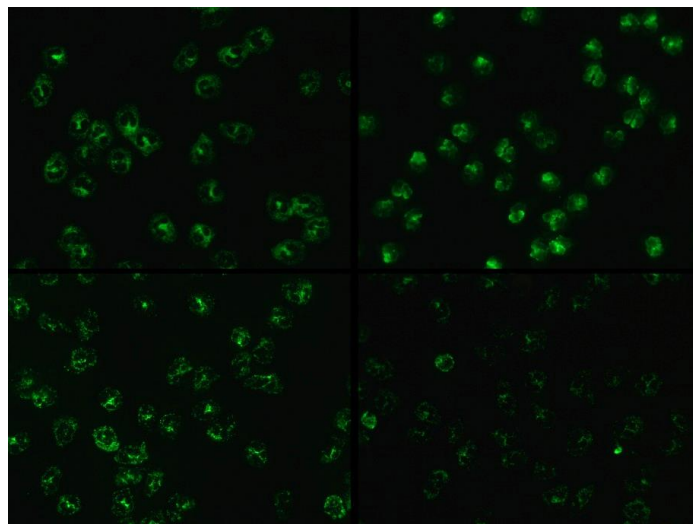


Anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar (ANCA) hos hund

En ny diagnostisk markör för sjukdomar som förlöper med
vaskulit?

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in dogs

A new diagnostic marker for diseases progressing with vasculitis?



Josefin Damm

Uppsala

2020

Anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar (ANCA) hos hund

En ny diagnostisk markör för sjukdomar som förlöper med vaskulit?

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in dogs

A new diagnostic marker for diseases progressing with vasculitis?

Josefin Damm

Handledare: Helene Hansson-Hamlin, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Ingrid Ljungvall, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Kursansvarig institution: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2020

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

Omslagsillustration: Fotografi taget av Simon Caulton,,
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ANCA_ETHANOL_AND_FORMALIN.JPEG

Nyckelord: Anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar, ANCA, C-ANCA, P-ANCA, hund, nova scotia duck tolling retriever, tollarsjuka, Steroid-responsiv meningit-arterit, SRMA, immune-mediated rheumatic disease, IMRD, MPO, PR3

Key words: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA, C-ANCA, P-ANCA, dog, Nova Scotia duck tolling retriever, Steroid-responsive meningitis-arteritis, SRMA, Immune-mediated rheumatic disease, IMRD, MPO, PR3

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar (ANCA) är en specifik typ av autoantikroppar som riktar sig mot innehållet i cytoplasmatiska granula hos neutrofila granulocyter. På humansidan är de i hög grad associerade med sjukdomar som förlöper med vaskulit. Få studier har dock gjorts om dess relevans inom veterinärmedicin. Målet med studien var att utvärdera förekomsten av ANCA hos hundar med steroid-responsiv meningit-arterit (SRMA) samt immune-mediated rheumatic disease (IMRD) för att undersöka om dessa kan användas som en ny diagnostisk markör för sjukdomar som förlöper med vaskulit. Serum samlades in från 17 hundar med SRMA och 6 hundar med IMRD och analyserades via indirekt immunofluorescens samt enzyme-linked immunosorbent assay. Via indirekt immunofluorescens analyserades varje prov med två olika fixeringar: etanolfixerade granulocyter samt formalinfixerade granulocyter. Det gjordes för att enklare kunna skilja mellan ANCA och antinukleära antikroppar (ANA).

Majoriteten av alla prover (28 av 30) var åtminstone svagt positiva för antingen c-ANCA eller p-ANCA vid etanolfixering. En cutoff på 1:100 valdes för etanolfixering, samt 1:10 för formalinfixering.

Av hundarna med SRMA var 2 positiva för c-ANCA vid formalinfixering. Av hundarna med IMRD var 4 positiva för p-ANCA vid etanolfixering samt 3 positiva för c-ANCA vid formalinfixering. Endast en av dessa hundar, tillhörande gruppen med IMRD, var positiv både vid formalin och etanolfixering. Samtliga ANCA-positiva prover var negativa för både MPO och/eller PR3 med ELISA.

Tre av fyra p-ANCA-positiva hundar var positiva även för ANA. Från studier av ANCA hos människor har det visat sig att det kan vara svårt att skilja ANA från p-ANCA.

Mycket är fortfarande oklart angående ANCA hos hund. Eventuell interferens av ANA vid immunofluorescens-teknik vid samtidig närvaro av p-ANCA gör att vidare studier krävs för att fastställa relevansen och de diagnostiska möjligheterna för ANCA hos hundar.

SUMMARY

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) is a specific type of autoantibody directed towards the contents of cytoplasmic granules in neutrophil granulocytes. In humans the antibodies are highly associated with diseases progressing with vasculitis. Few studies have been carried out on the relevance of ANCA in veterinary medicine. The aim of the study was to evaluate the presence of ANCA in dogs with steroid-responsive meningitis-arteritis (SRMA) and immune-mediated rheumatic disease (IMRD) to evaluate whether ANCA can be used as a new diagnostic marker in dogs in diseases progressing with small vessel vasculitis. Serum was collected from 17 dogs with SRMA and 6 with IMRD and analyzed through indirect immunofluorescence as well as enzyme-linked immunosorbent assay.

The majority of all samples (28 out of 30) were at the very least slightly positive for either c-ANCA or p-ANCA on ethanolfixation. A cutoff of 1:100 was chosen for ethanolfixation and 1:10 for formalinefixation.

Out of the dogs suffering from SRMA, 2 were positive for c-ANCA with formalinefixation. Out of the dogs suffering from IMRD, 4 were positive for p-ANCA with ethanolfixation and 3 were positive with formalinefixation. Only one of these dogs, belonging to the IMRD-group, was positive both with formaline and ethanolfixation. All the ANCA-positive dogs were negative for PR3 as well as MPO through ELISA.

Three out of four p-ANCA-positive dogs were also positive to ANA. Studies on ANCA in humans have shown that it can be difficult to distinguish ANA from p-ANCA.

Much is still unknown concerning ANCA in dogs. Possible interference of ANA during immunofluorescence-analysis of p-ANCA leads to more research needing to be done in order to determine the relevance and diagnostic possibilities of ANCA in dogs.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
ANCA på humansidan.....	2
Vad är ANCA?	2
Klassificering av ANCA	3
Hur ANCA binder in	3
Uttryck av antikroppar.....	4
Stimulering av cytokiner till ökat uttryck av antikroppar	4
Påverkan på endotelceller.....	4
Är ANCA patogena i sig själva?	5
Tollarsjuka hos nova scotia duck tolling retrievers	5
Steroid-responsiv meningit-arterit.....	5
Immune-mediated rheumatic disease	7
Närvaro av ANCA vid övriga sjukdomar hos hund	8
Prevalens av ANCA hos friska hundar.....	9
Att använda humana granulocyter för ANCA hos hund	9
MATERIAL OCH METODER.....	9
Blodprovsanalyser	10
Analys av resultat	10
RESULTAT	11
Resultat IIF på etanolfixerade granulocyter	11
Resultat IIF på formalinfixerade granulocyter	11
Resultat ELISA för MPO och PR3.....	11
DISKUSSION	12
Anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar vs antinukleära antikroppar	12
PR3 samt MPO.....	13
ANCA: ökad prevalens hos vissa raser?	14
Begränsningar i studien	14
KONKLUSION.....	15
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING	16
Resultat.....	17

Diskussion	17
Konklusion	17
REFERENSER.....	19

FÖRKORTNINGAR

ANCA= anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar

ANA: antinukleära antikroppar

CSF: cerebrospinalvätska

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

IBD: inflammatory bowel disease

IIF: indirekt immunofluorescens

IMRD: immune-mediated rheumatic disease

MPO: myeloperoxidas

PR3: proteinase 3

SRMA: steroid-responsiv meningit-arterit

INLEDNING

Hos människa är förekomst av anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar (ANCA) associerat med sjukdomar såsom granulomatös polyangit (f.d. Wegeners granulomatos), mikroskopisk polyangiit, Churg-Strauss syndrom med flera. Sjukdomarna förlöper med inflammation i mindre blodkärl, framför allt arterioler och/eller kapillärer. Etiologi och verkningsmekanism för sjukdomarna är idag ej klarlagt, men en tydlig koppling till ANCA har setts i samtliga sjukdomar. Idag används titer-nivåerna av ANCA bland annat för att underlätta diagnos, utvärdering av behandlingssvar samt kliniska återfall av sjukdomarna (Churg & Strauss, 1951; Hoffman *et al.*, 1992: se Tarabishy *et al.*, 2010; Guillevin *et al.*, 1999).

Anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar är autoantikroppar riktade mot innehåll i cytoplasmatiska granula hos neutrofiler och monocyter (Bosch *et al.*, 2006; Savige *et al.*, 2005) och känner igen antigen såsom proteinas 3 (PR3) (Lüdemann *et al.*, 1990) och myeloperoxidase (MPO) (Cohen Tervaert *et al.*, 1990). Både PR3 samt MPO återfinns i azurofila granula hos neutrofiler och monocyter men uttrycks även i en viss mängd normalt på ytan av cellmembranet hos nämnda celler (Csernok *et al.*, 1990).

