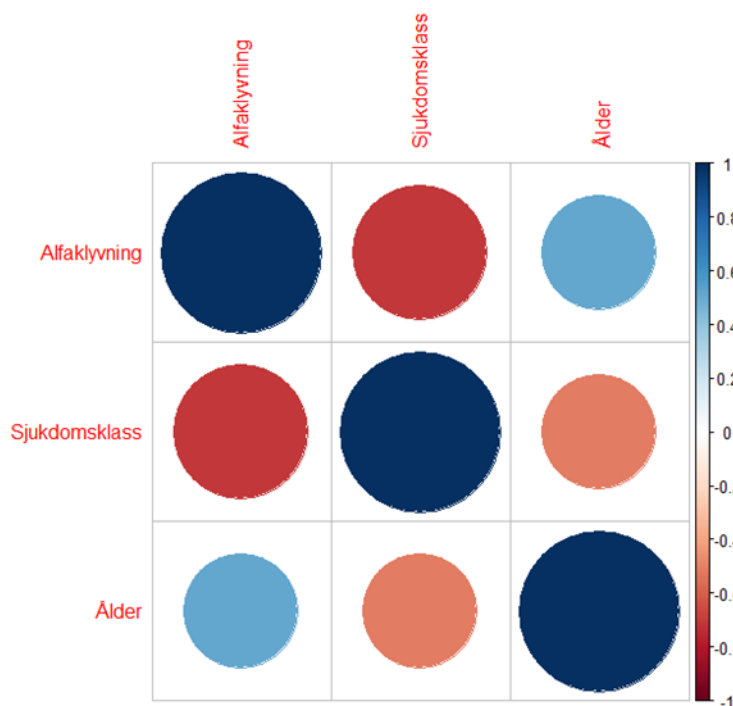
Figur 11. Fördelning av genotyperna AA, AC och CC när alfaklyvningen är 50–60% respektive 90–100% utifrån *Genotyp 3* och 48 individer, 14 inom 50–60% och 34 inom 90–100%.

Korrelationsmatrix utifrån *Alfaklyvning* (Tabell 3) med 49 individer visar på en negativ signifikant korrelation mellan alfaklyvning och insamlingsår ( $-0,88$ ;  $p = 0,001$ ). Detta tyder på att prover insamlade från tidiga insamlingsår (1980–2000-talet) har en högre alfaklyvningsprocent än prover insamlade från sena insamlingsår. En högre ålder hos älgarna visar även på en högre alfaklyvningsprocent, alltså en positiv korrelation på  $0,55$  ( $p = 0,05$ ). Ett positivt samband kan även ses till spårämnet Co i levern (LeCo) på  $0,59$  ( $p = 0,05$ ) samt ett svagt, men ej signifikant, samband till genotyp ( $0,28$ ) (Figur 12).



Figur 12. Korrelationsmatrix av alfaklyvning, insamlingsår, ålder, genotyp och LeCo utifrån 49 observationer. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3.

Statistisk analys av 51 individer där alla hade angivna värden på genotyp, alfaklyvning, sjukdomsklass, ålder och kön (*Genotype 5b*). Samband kunde endast ses mellan alfaklyvning, sjukdomsklass och ålder, därför inkluderades endast dessa i matrixen. Sambandet mellan alfaklyvning och sjukdomsklass ( $-0,7; p = 0,001$ ) tyder på att sjuka individer generellt har en högre alfaklyvningsprocent än de friska individerna. Likaså visar sambandet mellan alfaklyvning och ålder ( $0,52; p = 0,1$ ) att äldre älgar har högre alfaklyvningsprocent än yngre (Figur 13).



