



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap

# **Två års uppföljande studie av heterofila antikroppar och deras koppling till klinisk sjukdom hos hund**

## **Two-year follow-up of heterophilic antibodies and their association with clinical disease in dogs**

*Camilla Bäckström*

*Uppsala  
2020*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*



# Två års uppföljande studie av heterofila antikroppar och deras koppling till klinisk sjukdom hos hund

## Two-year follow-up of heterophilic antibodies and their association with clinical disease in dogs

*Camilla Bäckström*

**Handledare:** Daniel Bergman, institutionen för kliniska vetenskaper

**Biträdande handledare:** Bodil Ström Holst, institutionen för kliniska vetenskaper

**Examinator:** Helene Hansson-Hamlin, 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>

**Nyckelord:** heterofila antikroppar, interferens, hund, klinisk sjukdom, tumör, autoimmun sjukdom, berner senenhund, labrador retriever

**Key words:** heterophilic antibodies, interference, canine, clinical disease, tumour, autoimmune disease, Bernese Mountain Dog, Labrador Retriever

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper



## **SAMMANFATTNING**

Heterofila antikroppar är endogena antikroppar som kan orsaka interferens i immunanalyser genom att binda till analysantikroppar. Heterofila antikroppar kan ha varierande ursprung; de kan bland annat bildas efter kontakt med arten vars antikroppar används i analysen eller vara autoantikroppar. På humansidan har heterofila antikroppar visats ha en koppling till klinisk sjukdom så som vissa tumörsjukdomar och autoimmuna sjukdomar. Ingen liknande koppling finns beskriven hos hund, men prevalensen av heterofila antikroppar har visats vara hög hos berner sennenhund, en ras som ofta drabbas av olika typer av tumörsjukdomar.

Detta arbete är gjort som en uppföljande studie av 44 berner sennenhundar och 31 labradorer som provtagits år 2017 för förekomst av heterofila antikroppar. Uppgifter om hundarna samlades in i form av ett frågeformulär med fokus på eventuell klinisk sjukdom hos hundarna. Uppföljande blodprov togs på 22 hundar för att se om de heterofila antikropparna var persisterande eller transienta, om de fortsatt binder till samma del av mus-IgG i analysen, samt om tidigare negativa individer utvecklade heterofila antikroppar under två års tid.

I denna studie observerades inget samband mellan klinisk sjukdom och förekomst av heterofila antikroppar. Kontakt med möss kunde inte förklara förekomsten av heterofila antikroppar och därför kvarstår en misstanke om att de heterofila antikropparna kan vara autoantikroppar. I studien var heterofila antikropparna oftast persisterande efter två år med ett liknande reaktionsmönster som två år innan. Tre tidigare negativa berner sennenhundar testades positiva för heterofila antikroppar i denna studie.

Fler studier behövs på ett större antal hundar av flera raser för att avgöra om det finns en koppling mellan heterofila antikroppar och klinisk sjukdom, samt för att undersöka om heterofila antikroppar hos hund är autoantikroppar.

## **SUMMARY**

Heterophilic antibodies are endogenous antibodies with ability to cause interference in immunoassays by binding to assay antibodies. Heterophilic antibodies can have different origins. Some heterophilic antibodies are formed after contact with the species whose antibodies are used in the assay, others are formed as autoantibodies. Research in human medicine has found connections between heterophilic antibodies and different types of tumours and autoimmune diseases. No similar connection is described in dogs, but it has been shown that Bernese Mountain Dogs have a high prevalence of heterophilic antibodies, and the breed is known to be predisposed for tumour diseases.

This study is a follow-up of 44 Bernese Mountain Dogs and 31 Labrador Retrievers that were tested for heterophilic antibodies in 2017. Data about the dogs in this study was collected via a questionnaire with focus on clinical disease in the dogs. Blood samples were taken from 22 dogs to follow up if the heterophilic antibodies are persistent or transient, and to test whether the antibodies bind to the same region of mouse-IgG in the assay and if previously negative dogs had developed heterophilic antibodies during the last two years.

In this study, no connection was seen between clinical disease and heterophilic antibodies. However, the origin of the heterophilic antibodies could not be explained by contact with mice making it possible that these heterophilic antibodies can be autoantibodies. In most cases the heterophilic antibodies were still persistent after two years and had a similar reaction pattern as before. Three previously negative Bernese Mountain Dogs were tested positive for heterophilic antibodies in this study.

More research is needed on a larger number of dogs and different breeds to conclude whether or not there is a connection between clinical disease and heterophilic antibodies in dogs. More studies are also needed to investigate if the heterophilic antibodies in dogs are, in fact, autoantibodies.

# INNEHÅLL

INLEDNING.....	1
LITTERATURÖVERSIKT .....	2
Antikroppar inom diagnostik.....	2
Heterofila antikroppar.....	2
<i>Konsekvenser av heterofila antikroppar</i> .....	4
<i>Heterofila antikroppar hos hund</i> .....	4
Sjukdomar hos berner sennenhund .....	5
<i>Medelålder och dödsorsaker</i> .....	5
<i>Tumörsjukdomar</i> .....	5
MATERIAL OCH METODER.....	7
Hundar i studien.....	7
Frågeformulär .....	7
Provtagning och analyser.....	7
Statistiska analyser .....	8
RESULTAT .....	9
Sammanfattning av frågeformulär .....	9
<i>Svarsfrekvens</i> .....	9
<i>Ras, kön och ålder</i> .....	9
<i>Sjukdomar</i> .....	10
<i>Positiva hundar</i> .....	12
<i>Kontakt med möss</i> .....	13
Analyser.....	13
DISKUSSION .....	15
KONKLUSION.....	16
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING .....	17
REFERENSER.....	19





## INLEDNING

Heterofila antikroppar är kända för att kunna ge upphov till störningar inom immundiagnostik genom att binda till analysantikroppar. Inom humanmedicin har heterofila antikroppar påvisats kunna ha koppling till autoimmuna sjukdomar och tumörsjukdomar (Koshida *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Inom veterinärmedicin finns få studier inom ämnet och flera frågor är fortfarande obesvarade.

Studier har påvisat heterofila antikroppar även hos hund och de har visats orsaka felaktiga analysresultat (Solter *et al.*, 2008; Bergman *et al.*, 2019a), däremot är betydelsen av heterofila antikroppar för klinisk sjukdom hos hund inte utredd. Om de heterofila antikropparna visas ha en koppling till autoimmuna sjukdomar eller tumörsjukdomar även hos hund är det möjligt att göra framsteg bland annat inom diagnostisering av sjukdomar. Berner sennenhund har visats ha en signifikant högre prevalens av heterofila antikroppar jämfört med labrador retriever (Bergman *et al.*, 2019b). Som ras är berner sennenhund predisponerad för tumörsjukdomar; ungefär hälften av berner sennenhundar dör till följd av tumörsjukdomar och ofta i en låg ålder (Egenvall *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2010; Erich *et al.*, 2013; Klopfenstein *et al.*, 2016). En stor del av tumörsjukdomar hos berner sennenhund har även visats vara ärftliga (Padgett *et al.*, 1995; Abadie *et al.*, 2009). På grund av den högre prevalensen av heterofila antikroppar inom rasen är det intressant att utreda ifall det finns ett samband mellan dessa antikroppar och klinisk sjukdom med tanke på rasens sjukdomsstatistik.

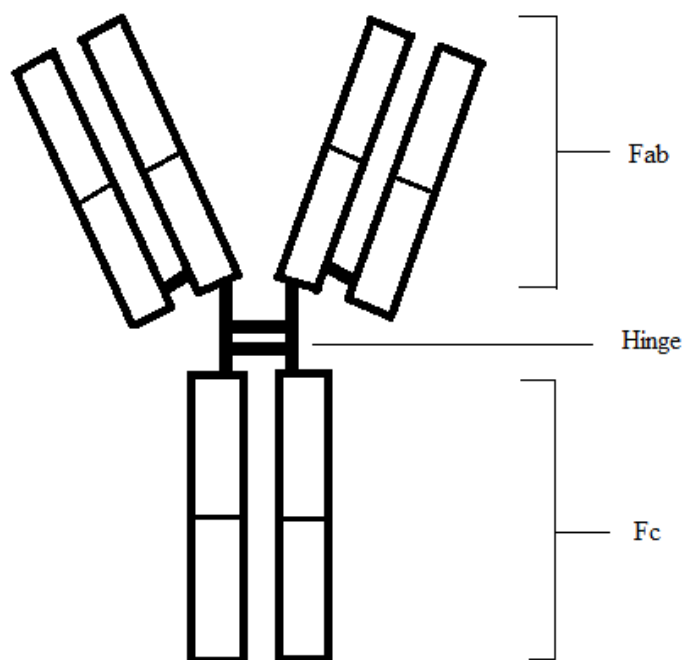
Heterofila antikroppar kan ha varierande ursprung, vilket inte finns utrett för hund. De heterofila antikroppar som påvisats hos hund kan vara anti-musantikroppar som bildats efter kontakt med möss, vilka upptäcks eftersom mus-IgG ofta förekommer i immunanalyser. Alternativt kan de heterofila antikropparna vara autoantikroppar som kroppen bildat mot sitt eget IgG, och då kan det finnas en koppling till immunmedierade sjukdomar och tumörsjukdomar.