Då få studier har genomförts om ANCA:s relevans inom veterinärmedicin syftar arbetet till att undersöka relevansen av ANCA vid sjukdomarna Steroid-responsiv meningit-arterit (SRMA) och Immune-mediated rheumatic disease (IMRD), två immunmedierade reumatiska sjukdomar överrepresenterade hos nova scotia duck tolling retrievers, för att undersöka om dessa kan användas som en ny diagnostisk markör för sjukdomarna. För detta analyserades prover från hundar med konfirmerad SRMA eller IMRD (där bland annat tidigare analyser avseende antinukleära antikroppar utförts vid tidigare undersökningar) via indirekt immunofluorescens (IIF) samt enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) för att påvisa närvaron av ANCA. Resultaten sammanställdes sedan deskriptivt.

LITTERATURÖVERSIKT

ANCA på humansidan

På humansidan är anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar (ANCA) associerat med sjukdomar såsom granulomatös polyangit (f.d. Wegeners granulomatos), mikroskopisk polyangiit, Churg-Strauss syndrom med flera. Sjukdomarna förlöper med inflammation i mindre blodkärl, framför allt arterioler och/eller kapillärer.

Granulomatös polyangit (f.d. Wegeners granulomatos) är en systemisk inflammatorisk sjukdom som drabbar mindre till medelstora kärl. Sjukdomen är starkt associerad med ANCA, med förekomst av antikropparna i 80–90 % av de kliniska fallen. Framförallt ses ANCA med antigen mot proteinet proteinas 3 (PR3) (Niles *et al.*, 1989). Vanligtvis ses en påverkan på njuren, där det histopatologiskt kan ses nekros, bildande av granulom och vaskulit. Övre samt nedre luftvägarna är även vanligtvis påverkade med ulcerationer, blödning pulmonära lesioner eller atelektas för att nämna några förändringar. På grund av dess systemiska påverkan kan dock samtliga organsystem drabbas. Obehandlat kan sjukdomen ha en fatal utgång. Idag behandlas sjukdomen med glukokortikoider eller andra immunhämmande medel (Hoffman *et al.*, 1992: se Tarabishy *et al.*, 2010).

Mikroskopisk polyangiit är en idiopatisk autoimmun sjukdom med okänd etiologi. Sjukdomen, precis som granulomatös polyangit, ger en systemisk nekrotiserande vaskulit som är starkt associerad med ANCA, framför allt av typen p-ANCA med antikroppar mot myeloperoxidase (MPO). Sjukdomen är multisystemisk där det är vanligast med njurpåverkan men även kliniska tecken manifesterande från huden, lungor, hjärta och leder (Guillevin *et al.*, 1999).

Churg-Strauss syndrom är även det en sjukdom med vaskulit, men förutom kliniska tecken i varierande organsystem till följd av inflammationen, är sjukdomen framför allt även associerad med kraftig astma och en eosinofili i både blodet, kärlväggen samt extravaskulärt (framför allt då i bindväv) (Churg & Strauss, 1951).

Vad är ANCA?

Anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar (ANCA) är autoantikroppar primärt riktade mot innehållet i cytoplasmatiska granula hos neutrofiler och monocyter. På humansidan kan autoantikropparna påvisas, där de även används som diagnostisk markör, för flertalet sjukdomar som alla är associerade med vaskulit i mindre blodkärl såsom arterioler och kapillärer (Bosch *et al.*, 2006; Savige *et al.*, 2005). ANCA tros även spela en roll i den inflammatoriska processen i de sjukdomarna där antikropparna kan påvisas. Ett av de starkaste bevisen för detta kan ses i fallet där ett neonatalt barn erhöll en transplacental överföring av moderns ANCA och utvecklade pulmonär blödning samt tecken på aktiv njursjukdom med ökad BUN (blod-urea-nitrogen) samt ökat serum-kreatinin (Schlieben *et al.*, 2005).

Antigen som känns igen av ANCA inkluderar bland annat: proteinas 3 (PR3), tillhörande gruppen trypsinlika serinproteaser (Lüdemann *et al.*, 1990), samt myeloperoxidase (MPO), ett lysosomalt protein och peroxidase (Cohen Tervaert *et al.*, 1990). Både PR3 samt MPO återfinns i azurofila granula hos neutrofiler men även monocyter. De uttrycks även i en viss mängd normalt på ytan av cellmembranet hos nämnda celler (Csernok *et al.*, 1990).

Klassificering av ANCA

ANCA klassificeras utefter det mönster neutrofilen uppvisar vid indirekt immunofluorescens (IIF), då antikropparna binder till strukturer i cytoplasman, samt efter det antigen de binder till. I dagsläget delas ANCA in i fyra olika grupper, av varierande klinisk betydelse (Savige *et al.*, 1999):

- C-ANCA (klassisk): granulär cytoplasmatisk fluorescens med central eller interlobulär accentuering
- C-ANCA (atypisk): diffus platt cytoplasmatisk fluorescens utan interlobulär accentuering
- P-ANCA: perinukleär fluorescens, med eller utan nukleär utsträckning
- Atypical ANCA: inkluderar alla andra monocyt- eller neutrofilspecifika reaktioner vid IIF

De flesta patienter är positiva för enbart en ANCA-serotyp (Tervaert *et al.*, 2010). Klassisk c-ANCA har framför allt specificitet för PR3 (Niles *et al.*, 1989), medan p-ANCA känner igen MPO (Cohen Tervaert *et al.*, 1990).

I dagsläget är det endast c-ANCA (klassisk) samt p-ANCA som anses kliniskt relevanta. ANCA ej specifika för PR3 eller MPO ses ofta med låga eller varierande nivåer av antikroppar samt saknar tydlig korrelation med klinisk sjukdom. De atypiska formerna kan i vissa fall ses hos patienter med sjukdomar som involverar vaskulit samt även systemisk lupus erythematosus, inflammatory bowel disease, Crohn's sjukdom eller iatrogen vaskulit för att nämna några (Savige *et al.*, 1999).

Både PR3 och MPO återfinns som tidigare nämnts i azurofila granula i cytoplasman hos neutrofila granulocyter. Skillnaden i mönster de ger vid IIF beror på en relokalisering av MPO vid etanolfixering. Därav rekommenderas vid test för närvaro av ANCA att både formalin- och etanolfixering används, då p-ANCA vid formalin skenbart liknar c-ANCA (Kallenberg *et al.*, 1992, Merkel *et al.*, 1997: se Damoiseaux *et al.*, 2009).

Anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar är ej heller helt specifika för enbart de ANCA-associerade vaskuliterna, utan de återfinns även vid andra inflammatoriska sjukdomar. Dock har de då ej specificitet för varken PR3 och/eller MPO (Kallenberg *et al.*, 1992, Merkel *et al.*, 1997: se Damoiseaux *et al.*, 2009).

Indirekt immunfluorescens rekommenderas därför i kombination med enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), en metod för att detektera och kvantifiera en eller flera antigen eller antikroppar, som diagnostik för ANCA-associerad vaskulit (Savige *et al.*, 1999). Indirekt immunfluorescens i kombination med ELISA har även visat ha hög specificitet (99,5 %) för ANCA-associerad vaskulit i en större studie av Merkel *et al.* (1997): se Damoiseaux *et al.* (2009) med över 400 patienter.

Hur ANCA binder in

Bindning av ANCA till neutrofiler sker via Fc-gammareceptorerna IIa och IIIb som via sin egen Fc del orsakar en neutrofil aktivering med påföljande frisättning av enzymer från granula samt

cytokiner. Dessa orsakar sedan endotelskada samt rekryterar fler inflammatoriska celler via cytokiner. Till antikroppen binder de via F(ab')₂ och Fc delen (Day *et al.*, 2003).

Patienter positiva för c-ANCA känner igen samma eller nära relaterade epitoper på PR3. I en studie av Griffith *et al.* (2001) hittades fem linjära epitoper varav fyra av dessa var associerade med enzymets aktiva centrum. Samtliga epitoper återfanns även på enzymets yta, där antikroppen har möjlighet att binda in. På grund av epitopernas närhet till varandra postulerades även möjligheten till att epitoperna ej enbart fungerar genom att binda in ANCA enskilt utan även att de gemensamt bildar en conformational epitop utefter hur proteinet veckas som tredimensionell struktur.

Uttryck av antikroppar

Andelen inaktiva neutrofiler som uttrycker PR3-antikroppar varierar mellan individer, från 0 till 90 %. Antalet inaktiva PR3-positiva neutrofiler verkar dock vara stabilt hos varje enskild individ. Det verkar även existera två distinkta populationer av PR3-positiva neutrofiler. En som uttrycker en hög mängd PR3 på cellytan och en som uttrycker en avsevärt mindre mängd. (Halbwachs-Mecarelli *et al.*, 1995). Mängden PR3 som återfinns intracellulärt verkar någorlunda konstant, då det ej såg någon variation mellan de individer som uttrycker olika mängd PR3 på cellytan. Ej heller sågs en skillnad mellan enskilda celler hos samma individ. Däremot så skiljer sig antalet PR3 som uttrycks på cellytan mellan individer, där det verkar finnas en genetisk variation för just hur många som uttrycks (Schreiber *et al.*, 2003).

Mängden PR3 eller MPO som återfinns på cellytan har visat sig ha betydelse för magnituden av ANCA-inducerad neutrofilaktivering, där en högre mängd ger en signifikant högre frisättning av granula och superoxider jämfört med de som har en mindre mängd PR3 eller MPO på ytan (Schreiber *et al.*, 2004). Mängden PR3 eller MPO som återfinns på ytan av celler verkar därmed påverka risken för att utveckla ANCA-associerad vaskulit.