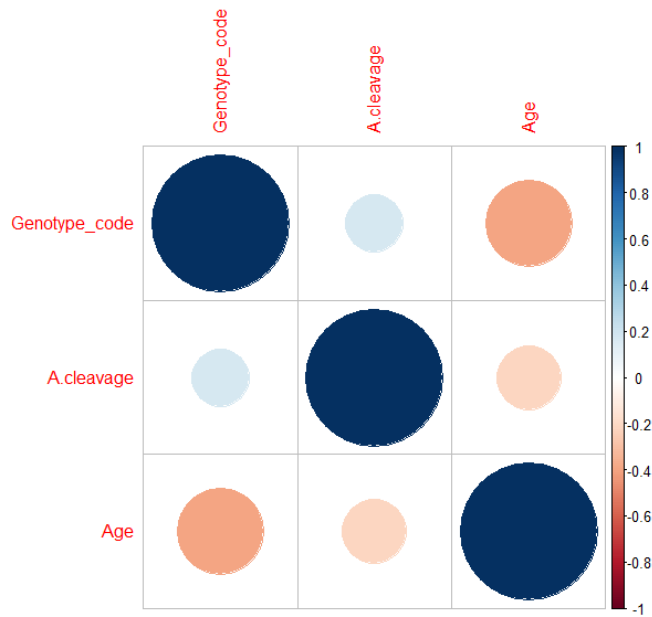
Figur 13. Korrelationsmatrix av alfaklyvning, sjukdomsklass och ålder utifrån 51 individer. Datasetet Genotype 5b (tabell 3) innehöll endast de individer som hade värden på genotyp, alfaklyvning, sjukdomsklass, ålder och kön. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3.

För jämförelse inom olika provperioder skapades dataset genotyp80.98 samt genotyp05.18. Figur 14 visar korrelationer inom provperioden 1980 – 1998, där det finns svaga samband mellan insamlingsår och alfaklyvning ( $0,35$ ;  $p = 0,05$ ). Även ålder och alfaklyvning ( $0,39$ ;  $p = 0,01$ ) visar på ett positivt samband, vilket tyder på att med ökad ålder ökar alfaklyvningsprocenten. Även här visas ett negativt samband mellan ålder och sjukdomsklass ( $-0,38$ ), vilket tyder på att det främst är äldre individer som drabbas (Figur 14). Inom provperioden 2005 – 2018 kan skillnader ses mellan genotyp, alfaklyvning och ålder (Figur 15). Då värdena för sjukdomsklass till största del bestod av klass 7 kunde ingen korrelation utformas i figur 15. Figur 15 visar på svagt positivt samband mellan genotyp och alfaklyvning ( $0,18$ ) samt ett negativt samband mellan genotyp och ålder ( $-0,4$ ). Detta tyder på att individer med hög alfaklyvningsprocent i större utsträckning har genotypen CC än de med lägre alfaklyvningsprocent, tvärt emot gäller för individer med högre ålder, då genotypen AA är vanligast. Ett negativt samband kan konstateras mellan ålder och alfaklyvning ( $-0,22$ ;  $p = 0,01$ ), vilket skulle tyda på med ökad ålder minskar alfaklyvningsprocenten inom insamlingsåren 1980-1998.



Figur 14. Korrelationsmatrix av insamling åren genotyp, alfaklyvning, sjukdomsklass och ålder inom insamlingsåren 1980 - 1998 (genotyp80.98) utifrån 31 individer. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3.





Figur 15. Korrelationsmatrix av genotyp, alfaklyvning och ålder inom insamlingsåren 2005 - 2018 (genotyp05.18) utifrån 72 individer. För beskrivning vid avläsning av matrixen se figurbeskrivning 3.

## 5 Diskussion

Resultaten i studien tyder på att det finns både positiva och negativa samband mellan de olika variablerna. Men, för mer trovärdiga och säkra resultat skulle det krävas flera individer med mer data per individ, eller hopslagning av till exempel av ålderskategorier (kalvar, unga, vuxna, gamla). Datamaterialet som användes innehöll totalt 2331 individer och 67 variabler och identitetsnummer. Ingen individ hade data på alla variabler, vilket resulterade i problem vid den statistiska analysen och därmed räknades all bloddata samt njurdata bort. Många individer saknade även data i form av kön, ålder och sjukdomsklass. Inför korrelationsberäkningar rensades datan från individer med NA, detta resulterade i en drastisk minskning av antalet individer. För resultat med större sannolikhet skulle multivariatanalys kunna användas, då dessa behandlar mer än en variabel åt gången. Detta skulle då kunna visa på om till exempel två oberoende variabler i samband påverkar den beroende variabeln. Till skillnad från analysen i den här studien då endast en oberoende variabel analyseras tillsammans med den beroende variabeln.