Första syftet med denna studie är att följa upp hundarna som provtogs två år tidigare för studien av Bergman *et al.* (2019b) för att få veta om hundarna utvecklat någon sjukdom och i så fall vilken, samt om hundarna kan ha en koppling till möss för att kunna undersöka källan till antikropparna. Det andra syftet med studien är att undersöka om dessa hundar fortsatt har heterofila antikroppar och om de binder till samma region som under första provtagningen. De uppföljande proverna ger information om hur länge de heterofila antikropparna stannar kvar i cirkulationen, om de är persistenta eller transienta. Eftersom heterofila antikroppar kan ge upphov till felaktiga provresultat är det intressant att veta om de finns kvar och kan fortsatt påverka provresultat, något som eventuellt behöver tas hänsyn till på laboratorier. Om de heterofila antikropparna är kopplade till sjukdomsutveckling kan de vara värdefulla diagnostiskt om de går att påvisa i ett tidigt sjukdomsstadie, något som eventuellt kan förbättra prognosen för en patient.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Antikroppar inom diagnostik

Immunanalyser är biokemiska metoder som används för att upptäcka eller mäta analyter i prover med hjälp av antikroppar, som är proteiner med en specifik förmåga att binda till antigen (Vidarsson *et al.*, 2014). Immunglobulin G (IgG) är den mest använda antikroppen inom immunanalyser. IgG-molekylen består av fyra polypeptidkedjor; två identiska tunga kedjor samt två lätta kedjor. Kedjorna bildar tillsammans en *fragment crystalline* (Fc) -region som genom ett hingeområde kopplas till två antigenbindande *fragment antigen binding* (Fab) armar som tillsammans kallas F(ab')<sub>2</sub>. I figur 1 illustreras en IgG-molekyl med dess regioner.

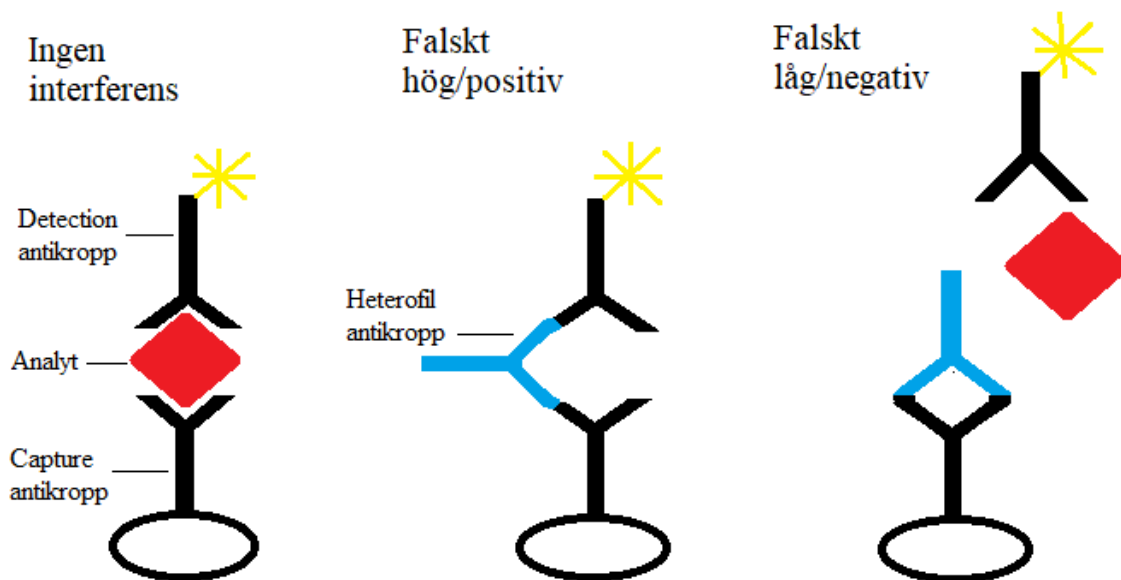


Figur 1. Illustration av IgG-molekyl och dess delar.

### Heterofila antikroppar

Heterofila antikroppar är endogena antikroppar som orsakar interferens genom att reagera med analysantikroppar i immunanalyser och kan inom immundiagnostik ge upphov till felaktiga resultat (Preissner *et al.*, 2005). Heterofila antikroppar medför en risk för feldiagnostisering och fel val av behandling på grund av i de flesta fall falskt höga och ibland falskt låga provsvar. Heterofila antikroppar ger inga synliga avvikelser på provet till skillnad från exempelvis hemolys och lipemi, och de kan därför vara svåra att upptäcka. En analysmetod där heterofila antikroppar kan orsaka interferens är icke-kompetitiva immunanalyser där djurantikroppar används (Bolstad *et al.*, 2013). I en icke-kompetitiv immunanalys krävs det att analyten binder till två antikroppar, vilket gör att de har en hög sensitivitet och specificitet jämfört med kompetitiva analysmetoder och används därför ofta till immunanalyser. Hur heterofila antikroppar ger upp-

hov till interferens illustreras i figur 2. Interferens är inte lika vanligt i kompetitiva immunanalyser, vilket kan bero på en för låg affinitet hos de heterofila antikropparna (Miller, 2004). Hos heterofila antikroppar ses oftast affinitet till mus-IgG-1, som är de mest använda antikropparna inom immunanalyser, men det finns även beskrivet att heterofila antikroppar kan binda till andra subtyper av mus-IgG (Bjerner *et al.*, 2005).



Figur 2. Illustration av interferens i icke-kompetitiva immunanalyser. Till vänster förekommer ingen interferens och analyten kan binda till båda analysantikropparna. I mitten ses hur en heterofil antikropp kan binda till analysantikropparna och orsaka ett falskt högt eller positivt resultat. Till höger ses hur en heterofil antikropp kan hindra analyten att binda till analysantikropparna och därmed orsakar ett falskt lågt eller negativt resultat.

Heterofila antikroppar kan uppstå av olika anledningar och ursprunget är oftast inte känt. En typ av heterofila antikroppar är anti-djurantikroppar som bildas vid en känd exponering för den djurart vars antikroppar används i analysen (Bolstad *et al.*, 2013). Framför allt orsakas problem av anti-musantikroppar då antikroppar från möss är vanligt förekommande i analyser (Kricka, 1999). På humansidan sker exponeringen i vissa fall vid en injektion av djurantikroppar för terapeutiska eller diagnostiska syften, men heterofila antikroppar kan även uppkomma vid direkt kontakt med djurslaget i fråga (Berglund & Holmberg, 1989). En annan typ av heterofila antikroppar är reumatoida faktorer som är autoantikroppar som bildats av kroppen mot Fc-regionen i kroppens egna IgG-antikroppar (Bolstad *et al.*, 2013). De finns i hög grad hos patienter med reumatoid artrit, men även hos 5–10 % av den friska populationen (Nishimura *et al.*, 2007). Korsreaktivitet med reumatoida faktorer förekommer på humansidan eftersom Fc-regionen för humant IgG liknar den hos flera olika djurantikroppar (Bolstad *et al.*, 2013). Övriga heterofila antikroppar saknar en känd exponering och de kan även vara naturligt förekommande (Levinson & Miller, 2002). Hur länge heterofila antikroppar kvarstår i kroppen är ofta oklart, det finns beskrivet att heterofila antikroppar kan vara transienta och försvinna efter tre veckor (Kazmierczak *et al.*, 2000), men även att de kan persistera i flera år (Kricka, 1999).

### **Konsekvenser av heterofila antikroppar**

Immundiagnostik används inom flera medicinska områden, bland annat för hormonanalyser och för olika biomarkörer inom exempelvis kardiologi och onkologi (Kazmierczak *et al.*, 2000; Solter *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009; Mongolu *et al.*, 2016). Felaktiga analysresultat på grund av interferens orsakat av heterofila antikroppar finns rapporterat i flera fall på humansidan och de kan ge allvarliga konsekvenser vid feldiagnostisering (Rotmensch & Cole, 2000; Cappy *et al.*, 2013).