Stimulering av cytokiner till ökat uttryck av antikroppar

Tumor necrosis factor alfa (TNF- α) är en cytokin som i normala fall bland annat har till uppgift att främja vasodilatation, uttryck av adhesionsproteiner och kemotaktiska molekyler samt prokoagulativ aktivitet och trombos. TNF- α har även visat sig stimulera neutrofiler till att uppreglera mängden PR3 samt MPO som finns på cellytan, vilket gav en kraftigare frisättning av neutrofila granula och även en ökad frisättning av reaktiva syreföreningar (Falk *et al.*, 1990, Csernok *et al.*, 1994). Det sker genom att granula partiellt fuserar med cellmembranet samt med påföljande exocytos av granula, ökat antal PR3 som uttrycks i intracellulära vakuoler och translokation av PR3 till cellytan (Csernok *et al.*, 1994).

Påverkan på endotelceller

ANCA verkar även kunna aktivera endotelceller och öka deras uttryck av E-selektin (Kobold *et al.*, 1999). E-selektin är en adhesionsmolekyl som uttrycks på endotelceller och är viktiga för neutrofilens migrering från blodbanan ut i inflammerad vävnad. E-selektin uttrycks först efter att endotelceller aktiverats av IL-1, IL-23 eller TNF- α , och ger en starkare bindning än de tidigare adhesionsmolekylerna, och först efter att neutrofilen kommit till ett stopp i blodbanan.

Enligt en studie av Taekema-Roelvink *et al.* (1998) sågs ANCA modulera endotelceller till antingen ökad eller minskad PR-3-orsakad apoptos *in vitro*.

Är ANCA patogena i sig själva?

ANCA har länge misstänkts ha en roll i själva patogenesen av de ANCA-associerade vaskuliterna, mer än att enbart vara en markör. Studier på knock-out möss (med en avsaknad av B- och T-celler med antigenreceptorer) har bland annat visat att vid immunisering med MPO-immuniserade splenocyter steg MPO-ANCA dosberoende. De med en högre dos utvecklade en systemisk vaskulit med glomerulonefrit (som ej var medierad av immunkomplex) samt inflammation i lungkapillärer. I studien av Xiao *et al.* (2002) administrerades immuniserade splenocyter till RAG2 knock-out möss (homozygota möss med inaktiverad RAG2-gen). RAG2-knockout mössen är oförmögna att generera mogna B- och T-celler. De som erhöll immuniserade splenocyter utvecklade glomerulonefrit utan immunkomplex (Xiao *et al.*, 2002).

Tollarsjuka hos nova scotia duck tolling retrievers

Begreppet tollarsjuka innefattar två immunmedierade sjukdomar, immune-mediated rheumatic disease (IMRD) samt steroid responsiv meningit-arterit (SRMA). Sjukdomarna kan var för sig drabba ett flertal raser, men prevalensen misstänks vara högre för båda sjukdomarna just hos rasen nova scotia duck tolling retriever (Afinsen *et al.*, 2008; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009; Bremer *et al.*, 2015). De kliniska förändringarna är olika för de två sjukdomarna och kan variera både mellan och inom rasen (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013).

Få studier har genomförts rörande ANCA och dess diagnostiska värde inom veterinärmedicin, och till vår kännedom inga vad gäller prevalens av ANCA vid just SRMA och IMRD hos nova scotia duck tolling retrievers.

Steroid-responsiv meningit-arterit

Steroid-responsiv meningit-arterit (SRMA) är en sjukdom karakteriserad av en steril inflammation i meningerna och blodkärlen i meningerna längs med hela ryggmärgen och hjärnstammen. Inflammationen kan dock även drabba andra kärl i kroppen och därav ge varierande kliniska tecken, vilket ofta gör sjukdomen svårare att diagnostisera. Etiologi är än idag ej fastställt.

Den kliniska bilden karakteriseras ofta av akut nacksmärta och stelhet, feber, anorexi och ett sänkt allmäntillstånd. Sjukdomsbilden innebär ofta ett intermittent förlopp, där hundarna tillfälligt mår bättre för att sedan insjukna igen. Även en kronisk form existerar där neurologiska sjukdomstecken såsom till exempel pares eller ataxi kan förekomma (Tipold 1995).

Hundar som ej får adekvat behandling kan också utveckla utökade neurologiska bortfall. Vanligast är dock att de i akut stadie presenteras med en normal neurologisk bild. Framför allt drabbas medelstora till storväxta hundraser bland annat nova scotia duck tolling retriever, boxer, beagle, korthårig vorsteh och berner sennenhund. Vanligtvis drabbas unga hundar under 2 år (vid ca 6–18 månader) (Tipold, 1995). Med tidig och korrekt behandling är prognosen god men risk för återfall finns (Tipold & Jaggy 1994; Cizinauskas *et al.*, 2000).

Inga av de kliniska fynden är helt specifika för just SRMA. Några diagnostiska tester som är helt specifika för sjukdomen existerar ej i dagsläget, vilket gör att ytterligare diagnostiska möjligheter bör eftersträvas. För att diagnosticera SRMA i dagsläget bör samtliga fynd, klinisk bild men även uteslutande av övriga differentialdiagnoser såsom till exempel trauma, neoplasmi eller meningit av infektiöst ursprung alla ingå och övervägas innan slutgiltig diagnos fastställs.

Diagnostiskt ses i serum ofta förhöjda nivåer av IgA, ökad snabbsänka: C-reaktivt protein (CRP), samt neutrofil leukocytos (19000-27000 leukocyter/ μ L) med eller utan vänsterförskjutning. Cerebrospinalprov i akutfasen visar ofta på kraftigt ökade celltal (>1000 celler/ μ L), vilka ofta utgörs av polymorfonukleära celler. Även måttligt till kraftigt ökat proteininnehåll, ökat antal leukocyter, höga nivåer av IgA och mogna neutrofiler kan ses i cerebrospinalvätskan vid SRMA (Tipold, 1995; Maiolini *et al.*, 2010). Den akuta formen uppvisar neutrofil pleocyotos medan vid den kroniska formen det oftare ses en mononukleär eller blandad cell pleocyotos där inflammationen även sträcker sig till närliggande strukturer och orsakar myelit eller encefalit. Det kan göra sjukdomen särskilt svår att skilja från meningoencefalomyeliter av annat ursprung, varpå uppmätande av IgA i både serum och CSF föreslogs (Tipold & Jaggy 1994). En ökad mängd av IgA i serum har dock visat sig vara mindre uttalat hos hundrasen nova scotia duck tolling retriever (Hansson-Hamlin, H., Sveriges lantbruksuniversitet, pers. medd., 2020).

Behandling för SRMA består av immunsuppressiva läkemedel, vanligtvis prednisolon. Inget exakt behandlingsprotokoll existerar dock i dagsläget. I en studie av Cizinauskas *et al.* (2000) sågs att majoriteten av hundarna med SRMA som fick långtidsbehandling med prednisolon (4–20 månader) var friska i upp till 29 månader efter utsatt behandling. I studien föreslogs ett behandlingsprotokoll baserat på en annan studie av Tipold & Jaggy (1994) med prednisolon eller prednisone 4 mg/kg per dag första två dagarna, sedan halverad dos i en till två veckor följt av 1 mg/kg/dag i en månad. Först då neurologisk undersökning och CSF-prov normaliserats halverades glukokortikoiddosen tills 0.5 mg/kg var annan dag uppnåddes. Utsättande av behandling gjordes ej förrän blodprov, CSF-prov och klinisk undersökning var normal vid två på varandra följande undersökningar.

I studien av Tipold & Jaggy (1994) sågs att, vid behandling med relativt låga doser prednisolon, eller vid avbrytande av behandling för tidigt, sågs ett mer utdraget sjukdomsförlopp med avslutningsvis inget behandlingssvar. Däremot sågs biverkningar vid höga doser prednisolon såsom vanligtvis polyuri, polydipsi, polyfagi och viktökning. Nämnade biverkningar sågs även i en studie av långtidsbehandling av SRMA (upp till 20 månader) men samtliga kliniska biverkningar återgick till det normala efter utsatt behandling (Cizinauskas *et al.*, 2000). Där sågs även mindre vanliga biverkningar såsom alopeci, kräkning och diarré, urinvägsinfektion och hepatomegali.

Tipold & Jaggy (1994) föreslog att prednisolondosen först bör sänkas när CSF normaliserats och blodvärdena ej längre indikerar en aktiv inflammation. I studien av Cizinauskas *et al.* (2000) normaliserades dock ej vare sig serum eller CSF IgA-nivåerna under behandlingen med prednisolon. De var även fortsatt lindrigt förhöjda efter utsatt behandling, något som gör att alternativa diagnostiska metoder kan vara av värde för att följa prognos och behandlingssvar.

Att ta ett cerebrospinalprov är en procedur som ej är helt riskfritt. Dels kräver det anestesi, något som i sig är förknippat med en viss risk eller i vissa fall är rent kontraindicerat för vissa individer. Om än ovanliga, är iatrogen trauma mot hjärnstammen, bråck, blödning och infektion några av riskerna av själva provtagning (Lorenz & Kornegay, 2004). Av den här anledningen hade det även varit fördelaktigt med en markör för diagnos, terapivar och/eller risk för återfall som kan monitoreras på ett mindre invasivt sätt.

Eftersom ANCA-positiva sjukdomar hos människa förlöper med blodkärlsinflammation, vilket också karaktäriserar SRMA hos hund, var hypotesen att hundar med SRMA också skulle kunna generera en ANCA-reaktion. Det skulle därmed kunna vara en möjlig kompletterande diagnostisk blodmarkör.