### 5.1 Genotyp

Fördelningen av genotyperna mellan provperioderna varierar en del, då AA ligger mellan 47-78%, AC mellan 22-44% och CC på 0-9%. Detta med undantag för provperioden 2000–2009 där andelen AA ligger på 80%, AC på 20% och CC på 0%. Den största skillnad kan ses inom provperioden 2000–2009. Detta kan bero på att denna provperiod endast bestod av 32 individer, i jämförelse med 1109 individer (1980–1989), 81 (1990–1999) och 187 (2010–2018). Skillnaden kan bero på slumpen eller annan påverkan på älgstammen mellan perioderna och främst då vad avser individer med genotyp AC och CC (Figur 2). Vid analys inom provperioderna 1980–2000 och 2005–2018 (Figur 14 och 15) påvisades negativa samband mellan genotyp och alfaklyvning, och också mellan genotyp och ålder. Detta skulle alltså tyda på att vid hög alfaklyvningsprocent är genotypen AA vanligt förekommande

och lika så vid hög ålder. Dock kunde ingen tydlig bild fastställas för vilken eller vilka genotyper som främst drabbats av MWS (Figur 7).

## 5.2 Ålder

Sjukdomen ger intryck av att främst drabba äldre djur, då sjukare djur har högre ålder (regressionskoefficienten:  $-0,57$ ; Figur 5). Då MWS främst drabbar äldre individer kan det diskuteras om orsak till sjukdom kan vara på grund av biologiskt åldrande eller på grund av ett agens som tar lång tid att utveckla sig. Minskad kvantitet på föda och sämre foderbearbetning skulle kunna leda till brist på mineraler och spårämnen. I mitten på 1980-talet var markerna i Älvsborgs län, där många djur undersöktes för MWS, svårt försurade vilket kan ha påverkat växternas näringsinnehåll. En minskning av både essentiella och icke-essentiella ämnen beskrev hos älgar av Frank *et al.* (1994)

Figur 8 visar kön på individerna med angiven sjukdomsklass. I alla klasser har hondjur drabbats i högre grad. Tolv av tretton individer i klass 1, sexton av sexton i klass 2, tre av tre i klass 3, en av en i klass 4 och sju av elva i klass 5 var hondjur som uppvisade sjukdom. Liknade resultat fick även Rehbinder *et al.* (2004) när han undersökte 25 individer som påvisat udda sjukligt beteende. Av dessa 25 var 21 hondjur och resterande 4 handjur (Rehbinder *et al.*, 2004). Resultatet av att äldre hondjur skulle vara de som oftast drabbas skulle kunna förklaras genom strukturen på den svenska älgstammen vid den tiden. Älgstammen bestod i hög grad av äldre hondjur då handjuren sköts vid jakt (Steen *et al.*, 1989, Rehbinder *et al.*, 2004, Broman *et al.*, 2002a). Vid beräkning av älgstammens fördelning, handjur kontra hondjur, så visade det sig att handjur drabbades i samma utsträckning som hondjur av MWS (Broman *et al.*, 2002a). Moose Wasting Syndrome drabbade även yngre älgar, dock inte i samma utsträckning som hos äldre.

## 5.3 Sjukdomsklass

Majoriteten (77%) av individerna (de flesta skjutna på normal jakt) med angiven sjukdomsklass använda i studien visade inga yttre som inre symptom på MWS. Endast 5% av individerna visade på allvarlig påverkan (sjukdomsklass 1) och 6% visade på relativt allvarlig påverkan (sjukdomsklass 2) (Tabell 4) (Figur 6).