Förutom att de heterofila antikropparna kan störa laboratorieanalyser kan de även vara till hjälp genom att ge information om patienten vid utredning av sjukdom. Autoantikroppar kan användas för att tidigt detektera bland annat bröst- eller lungcancer (Chapman *et al.*, 2007; 2008). På humansidan har heterofila antikroppar visats ha en koppling med vissa typer av tumörsjukdomar. Humana cancerpatienter har visats ha anti-musantikroppar i högre utsträckning jämfört med patienter utan cancer (Koshida *et al.*, 2010). Cancer-associerade matrix metalloproteinaser (MMP) kan klyva kroppseget IgG-1 i hingeregionen, vilket leder till bildning av så kallade anti-hingeantikroppar eller anti-F(ab')<sub>2</sub>-antikroppar som är autoantikroppar mot hingeregionen av IgG-1 (Brezki & Jordan, 2010). Antikroppsklyvning med hjälp av MMP misstänks kunna vara en metod för tumörer att ta sig förbi immunsystemet (Brezki & Jordan, 2010). En ökning i anti-hingeantikroppar kan även ses vid autoimmuna sjukdomar så som SLE (systemic lupus erythematosus) och reumatoid artrit.

Vid sjukdomsutredning av autoimmuna sjukdomar kan reumatoida faktorer vara värdefulla då de i vissa fall går att påvisa i ett tidigt sjukdomsstadie. På humansidan är det visat att 88 % av patienter med SLE har autoantikroppar för SLE flera år innan diagnos ställs (Arbuckle *et al.*, 2003). Av patienter med reumatoid artrit har ungefär hälften avvikande autoantikroppar redan flera år innan patienten får kliniska symtom av sjukdomen (Nielen *et al.*, 2004). Så kallad *epitope spreading* där reaktionsmönstret för antikroppen ändras kan ske flera år innan klinisk sjukdom (van de Stadt *et al.*, 2011). En ökning av IgM reumatoid faktor eller anti-CCP (*anti-cyclic citrullinated peptide*) hos friska individer har visats korrelera med utveckling av reumatoid artrit senare i livet. Det finns även resultat som tyder på att anti-F(ab')<sub>2</sub>-antikroppar kan ha en skyddande effekt mot immunmedierad hemolytisk anemi hos människa (Terness *et al.*, 1995).

### **Heterofila antikroppar hos hund**

Inom veterinärmedicin finns det endast få studier om heterofila antikroppar och forskning pågår. I hundplasma har det påvisats heterofila antikroppar som kan ge upphov till falskt positiva resultat i analyser med ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Solter *et al.*, 2008). I en studie där prover analyserades från 320 hundar som vistats på djursjukhus var prevalensen av heterofila antikroppar 9 % (Bergman *et al.*, 2018). Interferens i analyser av anti-müllerskt hormon finns beskrivet hos hund, där ett falskt högt värde orsakat av heterofila antikroppar skulle kunna leda till onödiga kirurgiska åtgärder (Bergman *et al.*, 2019a). En signifikant högre andel av berner sennenhund har visats ha heterofila antikroppar jämfört med labrador retriever i en studie av Bergman *et al.* (2019b). Av hundarna som deltog i studien påvisades heterofila antikroppar hos 20 % av berner sennenhund och hos 4 % av labrador retriever. Av proverna från de tolv individer som testades positiva reagerade fem med både helt IgG och F(ab')<sub>2</sub>-fragment, tre med helt IgG, två med helt IgG samt Fc-fragment, och två med enbart Fc-fragment. Av

hundarna hade alla fyra hundar vars prover reagerade med Fc-fragment en diagnos eller tecken på klinisk sjukdom, medan endast en av hundarna som reagerade med F(ab')<sub>2</sub>-fragment hade en klinisk sjukdom i form av ett lipom.

## **Sjukdomar hos berner sennenhund**

Berner sennenhund är en schweizisk gårdshund som numera framför allt används som familjehund. Enligt Svenska Kennelklubbens rasspecifika avelsstrategi är rasens största problem låg livslängd kopplat till tumörsjukdomar, skelett- och ledsjukdomar så som armbågsleds- och höftledsdysplasi och njursjukdomar i form av renal dysplasi och familjär nefropati (Svenska Kennelklubben, 2018). Inom rasen finns även reproduktionsproblem så som låga kullstorlekar och låg dräktighetsprocent.

### **Medellålder och dödsorsaker**

Berner sennenhund är en ras med låg medellivslängd och tumörsjukdomar är den vanligaste dödsorsaken enligt flera studier. I en holländsk studie med 1092 berner sennenhundar dog hundarna i genomsnitt vid åtta års ålder och tumörsjukdomar stod för 55,1 % av dödsfallen (Erich *et al.*, 2013). Klopfenstein *et al.* (2016) studerade 381 berner sennenhundar i Schweiz och medellivslängden för hundarna var 8,3 år, av dem dog 58,3 % till följd av tumörsjukdomar. I median levde tikarna över ett år längre än hanhundarna. I en retrospektiv studie gjord på 290 berner sennenhundar i Danmark var medellivslängden för hundarna 7,1 år och 42,1 % av hundarna dog av tumörsjukdomar, medan de andra och tredje vanligaste dödsorsaken var ålder och njursjukdom och stod för 10,3 % respektive 6,9 % av dödsfallen (Nielsen *et al.*, 2010). En ännu högre andel med 61 % av dödsfallen på grund av tumörsjukdomar har visats i en tysk population med en medellivslängd på 8,3 år (Hartmann *et al.*, 2011). Av svenska berner sennenhundar dör 41 % till följd av tumörsjukdomar enligt statistik från försäkringsbolag och sannolikheten att hundarna lever över 10 år är 30 % (Egenvall *et al.*, 2000). Motsvarande tal för labrador retriever är 75 % (Egenvall *et al.*, 2005). Tumörsjukdomar är den vanligaste dödsorsaken även hos alla hundraser totalt, men står endast för 18 % av dödsfallen i de fall där en diagnos är ställd (Bonnett *et al.*, 2005). Inom de flesta hundraser är tumörsjukdomar en vanligare dödsorsak för äldre tikar jämfört med hanar, men för berner sennenhund har hanar en ökad risk att dö till följd av tumörsjukdomar då de blir äldre jämfört med tikar i samma ålder (Egenvall *et al.*, 2005). Dödsorsaker för berner sennenhund är studerade även i Nordamerika och resultaten är lika som i de europeiska studierna då 55 % av hundarna i studien dött på grund av tumörsjukdomar (Fleming *et al.*, 2011).

### **Tumörsjukdomar**

Den vanligaste tumörsjukdomen hos berner sennenhund är histiocytiskt sarkom, även kallad malign histiocytos, en aggressiv typ av tumörsjukdom som har visats vara ärftlig (Abadie *et al.*, 2009). Studier visar varierande resultat för hur stor andel av berner sennenhundar dör av histiocytiskt sarkom; 15,3 % enligt Erich *et al.* (2013) och 4,5 % enligt Nielsen *et al.* (2010), författarna påpekar dock att flera hundar i studierna saknar en exakt diagnos för sin tumörsjukdom men har haft kliniska sjukdomstecken som skulle kunna kopplas till histiocytiskt sarkom och att prevalensen därför sannolikt är högre. Av tumörsjukdomar hos berner sennenhund utgör histiocytiskt sarkom cirka en fjärdedel av fallen totalt (Padgett *et al.*, 1999; Erich *et al.*, 2013).

I de fall där en exakt diagnos är ställd utgör histiocytiskt sarkom 65 % (Erich *et al.*, 2013). Ruple och Morley (2016) har undersökt riskfaktorer för utveckling av histiocytiskt sarkom hos berner sennenhund och föreslår kronisk inflammation som en möjlig riskfaktor då ortopediska problem ger en större risk att utveckla histiocytiskt sarkom. Sedan år 2014 har det funnits ett gentest som kallas SH-test (*sarcome histiocytaire*) och påvisar en minskad eller förhöjd risk att hunden insjuknar i histiocytiskt sarkom vilket kan tas i beaktande inom avel (Svenska Kennelklubben, 2018).

Den näst vanligaste diagnostiserade tumörsjukdomen som drabbar berner sennenhund är malignt lymfom, följt av olika typer av sarkom, melanom och carcinom enligt studien av Erich *et al.* (2013). Av hundar med en exakt diagnos utgör malignt lymfom 24 % av fallen. I flera studier om tumörsjukdomar hos berner sennenhund saknas en exakt diagnos för flera av hundarna och tumörerna är endast specificerade till organsystem.

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Hundar i studien**

I studien deltog hundar av raserna berner sennenhund och labrador retriever. Som inklusionkriterium användes att hundarna deltagit och provtagits år 2017 för studien av Bergman *et al.* (2019b). Gruppen bestod av totalt 107 hundar varav 54 av rasen berner sennenhund och 53 av rasen labrador retriever. I gruppen ingick både hundar vars ägare själva angett intresse för att delta i den tidigare studien samt hundar som besökt Universitetsdjursjukhuset (UDS) i Uppsala eller andra veterinärkliniker och vars överblivna blodprover hade använts efter skriftligt eller muntligt tillstånd. Ägarna till hundarna kontaktades antingen via e-post eller telefon. De som angett en e-postadress fick en länk till ett frågeformulär på undersökningsplattformen Netigate ([www.netigate.se](http://www.netigate.se)), medan resten svarade på samma frågor via telefon. Uppgifterna för hundarna som besökt UDS och som enligt journalerna hade avlivats fylldes i baserat på journalerna utan att ägarna kontaktades. De hundar vars ägare inte gick att kontakta exkluderades ur studiens följande steg.