Immune-mediated rheumatic disease

Immune-mediated rheumatic disease (IMRD) även kallad reumatisk ledvärk är en autoimmun sjukdom där antinukleära antikroppar (ANA) kan påvisas hos majoriteten (23 av 32 hundar med sjukdomstecken i.e. 70 %) av de drabbade hundarna (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009). ANA återfinns även i systemiska autoimmuna sjukdomar såsom systemisk lupus erythematosus (SLE). IMRD anses tillhöra de SLE-relaterade sjukdomarna. Drabbade hundar är ofta 1–5 år gamla och kliniska tecken kommer antingen smygande eller akut insättande. Stelhet och håla som är värst efter vila och minskar vid aktivitet ses och smärta kan ofta palperas från multipla leder utan att någon svullnad föreligger. Orsaken är en non-erosiv polyartrit (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009). De vanligast drabbade lederna är karpal- armbågs- och/eller knäleder. I en studie av Hansson-Hamlin & Lilliehöök (2009) hade samtliga hundar smärta från fler än en led och 11 av 32 hundar hade ont i fler än 4 leder. Ytterligare hade 9 hundar även smärta vid palpation av musklerna. Ovanligare kliniska tecken kan också ses såsom varierande hudförändringar (bland annat krustor eller vitiligo), påverkan på inre organ och feber. Diagnos ställs baserat på kliniska förändringar samt IIF-ANA test som majoriteten av de sjuka hundarna är positiva för. Negativt resultat utesluter dock inte sjukdom (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009).

I studier av Bremer *et al.* (2015) som undersökte försäkringsdata från ett företag för 445 336 hundar, varav 2890 nova scotia duck tolling retrievers, hade 0,35 % en ”IMRD”-diagnos och 3,3 % en ”möjlig IMRD”-diagnos. Nova scotia duck tolling retrievers hade där en 18 gånger ökad risk att drabbas av IMRD jämfört med andra raser.

Hos nova scotia duck tolling retrievers var IMRD vanligare hos tikar medan det hos andra raser inte setts en könspre disposition (Bremer *et al.*, 2015). Inte heller tidigare studier på ämnet hos hundar visar på en könspre disposition vilket däremot har setts på humansidan där även kvinnor drabbas i högre grad än män vid många autoimmuna sjukdomar såsom bland annat systemisk lupus erythematosus (Whitacre *et al.* 1999).

Precis som vid SRMA behandlas de flesta hundar med glukokortikoider. De som behandlades fick en initial dos av 1-1,5 mg/kg/dag kortikosteroider där dosen successivt minskades under flera månader. 16 av 25 hundar som behandlades med låg dos (<0,5 mg/kg varannan dag) visade nästan fullständig remission av kliniska tecken och 6 av dessa kunde så småningom helt avsluta behandlingen. 3 av 25 hundar krävde en högre dos och 5 av 25 hundar avlivades då de inte

svarade tillräckligt bra på behandlingen. Resterande 8 hundar som behandlades enbart med icke-steroida antiinflammatoriska läkemedel (NSAID) visade enbart viss förbättring och 2 avlivades. Ingen association sågs mellan olika ANA-resultat och resultat av behandlingar (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009).

Hos människa beskrivs vaskulit vara en del av de inflammatoriska systemsjukdomarna, dit även IMRD kan anses höra. Då nova scotia duck tolling retriever förutom SRMA även är över-representerade för IMRD, och då båda sjukdomarna kan medföra vaskulit, skulle teoretiskt sett ANCA i båda fallen kunna vara ett möjligt diagnostiskt hjälpmedel.

Precis som för SRMA finns för IMRD varken något helt specifikt diagnostiskt test utan diagnos får ställas från en sammantagen bild av både kliniska fynd och diagnostiska tester, varför en ytterligare diagnostisk markör skulle vara av stort värde.

Närvaro av ANCA vid övriga sjukdomar hos hund

Få studier har i dagsläget genomförts rörande närvaron av ANCA samt dess diagnostiska värde hos hundar. I några fall har ANCA påvisats vid vektorburna infektiösa sjukdomar, immun-medierad hemolytisk anemi (Karagianni *et al.*, 2011) och hundar med inflammatory bowel disease (IBD) (Allenspach *et al.* 2004).

Wieland *et al.* (2012) tittade på förekomsten av p-ANCA hos kliniskt friska soft coated wheaten terriers, då rasen uppvisar hög risk för att drabbas av protein-losing enteropati samt protein-losing nefropati (Littman *et al.*, 2000). I en studie av Allenspach *et al.* (2008) föreslogs att p-ANCA skulle kunna vara en diagnostisk markör för sjukdomarna hos rasen. Enligt Wieland *et al.* (2012) sågs prevalensen av p-ANCA hos de kliniskt friska ligga så högt som 20,7 %. Intressant nog hade de kliniskt friska hundarna som var positiva för p-ANCA i högre grad kullsyskon eller syskon från olika kullar (dock samma föräldrar) som var positiva för protein-losing enteropati eller protein-losing nefropati. Inga större slutsatser drogs från associationen då någon ärftlighet ej kunde påvisas i just den studien. Dock har 188 fall av sjukdomarna hos den rasen i en tidigare studie av Littman *et al.* (2000) påvisat en gemensam manlig förfader.

ANCA ses även på humansidan vid inflammatory bowel disease (IBD). Då uppvisade antikropparna däremot ett IIF mönster skiljt från den som normalt uppvisas vid p-ANCA riktat mot MPO (Saxon *et al.*, 1990: se Savige *et al.*, 1999). ANCA har även påvisats vid IBD hos hundar i en studie av Mancho *et al.* (2010). Där var hundarna positiva för enbart p-ANCA, varav endast en av hundarna samtidigt var positiv för ANA. Även Luckschander *et al.* (2006) undersökte ANCA vid IBD hos hund men inget samband kunde ses mellan titernivåerna av ANCA och klinisk sjukdomsaktivitet av IBD. Ingen korrelation mellan titernivåerna och aktivitet har heller visats i flertalet studier på humansidan (Roosendal & Kallenberg 1999). Trots det bör den kliniska relevansen av ANCA ej helt avskrivas då potentiella diagnostiska möjligheter kan finnas i annat än enbart monitorering av sjukdomsaktivitet. ANCA:s roll vid andra sjukdomar än just de ANCA-associerade vaskuliterna kan möjligtvis åtminstone ge en viktig inblick i dess patofysiologi.

Prevalens av ANCA hos friska hundar

Låga nivåer av ANCA har även uppmätts hos friska hundar bland annat i en studie av Allenspach *et al.* (2004). Där låg prevalensen hos friska kontrollgruppen på ca 12 %. I jämförelse har prevalensen av ANCA hos friska hundar i kontrollgrupper i andra studier uppmätts till 5 % (Karagianni *et al.*, 2011) och 17 % (Mancho *et al.*, 2010).

Att använda humana granulocyter för ANCA hos hund

Eftersom studien utnyttjar humana granulocyter är en möjlighet att vissa antigen ej binder in och därmed ger ett falskt negativt värde och sänkt sensitivitet då en viss skillnad existerar i arvs massa mellan människor och hundar. I en studie av Florey *et al.* (2017) undersöktes just användandet av humana granulocyter som en metod för att ersätta den mer utdragna processen av att odla granulocyter från hundar. I studien kom de fram till en sensitivitet på 0.61 samt en specificitet på 1.00 och drog slutsatsen att ANCA assay designad för humanbruk kan brukas för analys av serum från hundar för att bedöma närvaro av ANCA. Avvikelse mellan de två metoderna sågs till cirka 20 %. Metoden har en sensitivitet som är något lägre än önskvärt men metoden är i hög grad specifik, något som bör beaktas vid användande av metoden.

Överensstämmelsen är så pass hög att rimliga slutsatser bör kunna dras trots användandet av humana granulocyter.

MATERIAL OCH METODER

Studierna var godkänd av djurförsöksetiska nämnden, Dnr: C15/16.

Litteratursökning gjordes i relevanta databaser såsom Pubmed och Google Scholar med sökord såsom: ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, proteinase 3, myeloperoxidase, ANCA-associated vasculitis, vasculitis, wegener's granulomatosis, Churg-Strauss syndrome, steroid-responsive meningitis-arteritis, immune-mediated rheumatic disease, nova scotia duck tolling retriever med flera.

Journaler från de sjuka hundarna som undersökts och behandlats på olika djursjukhus har studerats i mån av tillgång.

Blodprover från 17 hundar av rasen nova scotia duck tolling retriever med misstänkt eller konfirmerad steroid-responsiv meningit-arterit (SRMA) analyserades med avseende på ANCA och ANA. Hundarna var samtliga ej släkt sen två generationer tillbaka. Samtliga var ägda av privatpersoner och diagnostiserade med misstänkt SRMA från tidigast 2015 och framåt. De uppvisade kliniska tecken för meningit med kraftig smärta från nacke, feber, sänkt allmäntillstånd, anorexi och stelhet. Diagnosen ställdes av olika veterinärer på varierande kliniker i Sverige men i samråd med ansvarig person för "Tollarprojektet" på Sveriges lantbruksuniversitet. Hematologiska analyser genomfördes i samtliga fall med instrument på samma klinik som hunden i fråga undersöktes. 11 av hundarna var vid tidigare analys (i samband med Tollarprojektet) negativa för ANA (antinukleära antikroppar) vid provtagning. Övriga hundar i gruppen hade ej analyserats för närvaro av ANA vid något tidigare tillfälle än den här studien.