Stark positiv korrelation (0,84) kunde ses mellan sjukdomsklass och insamlingsår (Figur 9). Detta beror med stor sannolikhet på att alla individerna med låg sjukdomsklass, alltså sjukdomsklass 1 och 2, är insamlade under 1980–2000-talet, vid själva utbrottet av MWS. Ingen variabel kunde påvisas korrelera med sjukdomsklass inom provperioden 2005–2018 (Figur 15). Svaga korrelationer kunde ses

inom provperioden 1980–1998, då mellan insamlingsår och sjukdomsklass samt ålder. Ett starkt samband kan även ses mellan alfaklyvning och sjukdomsklass, vilket tyder på att sjukare djur generellt har högre alfaklyvningsprocent än friska (Figur 13).

Friskare djur visar på en lägre inlagring av Cr (-0,31) i levern i jämförelse med sjuka djur (Figur 9). Krom är viktigt för kroppens omsättning av glukos och har en betydande roll i lipidsyntesen samt i protein- och nukleinsyrametabolismen. Hexavalent Cr kan i för hög mängd vara skadligt. Krom kan skada DNA och leda till sämre tillväxt samt ge lever- och njurskador (McDonald *et al.*, 2011). I Figur 4 kan en negativ korrelation ses mellan sjukdomsklass och LeMg (-0,41). Som i fallet med Cr betyder det att friska djur har en lägre mängd av Mg i levern än sjuka djur har. Mangan har stor betydelse för fett- och kolhydratmetabolismen samt är involverad i många cellulära reaktioner. Ett överskott av Mg kan leda till minskat foderintag och diarré. Dessa resultat motsäger teorin om att sjukdomen skulle bero på brist av mineraler och spårämnen (Rehbinder *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 1994)

## 5.4 Alfaklyvning

En negativ korrelation kan ses mellan alfaklyvning och insamlingsår (-0,88) (Figur 12). Då det finns ett starkt samband mellan alfaklyvning och insamlingsår tyder resultaten på en högre sjukdomsfrekvens under 1980–2000-talet. Då ett negativt samband kunde ses mellan alfaklyvning och genotyp genomfördes en analys på genotypfrekvensen inom alfaklyvningsprocenten 50–60% och 90–100% (Figur 11). Analysen visade inte någon större skillnad för genotypfrekvensen under alla år som undersökningen gjordes (Figur 2). I Figur 11 kan en liten höjning av genotypfrekvenserna AC (36–38%) och CC (12–14%) ses i förhållande till Figur 2 (AC är 20–34%, CC är 0–6%) men däremot ingen större skillnad mellan de två alfaklyvningstopparna.

Äldre djur har en högre alfaklyvningsprocent än yngre djur (0,55) och som tidigare nämnts drabbades de oftare av MWS än vad yngre individer gjorde. Resultatet tyder på att alfaklyvningen har ett samband med sjukdomen. En högre inlagring av Co i levern (0,59) (Figur 12) kan också ses hos äldre älgar. Vilket kan tyda på att Co är närvarande vid alfaklyvning. Anledningen till vad som orsakar alfaklyvning är osäker (Altmeppen *et al.*, 2012) men då alfaklyvningen kan betraktas som en skyddsmekanism mot prionutbredning (Lewis *et al.*, 2009) skulle det negativa sambandet mellan alfaklyvning och sjukdomsklass (-0,7) (Figur 13) kunna tyda på en ökning av alfaklyvningen vid MWS. Det vill säga ju högre alfaklyvning desto lägre sjukdomsklassning (klass 1–2), alltså sjukare djur.

## 5.5 Mineraller och spårämnen

Frank *et al.*, (1994) tidigare studier tydde på att orsaken till MWS skulle kunna vara brist på spårämnen () eller rubbningar i foderkvalitet och kvantitet på foder (Reh-binder *et al.*, 2004). Resultaten i den här studien tyder inte på att MWS har med brist på mineraler i form av Cu, Cr och Mg i levern att göra, då dessa visar på svagt negativt samband till sjukdomsklass. Mellan sjukdomsklass, Fe samt Mn kunde inget samband ses.