### **Frågeformulär**

Frågeformuläret var öppet i sex veckor. Formuläret började med tilltalsnamn och ras på hunden för att kunna koppla ihop svaren till rätt individ. Kön efterfrågades för att veta om kastrationsstatus ändrats under de senaste två åren. I följande steg ställdes frågan om hunden blivit utredd för sjukdom hos veterinär efter år 2017. Om svaret var ja efterfrågades typ av sjukdom genom att fylla i vilken eller vilka typer av sjukdomar inom kategorierna hudsjukdom, njursjukdom, magtarmsjukdom, nervsjukdom, tumörsjukdom, ortopedisk sjukdom, hjärtsjukdom och övrig sjukdom. Djurägarna bads beskriva vad hunden utreddes för mer exakt i efterföljande textruta och om hunden fått en diagnos och i så fall vilken. Därefter frågades vilket år utredningen skedde och det fanns även en textruta där djurägarna kunde berätta mer om sjukdomen. De hundar som inte utretts för sjukdom efter år 2017 gick direkt vidare till följande fråga om hunden behandlats med läkemedel efter år 2017. För att fånga upp eventuella sjukdomar som inte utretts hos veterinär fanns en fråga om hunden hade någon hemmadiagnos. Om hunden dött eller avlivats ställdes en fråga om orsaken var känd och i så fall vilken.

För att få information om eventuell kontakt med möss frågades om hunden jagar/jagade möss, samt om hunden haft annan kontakt med möss. I slutet av frågeformuläret ställdes frågan om djurägarna även kunde tänka sig bidra genom att låta ta ett uppföljande blodprov på hunden.

### **Provtagning och analyser**

Blodprov togs av 22 hundar, varav sju var positiva för heterofila antikroppar år 2017 och 15 var negativa och användes som kontrollgrupp. Nio hundar provtogs på plats i Uppsala och övriga prover skickades in från lokala veterinärkliniker. Till den positiva gruppen valdes alla tidigare positiva hundar som var vid liv och vars ägare ville delta i provtagningen. Kontrollgruppen bestod av ett slumpmässigt urval av negativt testade hundar. Alla positiva hundar var berner sennenhundar, medan kontrollgruppen bestod av tolv berner sennenhundar och tre labradorer. Av hundarna togs venösa blodprov i serumrör som centrifugerades varefter serumet separerades och frystes i -20 °C.

Helt mus-IgG, Fc-fragment och F(ab')<sub>2</sub>-fragment av mus-IgG späddes ut med NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,5) till koncentrationen 2 µg/mL och pipetterades på mikrotiterplattor i polystyren med 96 brunnar som inkuberades i 4 °C över natten. Brunnarna tvättades fyra gånger med 200 µL Tween-20 spädd i PBS (0,05 %). Av varje serumprov pipetterades 50 µL i brunnarna, två av proverna var utspädda till 1:2 med PBS på grund av liten provmängd. Som positiv kontroll användes duplikat av 50 µL anti-mus IgG i spädningen 1:1600. Negativa kontroller bestod av 50 µL PBS i duplikat. Plattorna inkuberades i 90 minuter i rumstemperatur varefter de tvättades fyra gånger med 200 µL PBS. Alla brunnar fylldes med 50 µL monoklonalt HRP-konjugerat mus anti-human CEA IgG i spädningen 1:400 och inkuberades i rumstemperatur i 90 minuter. Brunnarna tvättades igen fyra gånger med 200 µL PBS och 100 µL av substratet TMB tillsattes i brunnarna. Efter åtta minuters inkubering avbröts reaktionen med 100 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Plattorna avlästes vid 450 nanometer med en fotometrisk avläsare för mikroplattor.

### **Statistiska analyser**

Resultaten från frågeformuläret fördes in i Excel och proportioner för de positiva och negativa grupperna beräknades för varje sjukdom samt för sjukdomarna totalt. Fisher's exact test användes med signifikansnivån  $\alpha = 0.05$  för att beräkna samband mellan sjukdomar och förekomst av antikroppar.

Beräkning av cut-off för varje assay beräknades genom att ta medianvärdet av 0-kalibratoren (x 20 replikat) + 4 SD. Signal-to-noise ratio beräknades genom att dividera medianen av de positiva proverna med medianen av de negativa kontrollerna.



## RESULTAT

### Sammanfattning av frågeformulär

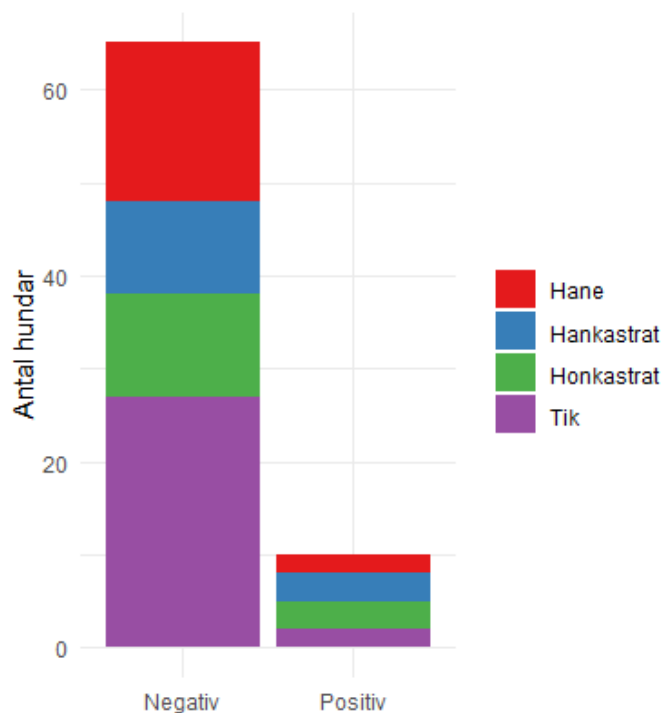
#### Svarsfrekvens

Utav de 107 hundar som provtogs år 2017 av Bergman *et al.* (2019b) kontaktades 95 hundars ägare per telefon eller e-post. Uppgifterna till sju hundar som avlivats imputerades baserat på journalerna från UDS. Fem hundägare gick inte att kontakta då fyra ägare saknade kontaktuppgifter och en hund som besökt UDS hade ett felaktigt journalnummer. Svarsfrekvensen för frågeformuläret var 71,6 % (68/95), där bortfallet bestod av hundar vars ägare inte svarade på e-post eller telefon. Totala svarsfrekvensen var 73,5 % (75/102). Tio av hundarna var positiva vid provtagning två år tidigare och bildade en positiv grupp, medan övriga 65 ingick i den negativa gruppen.

I studien ingick nio ägare med två hundar, två ägare med tre hundar, en ägare med fem hundar och en ägare med sex hundar, vilket gjorde att totalantalet hundägare som kontaktades var 73. Av de ägarna som svarat på frågeformuläret hade sju ägare två hundar, två ägare tre hundar och en ägare fem hundar.

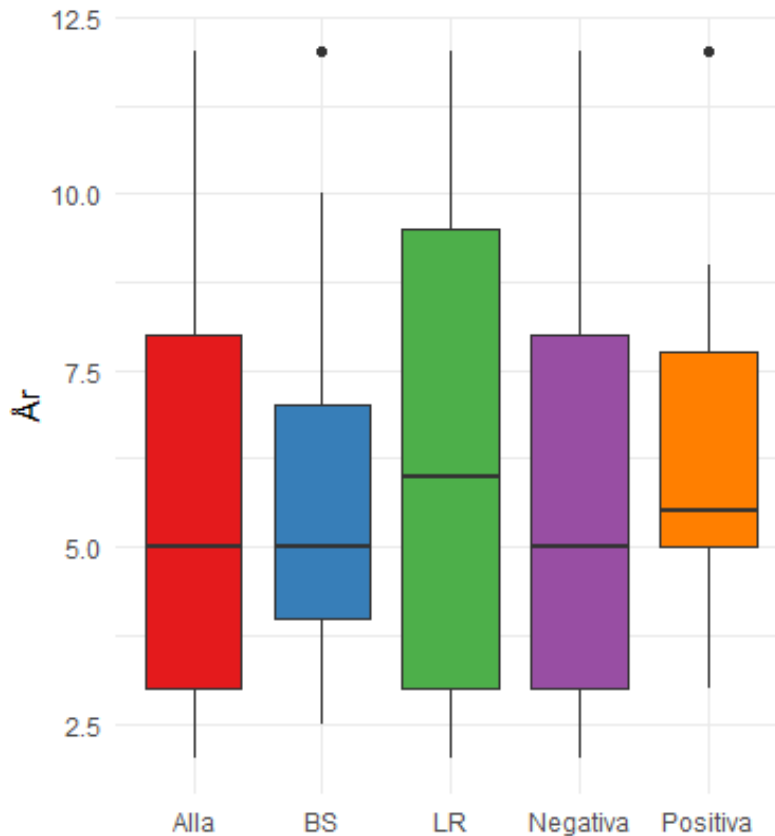
#### Ras, kön och ålder

Av de totalt 75 hundar som deltog i studien var 58,7 % (n = 44) av rasen berner sennenhund och 41,3 % (n = 31) av rasen labrador retriever. Könsfördelningen var lika mellan raserna, fördelningen mellan den positiva och negativa gruppen ses i figur 3. I den negativa gruppen hade 9,2 % (6/65) ändrat kastrationsstatus sedan studien av Bergman *et al.* (2019b), i den positiva gruppen var kastrationsstatus oförändrat för alla hundar.