Sex serumprover från nova scotia duck tolling retrievers med misstänkt eller konfirmerad IMRD analyserades även avseende närvaro av ANCA och ANA. Hundarna som inkluderades i studien palperades och extremiteters leder, nacke och rygg manipulerades och bedömdes för muskuloskeletal tecken på systemisk reumatisk sjukdom såsom stelhet och smärta. De som uppvisade smärta och stelhet från minst två olika ledextremiteter inkluderades i studien. Hundarna skulle även ha uppvisat kliniska tecken under minst 14 dagar och det skulle även vara huvudanledningen till att djurägarna ska ha uppsökt Universitetsdjursjukhuset i Uppsala. Inga andra sjukdomar skulle heller ha misstänkts av veterinärer som huvudorsak till uppvisade kliniska tecken. 4 av dessa hundar hade varit ANA-positiva vid tidigare analys (i samband med Tollarprojektet). En hund var negativ för ANA vid tidigare analys. Övriga hundar hade ej analyserats för ANA vid tidigare tillfälle än den här studien. Hundarna uppsökte djursjukhus och blodprov togs från år 2016 och framåt.

Sju prover från kliniskt friska hundar, av varierande ras, användes som kontrollgrupp. Hundarna i den friska kontrollgruppen genomgick en klinisk undersökning inför blodprovstagning och anamnestiska frågor ställdes till djurägaren för att säkerställa att djuret var kliniskt frisk. De som ej visade några tecken på sjukdomar som kunde påverka studieresultatet inkluderades i studien. Samtliga hundar i den friska kontrollgruppen undersöktes och provtogs under år 2019.

Blodprovsanalyser

Blodprov togs enligt standardprotokoll och ett serumrör 5 ml togs ut via vacutainer. Efter att provet fått stå minst 30 minuter centrifugerades röret för att få ut serum som sedan förvarades i frys vid -18 grader tills de kunde flyttas till frys för -80 graders förvaring. Där förvarades serumet tills de kunde skickas för analys.

Serumproverna analyserades hos företaget Euroimmun i Lübeck, Tyskland i enlighet med deras protokoll för Europlus Granulocyte Mosaic 22, deras egna kit innehållande etanol-fixerade samt formalin-fixerade granulocyter samt dots av MPO respektive PR3 (totalt 4 biochip).

För immunofluorescens har kemiskt coatade glas med substrat bestående av dels etanolfixerade- samt formalinfixerade humana granulocyter använts. Hep-2 celler (humana epitelceller typ 2) användes som substrat för att differentiera mellan ANA och ANCA som ett sista steg.

Om provet är positivt binder de specifika antikropparna till dess antigen och fluoresceinmärkta anti-humana antikroppar kan visualiseras i mikroskop avsett för fluorescens. Proverna titrerades sedan i steg med en faktor av 3,163 ($\sqrt{10}$) till maximalt 32,000.

Proverna bedömdes i mikroskop avseende det fluoriserande mönster som uppvisades. De prover som visade sig positiva för ANCA testades för närvaro av PR3 eller MPO via ELISA.

Vid Europlus immunofluorescens används för antikroppsdetektering både vävnadssektioner/cellsubstrat och monospecifika antigen dots i samma assay. Differentiering eller konfirmering kan därav fastställas i ett och samma reaktionsfält.

Analys av resultat

Resultaten sammanställdes deskriptivt och specifik statistisk metod har ej använts.

RESULTAT

Gruppen med misstänkt/konfirmerad SRMA bestod av 17 hundar, alla av rasen nova scotia duck tolling retriever, av vilka 6 var tikar och 10 hanar (en hund var av okänt kön samt ålder). Hundarna var mellan fyra månader och två år gamla (medelålder var 11,5 månader). En hane var kastrerad.

Gruppen med misstänkt/konfirmerad IMRD bestod av 6 hundar, även här alla av rasen nova scotia duck tolling retriever, av vilka 3 var tikar och 3 hanar. Hundarna i gruppen var mellan ett år och nio månader till sex år och två månader gamla (medelåldern var tre år och nio månader). 5 av hundarna var okastrerade. En hane hade okänd kastrationsstatus.

Den friska kontrollgruppen inkluderade 6 tikar och 1 hane. Fyra av tikarna var av rasen beagle, en labrador retriever och en storpuddel. Hanen var av rasen beagle. Samtliga tikar var okastrerade förutom labrador retrievern. Hanen var kemiskt kastrerad. Åldern varierade från två år och tre månader till drygt tolv års ålder (medelålder 5,8 år).

De patientprover med ett tydligt fluorescensmönster i högre titer än de friska kontrollerna räknades som positiva vid IIF.

Resultat IIF på etanolfixerade granulocyter

Via indirekt immunofluorescens (IIF) på etanolfixerade granulocyter identifierades 4 ANCA positiva, samtliga för p-ANCA. Samtliga hundar tillhörde gruppen med IMRD. Titernivåerna för de sjuka var ≥ 1000 .

I den friska kontrollgruppen uppvisade 6 av 7 hundar låga nivåer av ANCA vid etanolfixering, varav en tik var positiv för p-ANCA och övriga (tre tikar och två hanar) för c-ANCA. Titernivåerna för de friska var ≤ 100 .

Resultat IIF på formalinfixerade granulocyter

Via indirekt immunofluorescens (IIF) på formalinfixerade granulocyter identifierades 5 ANCA positiva hundar, samtliga positiva för c-ANCA. Två av hundarna tillhörde gruppen med SRMA, båda negativa för ANA vid tidigare provtagning. Övriga 3 tre tillhörde gruppen med IMRD, varav två positiva för ANA. Titernivåerna för de sjuka var = 10.

En av dessa hundar visade sig positiv vid både etanolfixering (för p-ANCA) samt formalinfixering (för c-ANCA). Hunden hade vid tidigare provtagning varit positiv för ANA.

Samtliga hundar i den friska kontrollgruppen var negativa för ANCA vid etanolfixering.

Resultat ELISA för MPO och PR3

Via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) var samtliga prover negativa för både PR3 samt MPO.

DISKUSSION

Då få studier gjorts över huvud taget på ANCA inom veterinärmedicin, och till vår kännedom inga vad gäller ANCA-prevalens för SRMA och IMRD, existerar inga konkreta rekommendationer vad gäller tolkning av cut-off för positivt värde eller mönsterbedömning.

I den här studien har därmed positiva resultat bedömts utefter hur de avviker från de friska kontrollerna, då majoriteten av dessa friska uppvisade svaga nivåer av ANCA immunofluorescens vid etanolfixering. Med det i åtanke valdes en cutoff på 1:100 för etanolfixering, samt 1:10 för formalinfixering.

Majoriteten av alla prover (28 av 30), inklusive de friska kontrollerna, var svagt positiva för antingen c-ANCA eller p-ANCA vid IIF vid etanolfixering. Anledningen till den höga prevalensen kan vi enbart spekulera kring, men en möjlighet är de naturligt förekommande nivåerna av till exempel PR3 som uttrycks på cellytan av neutrofiler (Schreiber *et al.*, 2003).

I en studie av Jeffs *et al.* (2019) sågs även låga nivåer av ANCA hos friska individer på humansidan. Samtliga individer i studien uppvisade detekterbara nivåer av IgM-ANCA, både MPO-ANCA samt PR3-ANCA, och i nivåer som även var tillräckliga för att färga in neutrofiler vid IIF. I studien mättes specifikt IgM-ANCA, dock är det vanligast att de ANCA som ses i samband med ANCA-associerad vaskulit är av typen IgG (Bosch *et al.*, 2006; se Heeringa & Cohen Tervaert, 2004). Då antikroppstypen ej bestämdes i den här studien går det ej att säga om fallet är att det är låga nivåer av IgG eller IgM som ses. Att fastställa om det är IgG eller IgM bedöms i det här fallet ej relevant då även IgG har setts hos friska individer (Cui *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011) samt IgM-ANCA även i ett antal studier från humana patienter med vaskulit kopplat till sjukdom (Clain *et al.*, 2017).

Samtliga hundar positiva för p-ANCA var drabbade av IMRD. På humansidan har patienter med reumatoid artrit visat sig ha en närvaro av p-ANCA i 50 % av fallen och atypisk c-ANCA i enbart 3 % av fallen (Mustila *et al.*, 2001). Det sågs även i en studie av Mulder *et al.* (1993) där p-ANCA sågs i 70 % av de ANCA-positiva patienterna, och endast 32 % var positiva för c-ANCA. Det stämmer överens med den här studien då hundarna positiva för p-ANCA hade just IMRD, den reumatiska varianten av tollarsjuka. Det är dock skillnad mellan de två sjukdomarna, då reumatoid artrit är en erosiv reumatisk sjukdom och tollarsjuka är icke erosiv.

Anti-neutrofila cytoplasmatiska antikroppar vs antinukleära antikroppar

Av de som var positiva för p-ANCA var majoriteten även, i den här studien, positiva för ANA. Humana epitelceller (Hep-2) används för att identifiera ANA. Från studier hos människa har det visat sig att differentiering mellan p-ANCA (med reaktivitet precis i anslutning till cellkärnor) och ANA (med reaktivitet i cellkärnor) kan vara svårt. Vid närvaro av båda typerna av antikropparna ses oftast en kraftigare fluorescens hos granulocyterna än vad antikroppar enbart mot cellkärnan gör. Detta kan dock vara svårt att avgöra (Lee *et al.*, 1991; Reinhart *et al.*, 2017; Euroimmun, 2020). Möjligheten för att det faktiskt är p-ANCA kan alltså ej uteslutas vid positivt ANA resultat, då även ett alternativ är att båda antikropparna är närvarande. Interferens av ANA skulle kunna dölja fluorescensen av p-ANCA. Av den här anledningen

hade även fortsatta studier, där likheten mellan ANA och p-ANCA samt metoder för att enklare skilja dem åt inom veterinärmedicin, varit av värde.

Något som talar emot förekomsten av både ANA och ANCA samtidigt i denna studie är de negativa proverna vid formalinfixering. Tre av fyra prover positiva vid etanolfixering visade sig negativa vid formalinfixering för ANCA. Då p-ANCA i vissa fall kan misstas för c-ANCA vid formalinfixering borde de då ej vara helt negativa vid formalinfixering med positivitet vid Hep-2 fixering.

PR3 samt MPO

Inget av proverna, varken positiva eller negativa för ANCA, var positiva för PR3 eller MPO vid ELISA. I en studie av Florey *et al.* (2017) bedömdes sekvenshomologin för MPO mellan hund och människa till att överensstämma till 88 %. Överensstämmelse för PR3 mellan människa och hund har ej kunnat påvisas i dagsläget. I studien ovan sågs totalt 27 positiva för ANCA varav sedan endast totalt 8 testade positiva för antingen MPO eller PR3.

En möjlighet är därför att sekvenshomologin skiljer sig så till den grad att vissa epitoper ej känns igen, vilket skulle kunna ge falska negativa värden och en sänkt sensitivitet.

Med tanke på den låga prevalensen av ANCA-positiva patienter i den här studien samt att positiva utslag för PR3 eller MPO vid ANCA-positiva individer PR3 eller MPO enligt Florey *et al.* (2017) är relativt låg (knappt 30 %) är en annan möjlighet att urvalet helt enkelt var för litet i den här studien.

Det skulle även kunna vara så att varken SRMA eller IMRD är en ANCA-associerad sjukdom. I en stor retrospektiv studie hos människa av över 10 000 serumprover som analyserades för ANCA via IIF samt dess antigen via ELISA sågs att 16,1 % av p-ANCA var mot MPO och 63,8 % av c-ANCA var mot PR3. ANCA-associerade vaskuliter stod för 20,5 % av de ANCA-positiva resultaten, bindvävssjukdomar för 23,9 % och gastrointestinala sjukdomar 21,2 %. Trots det stod de ANCA-associerade vaskuliterna för 93,8 % av specificiteten mot PR3 eller MPO (Tsiveriotis *et al.*, 2011).

Då ANCA-associerad vaskulit i hög grad är specifika för antigen mot PR3 eller MPO kan det här tala för att ANCA som ses vid övriga sjukdomar, ej tillhörande just de ANCA-associerade vaskuliterna, är riktade mot annat innehåll i primära granula än just PR3 och/eller MPO. Den här möjligheten är något som även föreslagits på humansidan för sjukdomar som liknar de ANCA-associerade vaskuliterna (såsom multiple organ dysfunction syndrome) i en studie av Vassilopoulos *et al.* (2003). Det här skulle kunna innebära att SRMA och/eller IMRD hos hund ej kan klassas som en ANCA-associerad vaskulit, då hundarna i studien ej visade en hög prevalens av PR3 eller MPO. Närvaro av ANCA, samt dess eventuella roll i patogenesen av sjukdomarna, är en möjlighet som ej kan uteslutas enbart på grund av den här studien. Alternativt är att även ANCA spelar en roll i sjukdomsförloppet av SRMA och IMRD hos hund, men med ANCA riktade mot andra antigen än just PR3 och MPO.

ANCA: ökad prevalens hos vissa raser?

En viss prevalens av låga nivåer av ANCA kan i studien ses hos fem av de sex kliniskt friska hundarna vid etanolfixerade humana granulocyter med IIF. Fyra av dessa uppvisade låga nivåer av c-ANCA och en p-ANCA. Liknande låga nivåer av ANCA, både p-ANCA samt c-ANCA ses även hos majoriteten av de sjuka hundarna.

Låga nivåer hos kliniskt friska hundar har även påvisats i studier av Karagianni *et al.* (2011) samt Allenspach *et al.* (2004), dock i lägre prevalens än vad som uppvisades i den här studien. I de studierna sågs en signifikant högre prevalens av p-ANCA i samband med flertalet vektorburna sjukdomar, immunmedierad hemolytisk anemi (Karagianni *et al.*, 2011) samt hos hundar med inflammatory bowel disease (IBD) (Allenspach *et al.*, 2004). Möjligtvis kan det antyda att ANCA ej uppvisar en hög specificitet för några enstaka sjukdomar utan snarare är associerat med systemisk sjukdom, något som ej är helt osannolikt då ett neutrofilt svar ses i samband med ett inflammatoriskt svar.

En annan möjlighet till den här skillnaden i prevalens skulle kunna vara en viss rasvariation och dess eventuella association till ANCA. Som tidigare nämnts skiljer sig antalet PR3 som uttrycks på cellytan av neutrofiler från en individ till en annan, där mängden verkar vara genetiskt betingat (Schreiber *et al.*, 2003). Mängden som uttrycks påverkar magnituden av ANCA-inducerad neutrofilaktivering ledande till en, i relation till de celler som uttrycker färre yt-PR3, större frisättning av andel granula och superoxider som i sin tur kan främja inflammation ytterligare. Eventuellt finns alltså möjligheten för en ökad risk för vissa individer, och att närbesläktade individer skulle genom deras släktskap dela den här ökade risken. Huruvida ökade nivåer av ANCA ses hos vissa raser eller närbesläktade individer och dess eventuella koppling till en ökad risk att utveckla ANCA-associerade sjukdomar är dock något som skulle kräva ytterligare studier för att kunna fastställa.

Hos hundar som insjuknar i SRMA och/eller IMRD, framför allt av rasen nova scotia duck tolling retriever, har en viss ärftlighet påvisats (Wilbe *et al.*, 2010). Då inga hundar i den här studien uppvisade något närmare släktskap kunde dock inga slutsatser kring ärftlighet dras.

Begränsningar i studien

I studien användes enbart hundar av rasen nova scotia duck tolling retriever i sjukdomsgruppen, något som möjligtvis begränsar de slutsatser som kan dras för övriga raser.

Ytterligare en begränsning i studien är att hundarna i den friska kontrollgruppen inte var av samma ras som provtagits med sjukdomarna. Möjligheten att en viss raspredisponering för ANCA finns har ej studerats och kan därav inte heller uteslutas. Det hade därför varit fördelaktigt att enbart ha hundar av samma ras genomgående i studien. Alternativt att ha flertalet raser även hos de kliniskt sjuka hundarna.

Prover tagna från de sjuka hundarna togs från olika stadier i behandling. I den mån det gick att ta ett blodprov gjordes det innan insatt behandling, något som dock ej gjordes i alla fall. Hos några av hundarna är det osäkert exakt i vilket stadie av behandling som provet togs (innan eller efter insatt kortisonbehandling/behandling med NSAID). I den utsträckning som det har varit

möjligt har det tagits i beaktning vid tolkning av resultaten, men till stor del på grund av den låga prevalensen har inga slutsatser kring det här kunnat dras. Möjligheten finns att om blodprov tagits efter insatt behandling, att titernivåerna av eventuell ANCA påverkas.

KONKLUSION

En låg prevalens för ANCA (både p-ANCA samt c-ANCA) kunde ses hos hundar med sjukdomarna SRMA och IMRD. Interferens av ANA och därmed falskt positiva prover är dock en möjlighet som behöver beaktas i vidare studier.

Kunskapen kring den eventuella rollen av ANCA vid de undersökta sjukdomarna och den låga prevalensen av ANCA gör relevansen av ANCA som en ny diagnostisk markör för sjukdomarna tveksam i dagsläget.

Förhoppningen med den här studien är att inspirera till vidare forskning kring ANCA och dess relevans inom veterinärmedicin, då vidare studier behövs för att säkerställa dess diagnostiska värde.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Antikroppar, eller immunoglobuliner som de även kallas, är protein som produceras av kroppen för att medverka i immunförsvaret. De har till uppgift att känna igen främmande ämnen, s.k. antigen, som tar sig in i kroppen. Antikroppar är specifika för sin antigen, de är ofta riktade mot ett specifikt ämne. Genom att binda in till antigen, som kan vara t.ex. virus, bakterier eller kemiska substanser, signaleras immunförsvaret att eliminera det kroppsfrämmande ämnet.

Anti-neutrofila cytoplasmatiske antikroppar (ANCA) är en specifik typ av antikropp som är riktade mot ämnen som finns hos framför allt neutrofiler, en vit blodkropp som återfinns framför allt i blodbanan. Neutrofilen släpper ut ämnen som skadar, eller äter upp "fagocyterar" kroppsfrämmande, men även i vissa fall kroppsegna (såsom döda celler), ämnen. Då ANCA riktar sig mot innehållet i neutrofilerna är de därmed s.k. auto-antikroppar d.v.s. antikroppar riktade mot kroppsegna ämnen.

ANCA återfinns i flertalet sjukdomar hos människor såsom granulomatös polyangit (f.d. Wegener's granulomatos), mikroskopisk polyangiit, Churg-Strauss syndrom m.fl. Gemensamt för sjukdomarna är att de förlöper med inflammation i kroppens blodkärl, framför allt de mindre blodkärlen såsom bland annat kapillärer. Eftersom alla kroppens organ är beroende av blodförsörjning kan därför kliniska tecken fås i samtliga organsystem med allt från njursvikt, luftvägs-påverkan, eller hudlesioner. De olika sjukdomarna är snarlika i hur de presenteras men skiljer sig i vissa avseenden, såsom att t.ex. drabbade av Churg-Strauss syndrom vanligare presenteras med astma än vad de andra tidigare nämnda gör. Obehandlat kan sjukdomarna leda till döden.

På senare tid har det även föreslagits att ANCA i sig själva spelar en roll i sjukdomsprocessen. Exakt hur är inte klarlagt: om de är med och orsakar sjukdom eller enbart främjar och aggraverar sjukdomen i fråga.

ANCA har länge varit känt på humansidan. Få studier har dock genomförts om dess relevans inom veterinärmedicin. Därav syftar studien till att undersöka ANCA:s förekomst och relevans inom två sjukdomar hos hund, för att avgöra om ANCA kan användas för att underlätta diagnosticering av dessa eller andra sjukdomar som förlöper med inflammation i blodkärl.

ANCA klassificeras utefter det mönster neutrofilerna påvisar vid indirekt immunofluorescens (IIF), en metod där ett ämne som avger ljus binder in till antikroppen vilket sedan studeras under mikroskop. Via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), en metod som detekterar en antikropp eller antigen genom att rikta vad de binder till, kan det antigen som ANCA är riktade mot sedan påvisas.

De ANCA som är bevisat relevanta kliniskt är c-ANCA samt p-ANCA. C-ANCA känner generellt igen antigenen proteinase 3 (PR3) medan p-ANCA vanligtvis känner igen myeloperoxidas (MPO). Både PR3 och MPO återfinns som komponenter i neutrofilen och kan frisättas ut i blodet eller vävnad om neutrofilen stimuleras av andra kroppsegna ämnen. De återfinns även på cellytan normalt, men i olika mängd från en individ till en annan.

I studien analyserades prover från hundar med misstänkt eller diagnosticerad steroid-responsiv meningit-artrit (SRMA) samt immune-mediated rheumatic disease (IMRD), en immun-

medierad reumatisk sjukdom. En grupp med friska hundar av varierande ras användes som kontrollgrupp.

Steroid-responsiv meningit-arterit (SRMA) karakteriseras av en inflammation i hjärnhinnorna som omger hjärnan men även blodkärlen kring hinnorna som omger ryggmärgen. Inflammationen är steril d.v.s. inga bakterier eller virus kan påvisas som orsak till inflammationen. Hundarna får ofta akut insättande nacksmärta och stelhet, feber, sänkt allmäntillstånd och nedsatt aptit. Drabbade hundar är ofta i ung ålder, vanligtvis under 2 år.

Immune-mediated rheumatic disease (IMRD) eller ”reumatisk ledvärk” tillhör de SLE-relaterade sjukdomarna (systemisk lupus erythematosus) och drabbade hundar är ofta positiva för antinukleära antikroppar (ANA). Hundarna uppvisar ofta stelhet och hälta som minskar efter aktivitet, men även hudförändringar och feber kan ses. Drabbade hundar är generellt äldre än de med SRMA, ofta 1–5 år gamla.

Tillsammans bildar SRMA och IMRD det sjukdomskomplex som kallas ”Tollarsjuka”, just därför att rasen nova scotia duck tolling retriever oftare drabbas än de flesta andra hundraserna.

Resultat

Av totalt 17 hundar var 4 positiva för p-ANCA, samtliga led av IMRD. 5 hundar var positiva för c-ANCA, varav en var en hund som även var positiv för p-ANCA.

Alla hundar var negativa för MPO eller PR3 på ELISA.

Diskussion

En låg nivå av ANCA-positivitet, för antingen c-ANCA eller p-ANCA sågs hos nästan alla hundar (28 av 30), varpå ett positivt resultat ansågs vara de som avvek markant från den friska kontrollgruppen. En möjlig förklaring till närvaron av ANCA sågs hos flertalet hundar kan vara att ANCA normalt kan finnas i kroppen utan att påverka sjukdom. Låga nivåer av ANCA hos friska personer har setts i studier på humansidan.

3 av 4 positiva för p-ANCA visade sig även positiva för ANA, en annan typ av antikropp som, istället för att finnas i cytoplasman, binder in till cellkärnan. Möjligheten finns att ANA interfererar med avläsningen av p-ANCA och ger ett falskt resultat. En annan möjlighet är att ANCA och ANA eventuellt kan finnas i höga nivåer hos hundar med IMRD.

Det kan finnas flera anledningar till att samtliga prover var negativa för MPO och PR3. En möjlighet är att DNA-sekvenserna och därmed utseendet på proteinerna skiljer sig så till den grad att antikropparna inte känner igen ett alltför främmande antigen. En annan möjlighet är att urvalet av ANCA-positiva prover i den här studien var för litet eller att ANCA vid IMRD och/eller SRMA känner igen ett helt annat antigen.

Konklusion

Det är mycket vi inte känner till om ANCA, speciellt inom veterinärmedicin. I den här studien uppmättes en hög prevalens av låga nivåer av ANCA, men en låg prevalens av höga nivåer av ANCA. Möjligheten att ANCA spelar en roll i sjukdomarna IMRD och SRMA hos hund

kvarstår men dess kliniska relevans i nuläget är låg dels på grund av minoriteten positiva prover samt kanske viktigare: avsaknaden av bevis för närvaron av antigenen MPO och PR3, de enda två ANCA-antigen som (på humansidan) har en kliniskt bevisad relevans.

Förhoppningen med den här studien är att inspirera till vidare forskning kring ANCA och dess relevans inom veterinärmedicin, då vidare studier behövs för att säkerställa dess diagnostiska värde.

REFERENSER

- Allenspach K., Lomas B., Wieland B., Harris T., Pressler B., Mancho C., Lees G.E., Vaden S.L. (2008). Evaluation of perinuclear anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibodies as an early marker of protein-losing enteropathy and protein-losing nephropathy in soft coated wheaten terriers. *American Journal of Veterinary Research*, 69:1301-1304.
- Allenspach K., Luckschander N., Styner M., Seibold F., Doherr M., Aeschbach D., Gaschen F. (2004). Evaluation of assays for perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibodies and antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in dogs with inflammatory bowel disease. *American Journal of Veterinary Research*, 65:1279-1283.
- Anfinsen K.P., Berendt M., Liste F.J.H., Haagenen T.R., Indrebo A., Lingaas F., Stigen O., Alban L. (2008). A retrospective epidemiological study of clinical signs and familial predisposition associated with aseptic meningitis in the Norwegian population of Nova Scotia duck tolling retrievers born 1994-2003. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72:350-355.
- Bosch X., Guilabert A., Font J. (2006). Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *The Lancet*, 268:404-418.
- Bremer H.D., Vilson Å., Bonnett B.N., & Hansson-Hamlin H. (2015). Disease patterns and incidence of immune-mediated disease in insured Swedish Nova Scotia duck tolling retrievers. *The Veterinary Record*, 177:e4.
- Churg J. & Strauss L. (1951). Allergic granulomatosis, allergic angiitis, and periarteritis nodosa. *The American Journal of Pathology*, 27:277-301.
- Cizinauskas S., Jaggy A., Tipold A. (2000). Long-term treatment of dogs with steroid-responsive meningitis-arteritis: clinical, laboratory and therapeutic results. *Journal of Small Animal Practice*, 41:295-301.
- Clain J.M., Hummel A.M., Stone J.H, Hoffman G.S., Kallenberg C.G.M., Langford C.A., McCune W.J., Merkel P.A., Monach P.A., Seo P., Spiera R.F., St Clair E.W., Ytterberg S.R., Specks U. (2017). Immunoglobulin (Ig)M antibodies to proteinase 3 in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *The Journal of Translational Immunology*, 188:174-181.
- Csernok E., Ernst M., Schmitt W., Bainton D. F., Gross W. L. (1994). Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clinical & Experimental Immunology*, 95:244-250.
- Csernok E., Lüdemann J., Gross W. L., Bainton D. F. (1990). Ultrastructural localization of proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmic antibodies circulating in Wegener's Granulomatosis. *American Journal of Pathology*, 137:1113-1120.
- Cui Z., Zhao M., Segelmark M., Hellmark T. (2010). Natural autoantibodies to myeloperoxidase, proteinase 3, and the glomerular basement membrane are present in normal individuals. *Kidney International*, 78:590-597.
- Damoiseaux J., Steller U., Buschtez M., Vaessen M., Rosemann A., van Paassen P., Stöcker W., Fechner K., Willem J., Cohen Tervaert. (2009). EUROPLUS™ ANCA BIOCHIP mosaic: PR3 and MPO antigen microdots improve the laboratory diagnostics of ANCA-associated vasculitis. *Journal of Immunological Methods*, 348: 67-73.
- Day C.J., Hewins P., Savage C.O.S. (2003). New development in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 21:35-48.

- Euroimmun AG. *Autoantibodies against granulocyte cytoplasm (cANCA/pANCA)*.
<https://www.euroimmun.com/products/indications/autoantikrper-diagnostik/rheumatology/vasculitis/aak-gegen-granulocyten-anca.html>. [2020-02-27].
- Falk R.J., Terrell R.S., Charles L.A., Jeanette J.C. (1990). Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Medical Sciences*, 87:4115-4119.
- Florey J., Viall A., Streu S., DiMuro V., Riddle A., Kirk J., Perazzotti L., Affeldt K., Wagner R., Vaden S., Harris T., Allenspach K. (2017). Use of granulocyte immunofluorescence assay designed for humans for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies in dogs with chronic enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31:1062-1066.
- Griffith M.E., Coulthart A., Pemberton S., George A.J.T., Pusey C.D. (2001). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) from patients with systemic vasculitis recognize restricted epitopes of proteinase 3 involving the catalytic site. *The Journal of Translational Immunology*, 123:170-177.
- Guillevin L., Durand-Gasselien B., Cevallos R., Gayraud M., Lhote F., Callard P., Amouroux J., Casassus P., Jarrousse B. (1999). Microscopic polyangiitis: clinical and laboratory findings in eighty-five patients. *Arthritis & Rheumatism*. 42:421-430.
- Halbwachs-Mecarelli L., Bessou G., Lesavre P., Lopez S., Witko-Sarsat V. (1995). Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool. *FEBS Letters*, 374:29-33.
- Hansson-Hamlin H., Lilliehöök I. (2009). A possible systemic rheumatic disorder in the Nova Scotia duck tolling retriever. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51:e16.
- Hansson-Hamlin H., Lilliehöök I. (2013). Steroid-responsive meningitis-arteritis in Nova Scotia duck tolling retrievers. *Veterinary Record*, 173:e527.
- Heeringa P., Cohen Tervaert J.W. (2004). Pathophysiology of ANCA-associated vasculitides: Are ANCA really pathogenic? *Kidney International*, 65:1564-1567.
- Hoffman G.S., Kerr G.S., Leavitt R.Y., Hallahan C.W., Lebovics R.S., Travis W.D., Rottem M., Fauci A.S. (1992). Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Annals of Internal Medicine*, 116:488-498.
- Jeffs L.S., Peh C.A., Nelson A., Tan P.G., Davey E., Chappell K., Perkins G.B., Hurtado P.R. (2019). IgM ANCA in healthy individuals and in patients with ANCA-associated vasculitis. *Immunologic Research*, 1:1-12.
- Kallenberg C.G., Mulder A.H., Cohen Tervaert J.W. (1992). Antineutrophil cytoplasmic antibodies: a still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. *The American Journal of Medicine*, 93:675-682.
- Karagianni A.E., Solano-Gallego L., Breitschwerdt E.B., Gaschen F.P., Day M.J., Trotta M., Wieland B., Allenspach K. (2011). Perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in dogs infected with various vector-borne pathogens and in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *American Journal of Veterinary Research*, 72:1403-1409.
- Kobold A.C.M., van Wijk R.T., Franssen C.F.M., Molema G., Kallenberg C.G.M., Tervaert J.W.C. (1999). In vitro up-regulation of E-selectin and induction of interleukin-6 in endothelial cells by

- autoantibodies in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 17:433-440.
- Lee S.S., Lawton J.W., Chak W. (1991). Distinction between antinuclear antibody and p-ANCA. *Journal of Clinical Pathology*, 44:962-962.
- Littman M.P., Dambach D.M. Vaden S.L., Giger U. (2000). Familial protein-losing enteropathy and protein-losing nephropathy in soft coated wheaten terriers: 222 Cases (1983-1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14:68-80.
- Lorenz M.D. & Kornegay J.N. (2004). *Handbook of Veterinary Neurology*. 4. Ed. Philadelphia (Pa): Saunders.
- Luckschander N., Allenspach K., Hall J., Seibold F., Gröne A., Doherr M.G., Gaschen F. (2006). Perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibody and response to treatment in diarrheic dogs with food responsive disease or inflammatory bowel disease. *Journal of Veterinary Medicine*, 20:221-227.
- Lüdemann J., Utecht B., Gross W.L. (1990). Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *Journal of Experimental Medicine*, 171:357.
- Maiolini A., Carlson R., Schwartz M., Gandini G., Tipold A. (2010). Determination of immunoglobulin A concentrations in the serum and cerebrospinal fluid of dogs: An estimation of its diagnostic value in canine steroid-responsive meningitis-arteritis. *The Veterinary Journal*, 191:219-224.
- Mancho C., Sainz Á., García-Sancho M., Villaescusa A., Tesouro M.A., Rodríguez-Francho F. (2010) Detection of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies and antinuclear antibodies in the diagnosis of canine inflammatory bowel disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22:553-558.
- Merkel P.A., Polisson R.P., Chang Y., Skates S.J., Niles J.L. (1997). Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in a large cohort of patients with connective tissue disease. *Annals of Internal Medicine*, 126:866-873.
- Mulder A.H.L., Horst G., van Leeuwen M.A., Limburg P.C., Kallenberg C.G.M. (1993). Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis: Characterization and clinical correlations. *Arthritis and Rheumatism*, 36:1054-1060.
- Mustila A., Paimela L., Lerisalo-Repo M., Huhtala H., Miettinen A. (2001). Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with early rheumatoid arthritis: An early marker of progressive erosive disease. *Arthritis & Rheumatology*. 43:1371-1377.
- Niles J.L., McCluskey R.T., Ahmad M.F., Arnaout M.A. (1989). Wegener's Granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase. *Blood*, 74:1888-1893.
- Reinhart W.E., Gallan Y., Godbout T., Ma D. (2017). Re-evaluation the current ANCA screening method: multiplex indirect immunofluorescence assay in ANCA testing. *International Journal of Clinical Pathology and Diagnosis*, doi: 10.29011/IJCP-105.000005. [2020-02-27].
- Roosendaal C. & Kallenberg C.G.M. (1999). Are anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) clinically useful in inflammatory bowel disease (IBD)? *Clinical and Experimental Immunology*, 116:206-213.
- Savage J., Gillis D., Benson E., Davies D., Esnault V., Falk R.J., Hagen E.C., Jayne D., Jennette J.C., Paspaliaris B., Pollock W., Pusey C., Savage C.O., Silvestrini R., van der Woude F., Wieslander

- J., Wiik A. (1999). International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *American Journal of Clinical Pathology*, 111:507-513.
- Savige J., Pollock W., Trevisin M. (2005). What do antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) tell us? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 19:263-276.
- Saxon A., Shanahan F., Landers C., Ganz T., Targan S. (1990). A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86:202-210.
- Schlieben D.J., Korbet S.M., Kimura R.E., Schwartz M.M., Lewis E.J. (2005). Pulmonary-renal syndrome in a newborn with placental transmission of ANCAs. *American Journal of Kidney Diseases*, 45:758-761.
- Schrieber A., Busjahn A., Luft F.C., Kettritz R. (2003). Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14:68-75.
- Schreiber A., Luft F.C., Kettritz R. (2004). Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. *Kidney International*, 64:2172-2183.
- Taekema-Roelvink M.E.J., Van Kooten C., Janssens M.C., Heemskerk E., Daha M.R. (1998). Effect of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies on proteinase 3-induced apoptosis of human endothelial cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 48:37-43.
- Tarabishy A.B., Schulte M., Papaliadis G.N., Hoffman G.S. (2010). Wegener's Granulomatosis: Clinical manifestations, differential diagnosis, and management of ocular and systemic disease. *Survey of Ophthalmology*, 55:429-444.
- Tervaert J.W.C., Goldschmeding R., Elema J.D., Van der Giessen M., Huitema M.G., Van der Hem G.K., The T.H., von Dem Borne A.E.G.Kr., Kallenberg C.G.M. (1990). Autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes in crescentic glomerulonephritis. *Kidney International*, 37:799-806.
- Tervaert, J., Goldschmeding, R., Elema, J., Limburg, P., van der Giessen, M., Huitema, M., Koolen, M., Hené, R., The, T., van der Hem, G., von dem Borne, A. and Kallenberg, C. (2010). Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different forms of vasculitis. *Arthritis & Rheumatism*, 33:1264-1272.
- Tipold A. & Jaggy A. (1994). Steroid responsive meningitis-arteritis in dogs: Long-term study of 32 cases. *Journal of Small Animal Practice*, 35:311-316.
- Tipold A. (1995). Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: A Retrospective Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 9:304-314.
- Tsiveriotis K., Tsirogianni A., Papi E., Soufleros K., Papasteriades C. (2011). Antineutrophil cytoplasmic antibodies testing in a large cohort of unselected Greek patients. *Autoimmune Diseases*, Article ID 626495, pp. 9.
- Vassilopoulos D., Niles J.L., Villa-Forte A., Arroliga A.C., Sullivan E.J., Merkel P.A., Hoffman G.S. (2003). Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with various pulmonary diseases or multiorgan dysfunction). *Arthritis Care & Research*, 49:151-155.
- Whitacre C.C., Reingold S.C., O'Looney P.A., Blankenhorn E., Brinley F., Collier E., Duquette P., Fox H., Giesser B., Gilmore W., Lahita E., Nelson J.L., Reiss C., Riskind P., Voskuhl R. (1999). A gender gap in autoimmunity. *Science*, 283:1277-1278.

- Wieland B., Summers J.F., Häsler B., Mancho-Alonso C., Craig A., Allenspach K. (2012). Prevalence of perinuclear antineutrophilic cytoplasmic autoantibodies in serum of healthy soft coated wheaton terriers in the United Kingdom. *American Journal of Veterinary Research*, 73:404-408.
- Wilbe M., Jokinen P., Truvé K., Seppala E.H., Karlsson E.K., Biagi T., Hughes A., Bannasch D., Andersson G., Hansson-Hamlin H., Lohi H., Lindblad-Toh K. (2010). Genome-wide association mapping identifies multiple loci for a canine SLE-related disease complex. *Nature Genetics*, 42:250-254.
- Xiao H., Heeringa P., Hu P., Liu Z., Zhao M., Aratani Y., Maeda N., Falk R. J., Jeanette J. C. (2002). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 110:955-963.
- Xu P-C., Cui Z., Chen M., Hellmark T., Zhao M-H. (2011). Comparison of characteristics of natural autoantibodies against myeloperoxidase and anti-myeloperoxidase autoantibodies from patients with microscopic polyangiitis. *Rheumatology*, 50:1236-1243.