Med ökad ålder ökade även kemvärdena LeMg, LeCd och LeMo. Kadmium är en tungmetall som ackumuleras i främst njurarna där den kan orsaka skada. Det tar lång tid innan Cd lämnar kroppen (NRC, 2001) och detta kan vara en anledning till anrikning hos äldre djur. Molybden är en metall som kan begränsa upptaget av Cu. Detta kan leda till sekundär Cu-brist (McDonald *et al.*, 2011), i den här studien kan inget samband ses som tyder på att sjukdomen har orsakas av Cu-brist. Ett svagt positivt samband ses mellan LeCu och alfaklyvning, även andra ämnen som LeCd, LeMo, LeMg, LePb och framför allt LeCo visar på större samband (figur 3).

## 5.6 Koppling lantbruk

Jakt och speciellt älgjakten är en stark tradition i Sverige där i storleksordningen 100 000 älgar skjuts varje år (Olsson., 2015). Det konsumeras runt 3 kg viltkött (inklusive ben och inälvor) per person och år (Cederlund., 2017). Då MWS-symptom likande prionsjukdomen CWD genomfördes en studie som visade att MWS hade en koppling med PrP K109Q (Wik *et al.*, 2012). Prionsjukdomar drabbar både människor (CJD) och andra djur som nötkreatur (BSE) och får (Scrapie) (Wik, 2012). Mera kunskap behövs om prionsjukdomar, även avseende älg, som skulle stärka kunskapen om TSE-sjukdomar, samt för att förbygga eller behandla dem. Det är även viktigt att undersöka om prionsjukdomar är smittsamma, både inom samma art men även mellan arter för att förbygga smittspridning till våra lantbruksdjur.

## 6 Slutsats

Någon tydlig orsak till MWS kunde inte fastställas i den här studien. Individer med hög sjukdomsgrad (sjukdomsklass 1–2) visar på en generellt hög alfaklyvningsprocent (90–100%) jämfört med de mindre sjuka. Ingen koppling mellan svåra symptom på MWS och brist på mineraler eller spårämnen kunde ses, snarare tvärt om. Ett samband kan ses mellan genotyp och alfaklyvning, men inte att en viss genotyp är mer drabbad av MWS än andra kunde upptäckas. Så som tidigare studier visat, visar sambandet mellan sjukdomsklass och ålder i den här studien på att främst äldre individer drabbas av MWS.

För vidare forskning behövs mer genomarbetad eller mer komplett sjukdomsdata från MWS-sjuka älgar och övriga data från friska älgar. Multivariatanalyser skulle behöva genomföras för att undersöka om flera variabler i samband påverkar till exempel sjukdomsklass och alfaklyvningsprocent.

## Referenslista

- Adrian, F., Vera, G. & Lars, R.P. (1994). Secondary Copper Deficiency, Chromium Deficiency and Trace Element Imbalance in the Moose (*Alces alces* L.): Effect of Anthropogenic Activity. *Ambio*, 23(4/5), ss. 315-317.
- Altmeppen, H.C., Puig, B., Dohler, F., Thurm, D.K., Falker, C., Krasemann, S. & Glatzel, M. (2012). Proteolytic processing of the prion protein in health and disease. *American journal of neurodegenerative disease*, 1(1), ss. 15-31.
- Bergström, R. & Hjeljord, O.J.S.W.R. (1987). Moose and vegetation interactions in northwestern Europe and Poland.
- Blood, D. & Radostits, O.J.V.m. (1989). Diseases caused by deficiencies of mineral nutrients, ss. 1153-1216.
- Broman, E., Wallin, K., Steen, M. & Cederlund, G. (2002). A Wasting Syndrome in Swedish Moose (*Alces alces*): Background and Current Hypotheses. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(5), ss. 409-416.
- Cederlund, G. (1994). "Älgsjukan" - en immunbristsjukdom hos älg. *Kunskapsläget och forskningsbehov*. Solna: Statens Naturvårdsverk.
- Cederlund, Maja. (2017). *Svensk konsumtion av köttprodukter per person*. Naturvårdsverket. Tillgänglig: <https://www.naturvardsverket.se/Sa-mar-miljon/Statistik-A-O/Klimat-konsumtion-av-kottprodukter-per-person/> [2018-11-20]
- Chen, S.G., Teplow, D.B., Parchi, P., Teller, J.K., Gambetti, P. & Autilio-Gambetti, L.J.J.o.B.C. (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases, 270(32), ss. 19173-19180.
- Constable, P., Hinchcliff, K., Done, S. & Grünberg, W.J.V.M.E. (2017). Systemic and multi-organ diseases, ss. 2002-2214.
- Faber, W.E. & Pehrson, A.J.A. (2000). Foraging on Norway spruce and its potential association with a wasting syndrome in moose in Sweden, ss. 17-35.
- Feinstein, R., Reh binder, C., Rivera, E., Nikkilä, T. & Steen, M.J.A.V.S. (1987). Intracytoplasmic inclusion bodies associated with vesicular, ulcerative and necrotizing lesions of the digestive mucosa of a roe deer (*Capreolus* L.) and a moose (*Alces Alces* L.) [bovine viral diarrhea].
- Frank, A., Galgan, V. & Petersson, L.R.J.A. (1994). Secondary copper deficiency, chromium deficiency and trace element imbalance in the moose (*Alces alces* L.): effect of anthropogenic activity.
- Frank, A.J.B.t.e.r. (2004). A review of the "mysterious" wasting disease in Swedish moose (*Alces alces* L.) related to molybdenosis and disturbances in copper metabolism, 102(1-3), ss. 143-159.
- French, C., McEwen, L., Magruder, N., Ingram, R. & Swift, R.J.T.J.o.W.M. (1956). Nutrient requirements for growth and antler development in the white-tailed deer, 20(3), ss. 221-232.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Carroll, S.B. & Doebley, J. (2012). *Introduction to genetic analysis*. International 10. ed. uppl. New York: W. H. Freeman.