Figur 3. Könsfördelning av hundarna i studien. Hundarna är indelade i två grupper baserat på om de testats positiva eller negativa för heterofila antikroppar år 2017 av Bergman *et al.* (2019b).

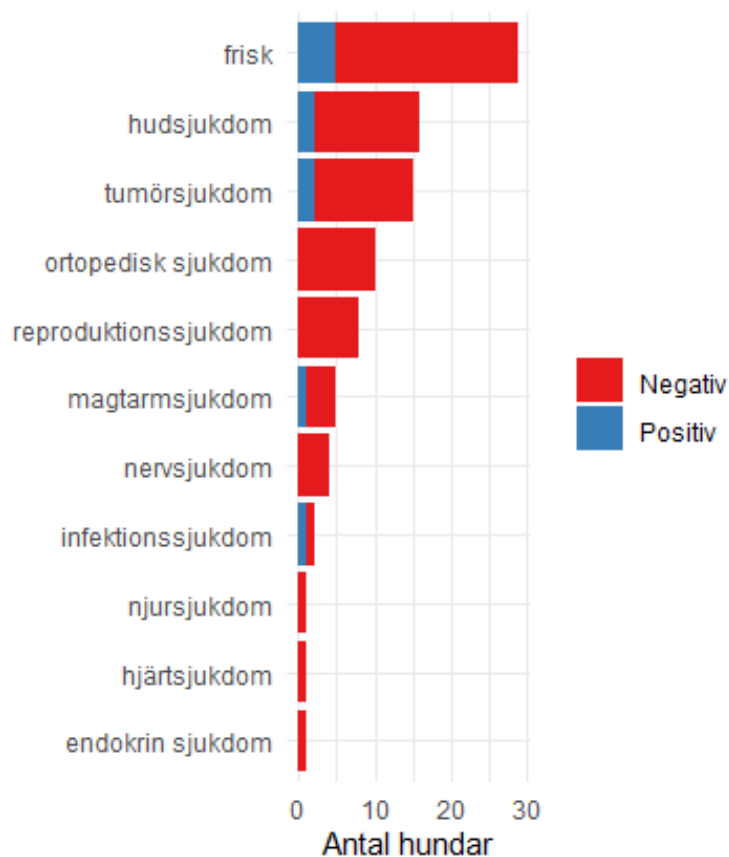
Medianåldern för hundarna var fem år, åldersfördelningen totalt samt för båda raserna och de positiva och negativa grupperna ses i figur 4. Totalt hade 22,7 % (17/75) av hundarna avlivats, elva berner sennenhundar med medianåldern åtta år och sex labradorer med medianåldern nio år. En hund i den positiva gruppen hade avlivats.



Figur 4. Åldersfördelning av hundarna i studien. Åldersfördelning för alla hundar samt indelning enligt ras, där BS = Berner sennenhund och LR = labrador retriever, samt grupperat enligt om hundarna testats positiva eller negativa för heterofila antikroppar år 2017 av Bergman et al. (2019b).

### Sjukdomar

Under de senaste två åren hade 61,3 % (46/75) av hundarna utretts för någon sjukdom, varav 23,9 % (18/75) hade fått fler än en diagnos och ingick i två eller fler sjukdomskategorier. Fördelningen av antalet diagnoser som ställts inom de olika sjukdomskategorierna redovisas i figur 5 för de positiva och negativa grupperna. En lika stor andel av båda raserna hade utretts för sjukdom efter år 2017. Den vanligaste sjukdomskategorin för berner sennenhund var tumörsjukdomar (22,7 %, 10/44), medan motsvarande för labrador retriever var ortopedisk sjukdom (25,8 %, 8/31).



Figur 5. Fördelningen av antalet diagnoser ställda inom olika sjukdomskategorier och friska individer. Hundarna är indelade i två grupper baserat på om de testats positiva eller negativa för heterofila antikroppar år 2017 av Bergman et al. (2019b).

#### *Immunsupprimerande läkemedel*

Immunsupprimerande läkemedel hade getts till 13,3 % (10/75) av alla hundar i studien, varav 12,3 % (8/65) av den negativa gruppen och 20 % (2/10) av den positiva gruppen. I den negativa gruppen hade en hund fått mykofenolsyra och en annan hund klorambucil, resten av hundarna som fått immunsupprimerande läkemedel hade fått kortison.

#### *Tumörsjukdomar*

Totalt hade 20 % (15/75) av hundarna diagnostiserats med en tumörsjukdom, 22,7 % (10/44) av berner sennenhundarna och 16,1 % (5/31) av labradorerna. Sju berner sennenhundar och två labradorer hade avlivats till följd av tumörsjukdomar.

#### *Mortalitet*

Mortaliteten för de olika sjukdomskategorierna för de senaste två åren var 60 % för tumörsjukdomar (9/15), 6,3 % för hudsjukdomar (1/16), 10 % för ortopediska sjukdomar (1/10), 22,2 % för reproduktionssjukdomar (2/9), 20 % för magtarmsjukdomar (1/5), 25 % för nervsjukdomar (1/4), 50 % för infektionssjukdomar (1/2) och 100 % för njursjukdomar (1/1). För endokrina sjukdomar (N = 1) och hjärtsjukdomar (N = 1) var mortaliteten 0 %.

### *Samband mellan sjukdom och heterofila antikroppar*

Mellan den positiva och negativa gruppen förekom ingen signifikant skillnad i förekomst eller avsaknad av sjukdom ( $p = 0,50$ ). Ingen signifikant skillnad i förekomst av sjukdom mellan grupperna förekom i de olika sjukdomskategorierna hudsjukdom ( $p = 1$ ), tumörsjukdom ( $p = 1$ ), ortopedisk sjukdom ( $p = 0,34$ ), reproduktionssjukdom ( $p = 0,59$ ), magtarmsjukdom ( $p = 0,52$ ), nervsjukdom ( $p = 1$ ), infektionssjukdom ( $p = 0,25$ ), njursjukdom ( $p = 1$ ), hjärtsjukdom ( $p = 1$ ) och endokrin sjukdom ( $p = 1$ ).

### **Positiva hundar**

Tio av de tolv hundar som testats positiva av Bergman *et al.* (2019b) deltog i studien. De positiva hundarnas ålder, kön och sjukdomsbeskrivning för denna och föregående studie redovisas i tabell 1.

Tabell 1. *Beskrivning av ras, ålder, kön och eventuell sjukdom före och efter provtagning år 2017 för hundarna som testats positiva för heterofila antikroppar av Bergman et al. (2019b). Vid hund-ID står B för berner sennenhund och L för labrador retriever. Avlivad markerad med asterisk (\*)*

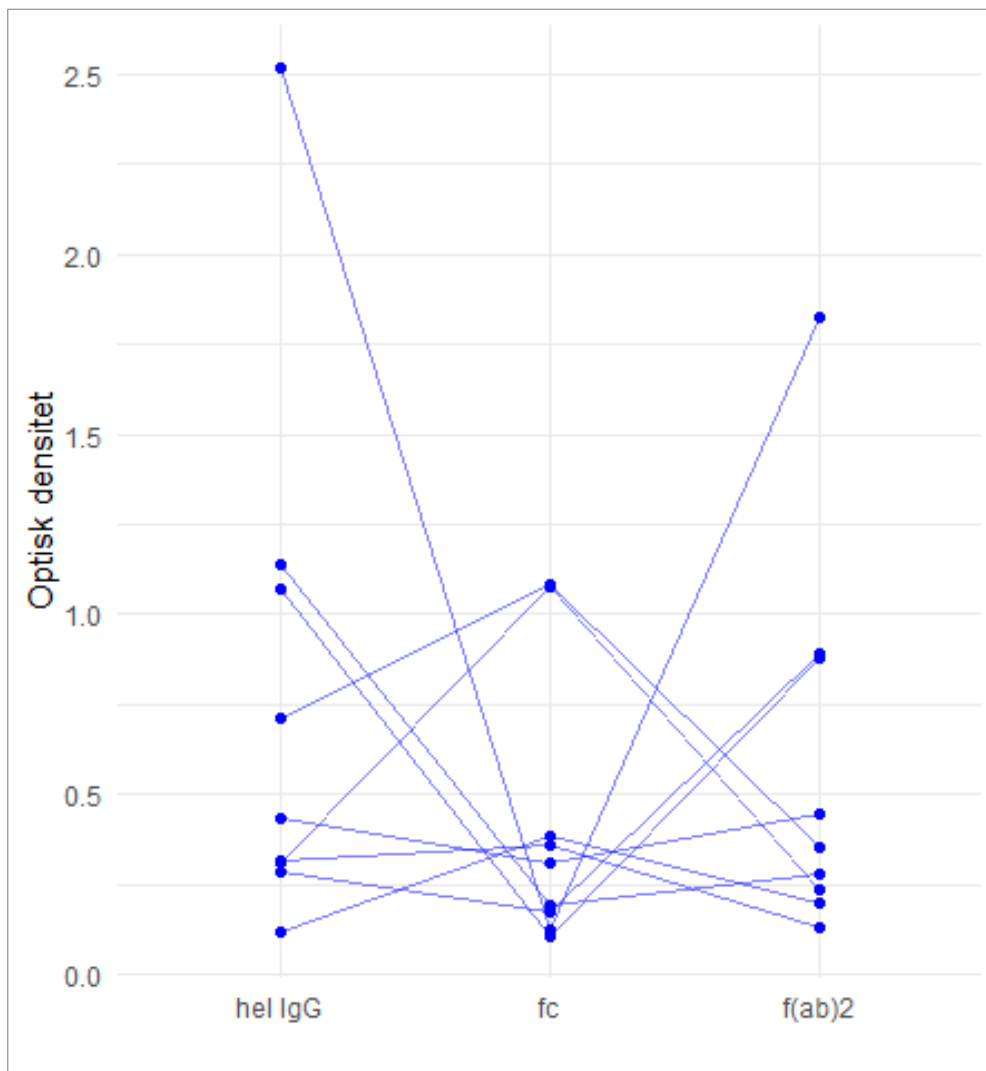
Hund-ID	Ålder (år)	Kön	Sjukdomsbeskrivning 2017 – 2019	Sjukdomsbeskrivning – 2017 (Bergman <i>et al.</i> , 2019b)
B1	9	Hankastrat	Adenom eller karcinom i lever, PLE (protein losing enteropathy)*	PLE
B5	8	Hane	Mastocytom	Mastocytom
B10	7	Honkastrat	Granulocytär anaplasmos, borrelios	Lipom
B19	3	Tik	Yt-pyodermi	-
B25	6	Hane	Misstänkt allergi med blåsor i munnen, erythem vid läppar, nos och pungen, tappat pigment på flera ställen	-
B9	12	Honkastrat	-	Korsbandsskada
L9	5	Hankastrat	-	Polyuri/polydipsi
B11	5	Honkastrat	-	-
B42	5	Hankastrat	-	-
B51	3	Tik	-	-

### Kontakt med möss

Nio av de tio positiva hundarna hade inte haft någon känd kontakt med möss, för den tionde hunden var det oklart om hunden haft kontakt med möss. Av de negativa hundarna hade 10,7 % (7/65) haft känd kontakt med möss.

### Analyser

Sex av de sju hundarna som var positiva i provtagningen av Bergman *et al.* (2019b) var positiva vid den uppföljande provtagningen. Tre hundar som innan varit negativa var positiva denna gång. Reaktionsmönster för de positiva hundarna presenteras i figur 6. Signal-to-noise ratio var 6,3 för helt mus-IgG, 6,82 för Fc-fragment och 6,55 för F(ab')<sub>2</sub>-fragment.



Figur 6. Reaktionsmönster för helt mus-IgG, Fc-fragment och F(ab')<sub>2</sub>-fragment av mus-IgG. Varje linje representerar en hund som testats positiv för en eller flera delar.

En jämförelse av vilka delar av musantikropparna de positiva individerna reagerade mot under provtagningarna till studien av Bergman *et al.* (2019b) samt till denna studie redovisas i tabell 2.

Tabell 2. *Reaktionsmönster för musantikroppar vid två provtagningar för hundarna som testats positiva i denna studie eller år 2017 av Bergman et al. (2019b)*

Hund-ID	2019	2017 (Bergman <i>et al.</i> , 2019b)
B5	Fc	Fc
B9	Hel IgG och Fc	Hel IgG
B10	Hel IgG	Hel IgG och F(ab') <sub>2</sub>
B11	Negativ	Hel IgG
B19	Hel IgG och F(ab') <sub>2</sub>	Hel IgG och F(ab') <sub>2</sub>
B24	F(ab') <sub>2</sub>	Negativ
B25	Hel IgG och F(ab') <sub>2</sub>	Hel IgG
B28	Fc	Negativ
B42	Hel IgG och F(ab') <sub>2</sub>	Hel IgG och F(ab') <sub>2</sub>
B44	Fc	Negativ

De nya positiva hundarnas ålder, kön och sjukdomsbeskrivning för denna och föregående studie redovisas i tabell 3. Endast en av de nya positiva hundarna hade haft kontakt med möss.

Tabell 3. *Beskrivning av ras, ålder, kön och eventuell sjukdom före och efter provtagning år 2017 för hundarna som testats positiva för heterofila antikroppar i denna studie men testades negativa år 2017 av Bergman et al. (2019b). Vid hund-ID står B för berner sennenhund*

Hund-ID	Ålder (år)	Kön	Sjukdomsbeskrivning 2017 – 2019	Sjukdomsbeskrivning – 2017 (Bergman <i>et al.</i> , 2019b)
B24	4	Tik	Yt-pyodermi	-
B28	9	Hane	Nybildning i tandköttet	-
B44	3	Tik	Onormalt löp och håla	-

## DISKUSSION

Det första syftet med studien var att följa upp hundarna som deltog i studien av Bergman *et al.* (2019b) för att se om det finns ett samband mellan heterofila antikroppar och klinisk sjukdom, framför allt i avseende på tumörsjukdomar och autoimmuna sjukdomar.

Svarsfrekvensen för frågeformuläret bedöms som god. Den vanligaste sjukdomskategorin för berner sennenhundar som deltog i studien var tumörsjukdomar, vilket stämmer överens med tidigare studier om sjukdomar hos rasen (Egenvall *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2010; Erich *et al.*, 2013; Klopfenstein *et al.*, 2016), dock var andelen insjuknade hundar inte lika hög vilket kan förklaras med att hundarna i denna studie inte var så gamla. Däremot hade ingen av hundarna i studien histiocytiskt sarkom och det fanns få övriga sjukdomar som är typiska för berner sennenhundar; frekvensen av ortopediska sjukdomar var relativt låg och ingen berner sennenhund hade en njursjukdom. Även detta kan påverkas av åldern på hundarna, samt av att enbart sjukdomar inom de två senaste åren efterfrågades, vilket gör att tidigare sjukdomar inte togs i beaktande. Ingen hund var diagnostiserad med en autoimmun sjukdom så som SLE eller reumatoid artrit, men en labrador retriever i den negativa gruppen var diagnostiserad med hypoadrenokorticism, vilket kan ha en autoimmun bakgrund (Van Lanen & Sande, 2014). En berner sennenhund i den positiva gruppen hade misstänkt allergi där hunden bland annat hade tappat pigment på flera ställen, vilket skulle kunna ha en autoimmun bakgrund (Tham *et al.*, 2019). Det låga antalet autoimmuna sjukdomar var förväntat då autoimmuna sjukdomar inte är vanligt förekommande hos berner sennenhund och de står endast för 1,3 % av dödsfallen inom rasen enligt Klopfenstein *et al.* (2016).

Materialet i denna studie visade inget samband mellan förekomst av heterofila antikroppar och klinisk sjukdom eller avsaknad av det. Dock förekommer det några begränsningar i studien på grund av att materialet var litet och framför allt antalet positiva hundar var lågt. Endast två hundraser var med i studien, vilket gör att resultaten inte fullständigt kan sträckas över hela hundpopulationen. Sjukdomarna delades in i kategorier enligt information från djurägarna, vilket gör att all information om sjukdomarna inte nödvändigtvis skrevs i formuläret, exempelvis en veterinärmedicinskt korrekt diagnos. I kategorierna förekom systemiska och lokala sjukdomar som inte är direkt jämförbara, exempelvis fanns det både benigna lipom och malignt lymfom i kategorin tumörsjukdomar. Kategorierna gick dock inte att dela in mer exakt på grund av avsaknad av information samt få hundar i studien. Grupperingen av sjukdomarna kunde gjorts på andra sätt än i denna studie och resultaten skulle eventuellt kunna se olika ut då. Flera studier behövs på ett större antal hundar för att säkert kunna säga att det inte finns någon koppling mellan sjukdom och förekomst av heterofila antikroppar.

Varför fler berner sennenhundar har heterofila antikroppar jämfört med labrador retriever skulle kunna bero på en hög immunreaktivitet. Berner sennenhundar har visats ha en hög koncentration av IgA jämfört med flera andra raser inklusive labrador retriever (Olsson *et al.*, 2014). De vanligaste typerna av tumörer hos rasen, histiocytiskt sarkom och malignt lymfom, har sitt ursprung i immunceller vilket skulle kunna ha en koppling till hög immunreaktivitet. På humansidan finns forskning om att histiocytiskt sarkom skulle kunna transdifferentiera från B-cellslymfom (Wang *et al.*, 2010), vilket kan tyda på ett gemensamt ursprung för de vanligaste tumörerna hos berner sennenhund.

Det andra syftet med studien var att göra en uppföljande provtagning på de hundar som testats positiva för två år sedan för att se om de heterofila antikropparna var persisterande och hade lika reaktionsmönster, samtidigt som prover från hundar som testats negativa analyserades för eventuell uppkomst av heterofila antikroppar.

Ursprunget till heterofila antikroppar hos hund är fortfarande oklart. Att de flesta tidigare positiva hundarna var positiva även denna gång tyder på att det är något som håller kvar de heterofila antikropparna eller att minnes-B-cellerna producerar mer av dem, vilket i sin tur kräver en upprepad exponering (Vidarsson *et al.*, 2014). Detta talar mot att de skulle uppstå efter kontakt med möss eller vid andra tillfälliga kontakter. En fjärdedel av de tidigare negativa hundarna som provtogs hade utvecklat heterofila antikroppar. Att alla de nya positiva individerna var berner sennenhundar stärker resultatet att heterofila antikroppar är vanligt förekommande hos rasen (Bergman *et al.*, 2019b). Dock provtogs få labradorer i denna studien vilket gör det svårt att jämföra mellan raserna. Uppkomsten av anti-musantikroppar kan ske iatrogen, men även icke-iatrogena anti-djurantikroppar finns beskrivet av Berglund och Holmberg (1989). Inga kända iatrogena källor för anti-musantikroppar hos hund finns beskrivet och därför frågades ägarna om hundarna hade haft kontakt med möss. Kontakt med möss kan enligt detta material inte förklara uppkomsten av heterofila antikroppar, vilket gör det mer troligt att det kan vara frågan om autoantikroppar. För att undersöka det behöver vidare analyser göras.

Reaktionsmönstret för de heterofila antikropparna var lika som vid studien av Bergman *et al.* (2019b), där de flesta individerna reagerade mest med antingen Fc-delen eller med både helt IgG och F(ab')<sub>2</sub>-delen av mus-IgG. Val av cut off-värde skulle eventuellt kunna förklara skillnader i reaktionsmönster för individer under de två provtagningarna. Det fanns inga tecken på epitope spreading då ingen av hundarna hade ändrat reaktionsmönster från Fc till F(ab')<sub>2</sub> eller tvärtom. En av de tidigare positiva hundarna testades negativ denna gång, vilket tyder på att heterofila antikroppar inte alla gånger är persisterande utan kan även vara transienta. Att heterofila antikroppar ofta är persisterande är viktigt att ta hänsyn till vid eventuella immunanalyser som görs på hundar som har heterofila antikroppar, eftersom de kan orsaka interferens och felaktiga provresultat på laboratoriet, vilket i värsta fall kan leda till felaktiga behandlingar.

## KONKLUSION

I denna studie kunde inget samband hittas mellan klinisk sjukdom och förekomst av heterofila antikroppar. Kontakt med möss kunde inte förklara förekomsten av heterofila antikroppar. Uppföljande provtagning visade att heterofila antikroppar inte sällan är persisterande under två års tid och att reaktionsmönstret mot olika delar av mus-IgG är i stort sett oförändrat under denna tid. Fler studier behövs på ett större antal hundar av flera raser för att säkerställa att det inte finns en koppling mellan heterofila antikroppar och sjukdom, samt för att avgöra om de heterofila antikropparna är autoantikroppar.



## POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Antikroppar är proteiner som tillhör kroppens immunförsvar. Deras funktion är bland annat att känna igen och binda till kroppsfrämmande ämnen som kallas antigen. Så kallade heterofila antikroppar har förmågan att binda till andra arters antikroppar och kan därmed bland annat ge upphov till störningar i laboratorieanalyser som görs med immundiagnostik, till dessa tillhör exempelvis hormonanalyser.

Ursprunget till heterofila antikroppar är inte alltid känt. Heterofila antikroppar kan bildas bland annat genom exponering för andra arters antikroppar, de är oftast mot möss och kallas då antimusantikroppar. En annan grupp av heterofila antikroppar är reumatoida faktorer som bildas i samband med autoimmuna sjukdomar så som reumatoid artrit, där kroppen attackerar sina egna vävnader. Hos människor har heterofila antikroppar visats ha samband med vissa tumörsjukdomar och autoimmuna sjukdomar. För hund finns endast få studier om ämnet, men en studie har visat att dessa antikroppar finns i en högre utsträckning hos berner sennenhund jämfört med labrador retriever. Berner sennenhund är en schweizisk gårdshund som numera framför allt används som familjehund. Rasen har en låg medellivslängd på cirka sju år, vilket i stor utsträckning beror på att många hundar insjuknar i tumörsjukdomar.

Första syftet med denna studie var att undersöka om det finns ett samband mellan heterofila antikroppar och klinisk sjukdom hos hund, samt om kontakt med möss skulle kunna förklara uppkomsten av de heterofila antikropparna. Studien gjordes som en uppföljning av 75 hundar som provtogs för en studie två år tidigare. Av hundarna var 44 av rasen berner sennenhund och 31 av rasen labrador retriever. Tio av hundarna hade i den tidigare studien påvisats ha heterofila antikroppar. Ägarna till hundarna svarade på ett frågeformulär per telefon eller e-post, och för sju hundar som avlivats på Universitetsdjursjukhuset i Uppsala användes uppgifterna som fanns i journalerna. I frågeformuläret ställdes frågor om eventuella sjukdomar och behandlingar, eventuell dödsorsak och om hunden haft kontakt med möss. I materialet i studien kunde inget samband påvisas mellan förekomst av heterofila antikroppar och sjukdom. Kontakt med möss kunde inte förklara ursprunget till heterofila antikroppar och därför finns en misstanke om att de heterofila antikropparna skulle kunna vara autoantikroppar som kroppen bildar mot sina egna vävnader.

Andra syftet med studien var att utreda om hundar som tidigare haft heterofila antikroppar i studien som gjordes år 2017 fortfarande hade dem kvar, eller om hundar som inte haft heterofila antikroppar hade utvecklat dem under två års tid. Blodprov togs av 22 hundar varav sju hade haft heterofila antikroppar innan. Proverna analyserades för förekomst av heterofila antikroppar eller delar av dem. Alla utom en hund som för två år sedan haft heterofila antikroppar hade det även nu, men även tre nya berner sennenhundar hade utvecklat heterofila antikroppar. Reaktionsmönstret för antikropparna, d.v.s. vilken del antikropparna binder till var likt det i förra studien, vilket visar att heterofila antikroppar inte ändras under åren.

I denna studie kunde inget samband påvisas mellan sjukdom och förekomst av heterofila antikroppar, men eftersom antalet hundar i studien var lågt behövs fler studier på ett större antal hundar för att säkerställa att det inte finns någon koppling mellan dem. Eftersom det endast finns få studier om heterofila antikroppar hos hund behövs även studier på flera raser. För att

utreda om heterofila antikroppar hos hund är autoantikroppar kan analyser göras med hjälp av hundantikroppar. Studien visade att heterofila antikroppar ofta stannar kvar i två års tid, vilket är viktigt att ta hänsyn till i laboratoriearbete eftersom de heterofila antikropparna kan ge upphov till felaktiga resultat vid immunanalyser.

## REFERENSER

- Abadie, J., Hedan, B., Cadieu, E., De Brito, C., Devauchelle, P., Bourgain, C., Parker, H. G., Vaysse, A., Margaritte-Jeannin, P., Galibert, F., Ostrander, E. A. & Andre, C. (2009). Epidemiology, pathology, and genetics of histiocytic sarcoma in the Bernese Mountain Dog breed. *Journal of Heredity*, 100:S19-S27.
- Arbuckle, M. R., McClain, M. T., Rubertone, M. V., Scofield, R. H., Dennis, G. J., James, J. A. & Harley, J. B. (2003). Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medicine*, 349(16):1526-1533.
- Berglund, L. & Holmberg, N. G. (1989). Heterophilic antibodies against rabbit serum causing falsely elevated gonadotropin-levels. *Acta Obstetricia Gynecologica Scandinavica*, 68:377-378.
- Bergman, D., Larsson, A., Hansson-Hamlin, H., Ahlen, E. & Holst, B. S. (2019b). Characterization of canine anti-mouse antibodies highlights that multiple strategies are needed to combat immune-assay interference. *Scientific Reports*, 9:14521.
- Bergman, D., Larsson, A., Hansson-Hamlin, H. & Holst, B. S. (2019a). Investigation of interference from canine anti-mouse antibodies in hormone immunoassays. *Veterinary Clinical Pathology*, 48:59-69.
- Bergman, D., Larsson, A., Hansson-Hamlin, H., Svensson, A. & Holst, B. S. (2018). Prevalence of interfering antibodies in dogs and cats evaluated using a species-independent assay. *Veterinary Clinical Pathology*, 47(2):205-212.
- Bjerner, J., Olsen, K. H., Borner, O. P. & Nustad, K. (2005). Human heterophilic antibodies display specificity for murine IgG subclasses. *Clinical Biochemistry*, 38(5):465-472.
- Bolstad, N., Warren, D. J. & Nustad, K. (2013). Heterophilic antibody interference in immunometric assays. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27:647-661.
- Bonnett, B. N., Egenvall, A., Hedhammar, A. & Olson, P. (2005). Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 46(3):105-120.
- Brezski, R. J. & Jordan, R. E. (2010). Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: an evasion tactic against host immunity? *Mabs*, 2(3):212-220.
- Cappy, H., Pigny, P., Leroy-Billiard, M., Dewailly, D. & Catteau-Jonard, S. (2013). Falsely elevated serum antimullerian hormone level in a context of heterophilic interference. *Fertility and Sterility*, 99(6):1729-1732.
- Chapman, C., Murray, A., Chakrabarti, J., Thorpe, A., Woolston, C., Sahin, U., Barnes, A. & Robertson, J. (2007). Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis. *Annals of Oncology*, 18(5):868-873.
- Chapman, C. J., Murray, A., McElveen, J. E., Sahin, U., Luxemburger, U., Tuereci, O., Wiewrodt, R., Barnes, A. C. & Robertson, J. F. (2008). Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure. *Thorax*, 63(3):228-233.
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Hedhammar, A. & Olson, P. (2005). Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: II. Breed-specific age and survival patterns and relative risk for causes of death. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 46(3):121-136.

- Egenvall, A., Bonnett, B. N., Shoukri, M., Olson, P., Hedhammar, A. & Dohoo, I. (2000). Age pattern of mortality in eight breeds of insured dogs in Sweden. *Preventive Veterinary Medicine*, 46(1):1-14.
- Erich, S. A., Rutteman, G. R. & Teske, E. (2013). Causes of death and the impact of histiocytic sarcoma on the life expectancy of the Dutch population of Bernese Mountain Dogs and Flat-Coated Retrievers. *Veterinary Journal*, 198(3):678-683.
- Fleming, J. M., Creevy, K. E. & Promislow, D. E. L. (2011). Mortality in North American dogs from 1984 to 2004: An Investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2):187-198.
- Hartmann, P., Stock, K. F. & Distl, O. (2011). Life expectancy and causes of death in Bernese Mountain Dogs. *Praktische Tierarzt*, 92(6):472-478.
- Kazmierczak, S. C., Catrou, P. G. & Briley, K. P. (2000). Transient nature of interference effects from heterophile antibodies: Examples of interference with cardiac marker measurements. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38(1):33-39.
- Klopfenstein, M., Howard, J., Rossetti, M. & Geissbühler, U. (2016). Life expectancy and causes of death in Bernese Mountain Dogs in Switzerland. *BMC Veterinary Research*, 12:153.
- Koshida, S., Asanuma, K., Kuribayashi, K., Goto, M., Tsuji, N., Kobayashi, D., Tanaka, M. & Watanabe, N. (2010). Prevalence of human anti-mouse antibodies (HAMAs) in routine examinations. *Clinica Chimica Acta*, 411(5-6):391-394.
- Kricka, L. J. (1999). Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clinical Chemistry*, 45(7):942-956.
- Levinson, S. S. & Miller, J. J. (2002). Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. *Clinica Chimica Acta*, 325(1-2):1-15.
- Miller, J. J. (2004). Interference in immunoassays: Avoiding erroneous results. *Clinical Laboratory International*. 28:14-17.
- Nielen, M. M. J., van Schaardenburg, D., Reesink, H. W., van de Stadt, R. J., van der Horst-Bruinsma, I. E., de Koning, M., Habibuw, M. R., Vandenbroucke, J. P. & Dijkmans, B. A. C. (2004). Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis - A study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and Rheumatism*, 50(2):380-386.
- Nielsen, L., Andreasen, S. N., Andersen, S. D. & Kristensen, A. T. (2010). Malignant histiocytosis and other causes of death in Bernese Mountain Dogs in Denmark. *Veterinary Record*, 166(7):199-202.
- Nishimura, K., Sugiyama, D., Kogata, Y., Tsuji, G., Nakazawa, T., Kawano, S., Saigo, K., Morinobu, A., Koshihara, M., Kuntz, K. M., Kamae, I. & Kumagai, S. (2007). Meta-analysis: Diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Annals of Internal Medicine*, 146(11):797-808.
- Olsson, M., Frankowiack, M., Tengvall, K., Roosje, P., Fall, T., Ivansson, E., Bergvall, K., Hansson-Hamlin, H., Sundberg, K., Hedhammar, A., Lindblad-Toh, K. & Hammarstrom, L. (2014). The dog as a genetic model for immunoglobulin A (IgA) deficiency: Identification of several breeds with low serum IgA concentrations. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 160(3-4):255-259.
- Padgett, G. A., Madewell, B. R., Keller, E. T., Todar, L. & Packard, M. (1995). Inheritance of histiocytosis in Bernese Mountain Dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 36(3):93-98.

- Preissner, C. M., Dodge, L. A., O'Kane, D. J., Singh, R. J. & Grebe, S. K. G. (2005). Prevalence of heterophilic antibody interference in eight automated tumor marker immunoassays. *Clinical Chemistry*, 51(1):208-210.
- Rotmensch, S. & Cole, L. A. (2000). False diagnosis and needless therapy of presumed malignant disease in women with false-positive human chorionic gonadotropin concentrations. *Lancet*, 355(9205):712-715.
- Ruple, A. & Morley, P. S. (2016). Risk factors associated with development of histiocytic sarcoma in Bernese Mountain Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30:1197–1203.
- Solter, P. F., Oyama, M. A. & Sisson, D. D. (2008). Canine heterophilic antibodies as a source of false-positive B-type natriuretic peptide sandwich ELISA results. *Veterinary Clinical Pathology*, 37:86–95.
- Svenska kennelklubben (2018-03-15). *Rasspecifik avelsstrategi RAS för Berner Sennen*. <https://www.skk.se/globalassets/dokument/rasdokument/ras-berner-sennenhund.pdf> [2019-11-08].
- Tan, H. T., Low, J., Lim, S. G. & Chung, M. C. M. (2009). Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *The FEBS Journal*, 276: 6880-6904.
- Terness, P., Kirschfink, M., Navolan, D., Dufter, C., Kohl, I., Opelz, G. & Roelcke, D. (1995). Striking inverse correlation between IgG anti-F(ab')<sub>2</sub> and autoantibody production in patients with cold agglutination. *Blood*, 85(2):548-551.
- Tham, H. L., Linder, K. E. & Olivry, T. (2019). Autoimmune diseases affecting skin melanocytes in dogs, cats and horses: vitiligo and the uveodermatological syndrome: a comprehensive review. *BMC Veterinary Research*, 15:17.
- van de Stadt, L. A., de Koning, M. H. M. T., van de Stadt, R. J., Wolbink, G., Dijkmans, B. A. C., Hamann, D. & van Schaardenburg, D. (2011). Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 63(11):3226-3233.
- Van Lanen, K. & Sande, A. (2014). Canine hypoadrenocorticism: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Topics in Companion Animal Medicine*, 29(4):88-95.
- Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5:1-17.
- Wang, E. D., Hutchinson, C. B., Huang, Q., Sebastian, S., Rehder, C., Kanaly, A., Moore, J. & Dato, M. (2010). Histiocytic sarcoma arising in indolent small B-cell lymphoma: report of two cases with molecular/genetic evidence suggestive of a 'transdifferentiation' during the clonal evolution. *Leukemia & Lymphoma*, 51(5):802-812.