- Johnson, C., Johnson, J., Vanderloo, J.P., Keane, D., Aiken, J.M. & McKenzie, D. (2006). Prion protein polymorphisms in white-tailed deer influence susceptibility to chronic wasting disease. *Journal of General Virology*, 87(7), ss. 2109-2114.
- Kallunki Nyström, J (2018). *An investigation of moose calves from females with Moose Wasting Syndrome (Alces alces L.)*. Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinary Medicine Programme. Examensarbete 2019
- Kupfer, L., Hinrichs, W. & Groschup, M.H. (2009). Prion Protein Misfolding. *Current Molecular Medicine*, 9(7), ss. 826-835.
- Lewis, V., Hill, A.F., Haigh, C.L., Klug, G.M., Masters, C.L., Lawson, V.A., Collins, S.J.J.J.o.N. & Neurology, E. (2009). Increased proportions of C1 truncated prion protein protect against cellular M1000 prion infection. 68(10), ss. 1125-1135.
- Linsenmeier, L., Altmeyen, H.C., Wetzel, S., Mohammadi, B., Saftig, P. & Glatzel, M. (2017). Diverse functions of the prion protein – Does proteolytic processing hold the key? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(11, Part B), ss. 2128-2137.
- Mangé, A., Béranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y. & Lehmann, S. (2004). Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biology of the Cell*, 96(2), ss. 125-132.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A. & Wilkinson, R.G. (2011). *Animal Nutrition* 7th uppl.
- Merza, M., Larsson, E., Steen, M. & Morein, B. (1994). Association of a Retrovirus with a Wasting Condition in the Swedish Moose. *Virology*, 202(2), ss. 956-961.
- Miller, W. Cadmium absorption, tissue and product distribution, toxicity effects and influence on metabolism of certain essential elements. I: *Handlingar från Proc. GA Nutr. Conf*1971.
- Millhauser, G.L. (2014). PrP overdrive AU - McDonald, Alex J. *Prion*, 8(2), ss. 183-191.
- Neathery, M.W. & Miller, W.J. (1975). Metabolism and Toxicity of Cadmium, Mercury, and Lead in Animals: A Review1. *Journal of Dairy Science*, 58(12), ss. 1767-1781
- NRC (1972). *Lead; Airborne Lead in Perspective*: National Academy Press.
- NRC (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle: 2001*: National Academies Press.
- O'Dell, B.L. & Sunde, R.A. (1997). *Handbook of nutritionally essential mineral elements*: CRC Press.
- Olsson, Marcus. (2015). *Population*. Svenska jägarförbundet. Tillgänglig: <https://jagareforbundet.se/vilt/vilt-vetande2/artpresentation/daggdjur/alg/alg-population/> [2018-11-06]
- Paterson, J. & MacPherson, A.J.B.V.J. (1990). The influence of a low cobalt intake on the neutrophil function and severity of Ostertagia infection in cattle, 146(6), ss. 519-530.
- Powell, G., Miller, W., Morton, J. & Clifton, C.J.T.J.o.n. (1964). Influence of dietary cadmium level and supplemental zinc on cadmium toxicity in the bovine, 84(3), ss. 205-214.
- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Groth, D.F. & Glenner, G.G.J.C. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods, 35(2), ss. 349-358.
- Prusiner, S.B.J.S. (1991). Molecular biology of prion diseases, 252(5012), ss. 1515-1522.
- Rehbinder, C., Cedersmyg, M., Frölich, K., Söderström, L.J.M.e.i.h. & disease (2004). Wasting syndrome in swedish moose (Alces alces L.)—Results from field necropsies, 16(1), ss. 35-43.
- Rehbinder, C., Gimeno, E., Belak, K., Belák, S., Stéen, M., Rivera, E. & Nikkilä, T.J.T.V.R. (1991). A bovine viral diarrhoea/mucosal disease-like syndrome in moose (Alces alces): investigations on the central nervous system, 129(25-26), ss. 552-554.
- Roucou, X., Gains, M. & LeBlanc, A.C.J.J.o.n.r. (2004). Neuroprotective functions of prion protein, 75(2), ss. 153-161.
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M.A., Ball, H.L., Bradon, N., Bosque, P.J., Crossin, K.L., Edelman, G.M., DeArmond, S.J. & Cohen, F.E.J.J.o.m.b. (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein, 314(5), ss. 1209-1225.
- Siegmund, O.H. (1973). *The Merck veterinary manual: a handbook of diagnosis and therapy for the veterinarian*.
- Sigurdson, C., J. (2008). A prion disease of cervids: Chronic wasting disease. *Vet. Res.*, 39(4), s. 41.



- Simonsson, M., Merza, M. & Stéen, M. (1999). Virologi inom projektet "Älvsborgssjukan". Slutrapport 1999: Infektionssjukdom hos älg, Naturvårdsverket. Utvärdering av virus som eventuell orsak till Älvsborgssjukan med särskild inriktning på studier av ett möjligt retrovirus associerat med Älvsborgssjukan. Stockholm: Naturvårdsverket
- Staaland, H. & Sæbø, S.J.R. (1993). Forage diversity and nutrition supply of reindeer, 13(3), ss. 169-177.
- Stéen, M., Diaz, R. & Faber, W.E. (1993). An erosive/ulcerative alimentary disease of undetermined etiology in Swedish moose (*Alces alces* L.). *Rangifer*, 13(3), ss. 149-156.
- Underwood, E.J. (1999). *The mineral nutrition of livestock*: Cabi.
- Westaway, D., Goodman, P.A., Mirenda, C.A., McKinley, M.P., Carlson, G.A. & Prusiner, S.B. (1987). Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell*, 51(4), ss. 651-662.
- Wik, L. (2012). *Characterization of the prion protein in relation to normal cellular function and in disease* (2012): Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Wik, L., Mikko, S., Klingeborn, M., Stéen, M., Simonsson, M. & Linné, T. (2012). Polymorphisms and variants in the prion protein sequence of European moose (*Alces alces*), reindeer (*Rangifer tarandus*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and fallow deer (*Dama dama*) in Scandinavia. *Prion*, 6(3), ss. 256-260.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M. & Woolverton, C.J. (2009). *Prescott's principles of microbiology*: McGraw-Hill.
- Williams, E.S. & Young, S. (1980). CHRONIC WASTING DISEASE OF CAPTIVE MULE DEER: A SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY. *Journal of Wildlife Diseases*, 16(1), ss. 89-98.
- Vincent, B., Paitel, E., Frobert, Y., Lehmann, S., Grassi, J. & Checler, F.J.J.o.B.C. (2000). Phorbol esters-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons.