



P-glykoprotein-mutationen

ABCB1-1 Δ hos collies i Sverige

Alice Gustafsson

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Uppsala 2024



P-glykoprotein-mutationen - ABCB1-1 Δ hos collies i Sverige

The P-glycoprotein mutation - ABCB1-1 Δ among collies in Sweden

Alice Gustafsson

Handledare:	Carl Ekstrand, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Bitr handledare:	Minerva Löwgren, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Examinator:	Eva Tydén, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	Avancerad nivå, A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX1003
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2024
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
Nyckelord:	P-glykoprotein, ABCB1, ABCB1-1 Δ , MDR1, collie

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Veterinärprogrammet

Sammanfattning

P-glykoprotein är ett effluxprotein som uttrycks på olika luminala ytor i flera organ, bland annat tarmväggen, njurtubuli, i leverns gallgångar samt i blodhjärnbarriären. Proteinet kodas av genen ABCB1 hos hund. En mutation i genen som orsakar en 4-baspars deletion finns hos olika vallhundsraser, däribland collie, och ger ett icke-funktionellt P-glykoprotein. Detta kan orsaka allvarliga läkemedelsbiverkningar, där det mest kända exemplet är ivermektin som ger neurologiska symptom hos collies med mutationen, så som kramper, blindhet och koma. Syftet med denna studie var att undersöka förekomsten av mutationen, som brukar kallas MDR1 eller ABCB1-1 Δ , hos collies i Sverige då detta inte undersökts tidigare. Ytterligare en aspekt som undersöktes var om det fanns någon skillnad i förekomst av mutationen mellan långhårig collie och korthårig collie.

DNA samlades in genom kindsvabbprov hos de 125 hundar som deltog, varav 80 långhåriga collies och 45 korthåriga collies. Mutationen analyserades genom en PCR. Sammanlagt var det 48 % heterozygota hundar, 20,8 % av vildtyp och 31,2 % homozygota för ABCB1-1 Δ . Av de långhåriga hundarna var 50 % heterozygota, 25 % av vildtyp och 25 % homozygota för ABCB1-1 Δ , medan hos de korthåriga hundarna var 44,4 % heterozygota, 13,3 % av vildtyp och 42,2 % homozygota för ABCB1-1 Δ . Skillnaden mellan hårlagen visades statistiskt signifikant genom ett chitvå-test. Resultatet för de långhåriga hundarna stämde överens med tidigare studier i andra delar av världen, medan resultatet för de korthåriga hundarna var unikt då ingen tidigare studerat förekomsten hos enbart de korthåriga hundarna i denna omfattning.

ABCB1-1 Δ nedärvs autosomt recessivt, vilket innebär att prevalensen kan minskas genom att genomföra olika avelsåtgärder. Korthårig collie, där förekomsten var högst, är en relativt numerärt liten ras och således kan det finnas andra faktorer som även behöver beaktas vid avelsurvalet. Att rekommendera genotypning innan avel kan dock vara ett sätt för uppfödare och potentiella valpköpare att göra medvetna val.

Nyckelord: P-glykoprotein, ABCB1, ABCB1-1 Δ , MDR1, collie

Abstract

P-glycoprotein is an effluxprotein that is expressed on different luminal surfaces in the body, such as the gut walls, renal tubuli, the canaliculi in the liver and the blood-brain-barrier. The protein is coded by the gene called ABCB1 in dogs. A mutation in the gene that causes a 4-base pair deletion exists in herding breeds, amongst others the collie, that causes a non-functional P-glycoprotein. This can cause serious pharmaceutical side effects, where the most known example is ivermectin which causes neurological symptoms in collies with the mutation, such as spasms, blindness, and coma. The purpose of this study was to determine the occurrence of the mutation, which is commonly called MDR1 or ABCB1-1 Δ , in collies in Sweden because it has previously not been studied. Another aspect that was studied were differences in occurrence of the mutation between the rough collie and the smooth collie.

DNA were collected by a buccal swab from the 125 dogs that participated, of which 80 were rough collies and 45 were smooth collies. The mutation was analysed through a PCR. There were 48 % heterozygous dogs in total, 20,8 % wildtype and 31,2 % homozygous for ABCB1-1 Δ . Out of the rough collies there were 50 % heterozygous, 25 % wildtype and 25 % homozygous for ABCB1-1 Δ , while there were 44,4 % heterozygous, 13,3 % wildtype and 42,2 % homozygous for ABCB1-1 Δ among the smooth collies. The difference between the coats were proved statistically significant through a chi-squared-test. The results of the rough collie was in line with previous studies performed in other parts of the world, while the results of the smooth collie were unique in the sense that the occurrence among the smooth collies has not previously been studied in this extent.

ABCB1-1 Δ is an autosomal recessive disease, which means the prevalence of the mutation can be reduced by different breeding measures. The smooth collie, which had the highest prevalence, is a relatively uncommon breed in Sweden and there could be other factors that breeders need to consider before determining which dogs to breed. Recommending genotyping before breeding could be an option so that breeders and potential buyers can make knowledgeable choices.

Keywords: P-glycoprotein, ABCB1, ABCB1-1 Δ , MDR1, collie

Innehållsförteckning

1. Introduktion	9
2. Litteraturoversikt.....	10
2.1 P-glykoprotein och <i>ABCB1</i> -genen	10
2.2 Klinisk betydelse av polymorfismen	13
2.3 Förekomst hos collie	15
3. Material och metoder	16
3.1 Provtagningsteknik.....	16
3.2 Insamling av provmaterial	16
3.3 Laboratorieanalyser	17
3.4 Statistiska analyser	22
4. Resultat	23
4.1 Studiematerial	23
4.2 Laboratorieresultat	23
4.2.1 DNA-koncentrationer	23
4.2.2 PCR och sekvensering	24
4.3 Statistiska analyser	24
5. Diskussion	26
5.1 Förekomst av <i>ABCB1-1Δ</i>	26
5.2 Avel	27
5.3 Stickprov och studiepopulation	28
5.4 Behandlingsalternativ.....	29
5.5 Konklusion.....	30
Referenser.....	31
Populärvetenskaplig sammanfattning	33
Tack	35
Bilaga 1.....	36
Bilaga 2.....	39

1. Introduktion

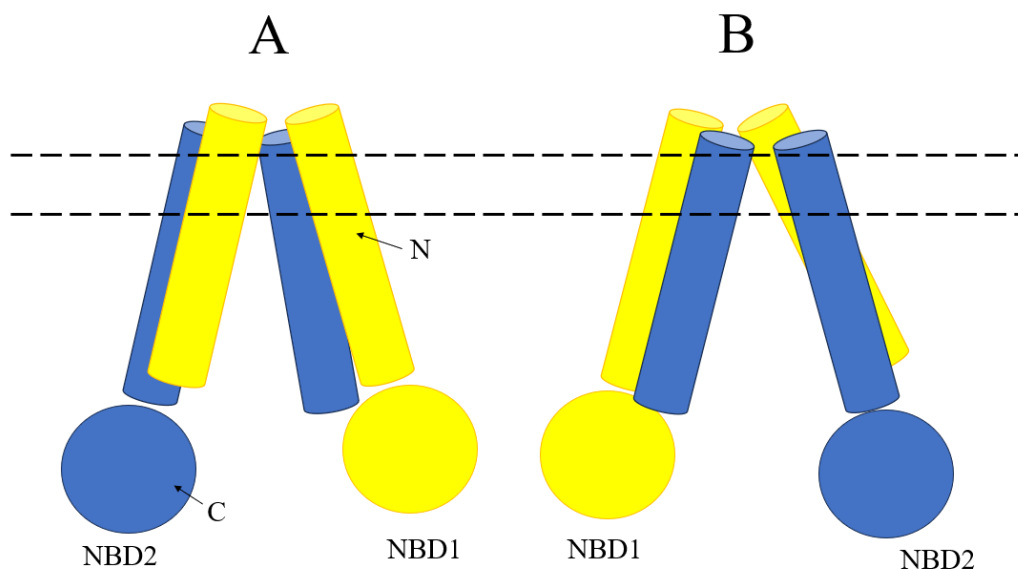
Under 1980-talet upptäcktes det att både korthårig och långhårig collie kunde få neurologiska biverkningar då de medicineras med ivermectin (Paul *et al.* 1987). År 2001 upptäcktes genmutationen som var orsaken bakom denna känslighet (Mealey *et al.* 2001). Då mutationen orsakade känslighet och biverkningar mot flera olika läkemedel kallades den *Multidrug Resistance* (MDR1). Numera kallas den dock ABCB1-1 Δ , och är en 4 baspars-deletion i genen ABCB1 (Mealey *et al.* 2023). Denna deletion orsakar ett icke-funktionellt P-glykoprotein, som är ett viktigt transportprotein i ett flertal olika organsystem. Sedan upptäckten av genmutationen har det rekommenderats att genotypa collies före medicinering med P-glykoprotein-substrat (Beckers *et al.* 2022).

Flera olika studier har genomförts i olika delar av världen där prevalensen av ABCB1-1 Δ har undersökts hos collie. Syftet med denna studie var att undersöka förekomsten av mutationen i den svenska populationen av collies. Studien ämnade även undersöka om det fanns någon skillnad i förekomst av mutationen mellan långhårig collie och korthårig collie i Sverige. Det är viktigt att veta förekomsten av mutationen, framför allt för hundar som är homozygota för ABCB1-1 Δ , då medicinering med P-glykoprotein-substrat kan leda till allvarliga biverkningar och död (Dekel *et al.* 2017). Ett vanligt exempel på detta är medicinering med ivermectin mot rävska. Den rekommenderade dosen är 300–600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, men för en homozygot hund kommer akut neurotoxicitet uppträda vid doser $>100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Beckers *et al.* 2022). Om veterinärer är medvetna om mutationen hos patienten kan risken för biverkningar minskas och chansen för en lyckad behandling öka (Martinez *et al.* 2008).

2. Litteraturoversikt

2.1 P-glykoprotein och *ABCB1*-genen

P-glykoprotein (P-gp) är ett effluxprotein och membrantransportprotein som förekommer i flera olika vävnader (Mealey *et al.* 2023). Det uttrycks på luminala ytor så som endotel i kapillärer i hjärnan, tarmväggar, gallgångar, och njurtubuli. Proteinet har en skyddande funktion då det förhindrar xenobiotika från att ta sig över blodhjärnbarriären, minskar upptag från tarmen och ökar utsöndring till gallan och urinen (Gramer *et al.* 2011). P-gp har en särskiljande funktion gentemot andra transportproteiner då den kan binda till ett mycket stort antal olika substrat (Mealey *et al.* 2023). Det har flera överlappande bindningsplatser där molekyler av olika storlek och form kan binda in (se *figur 1*). Detta möjliggör att ett stort spektrum av olika substrat kan transporteras av P-gp.



*Figur 1. P-gps molekylärstruktur. A visar framsidan och B visar baksidan. De två halvorna är färglagda i gult respektive blått. Inom det streckade området finns 12 transmembran-domäner. Nukleotid Bindnings Domäner (NBD) är markerade. Figur av författaren inspirerad av Aller *et al.* 2009.*

P-gp är ett av proteinerna i *ATP-binding cassette* (ABC), vilket är den största och enligt Martinez *et al.* (2008) den viktigaste superfamiljen när det kommer till membrantransportprotein. P-gp använder ATP för att driva transport av olika molekyler över cellmembran. Det är ett stort protein på 170 kDa som består av två halvvar där varje halva innehåller sex transmembran-segment samt en intracellulär ATP-bindningsplats. Proteinet, som är uppbyggt av 1280 aminosyror, transporterar intracellulära substanser till det extracellulära rummet (Mealey 2004).

P-gp påverkar vävnadskoncentrationen av både läkemedel samt andra substanser då det är ett effluxprotein. Vävnader där polymorfism av P-gp påverkar säkerheten och funktionaliteten av olika läkemedel är exempelvis tarm, njure, lever och hjärna. I tarmen uttrycks P-gp på den luminala ytan och kan där minska upptaget av olika P-gp-substrat genom att transportera tillbaka dem ut i tarmlumen. Exempel på detta är biotillgängligheten för paclitaxel som har visats vara 11 % hos vildtyps-möss, medan den är 35 % hos MDR1-knockout-möss. Det finns liknande skillnader i oral biotillgänglighet hos andra P-gp substrat (Martinez *et al.* 2008).

I njuren och levern kan P-gp påverka clearance för olika substanser. Ett exempel på detta är samtidig administrering av cimetidin och itraconazol, vilket leder till en signifikant minskning av renal clearance av cimetidin hos hundar med ABCB1-1Δ. I levern uttrycks P-gp på hepatocyternas canaliculära membran, och proteinets främsta uppgift är att assistera vid utsöndringen av hydrofoba metaboliter till gallan. Om hunden är bärare av ABCB1-1Δ är den oförmögen att utsöndra P-gp-ligander till gallan (Martinez *et al.* 2008). Exempel på detta är läkemedlet galliprant som har 71 % lägre clearance till gallan hos hundar som är homozygota för ABCB1-1Δ jämfört med vildtyps-hundar (Mealey *et al.* 2023). Även systemisk akut inflammation kan minska den P-gp-medierade utsöndringen, till exempel vid reumatoid artrit (Martinez *et al.* 2008).

I hjärnan uttrycks P-gp framför allt på endotelceller i blod-hjärn-barriären (BBB), men även i olika interstitieceller där funktionen ännu är oklar. P-gp är det viktigaste effluxproteinet i BBB för en rad olika substanser, bland annat metadon, verapamil och kinidin. Det samverkar även med andra transportproteiner för att förhindra att substanser så som ivermectin, doxorubicin och digoxin tar sig in i hjärnan. Den vanligaste biverkningen som hundar med ABCB1-1Δ uppvisar är olika neurologiska biverkningar. Detta orsakas troligen av att läkemedlet tar sig över BBB då P-gp inte kan utföra sin normala funktion i denna, men även av en större systemisk koncentration orsakat av det ökade upptaget i tarmen och en minskad clearance till urin och galla. Andra biverkningar kan också uppstå och beror på vilka receptorer det specifika läkemedlet interagerar med. Benmärgsdepression och gastro-

intestinala störningar är exempel på biverkningar som finns dokumenterat i samband med ABCB1-1Δ (Mealey *et al.* 2023)

Den gen som orsakar polymorfism av P-glykoprotein hos collies är ABCB1, som nedärvs autosomt recessivt (Silvestro *et al.* 2019; Beckers *et al.* 2022). *Figur 2* visar resultatet av olika kombinationer av föräldrar. Hos hundar har denna mutation fått namnet ABCB1-1Δ (Mealey *et al.* 2023). Mutationen är en frameshift-mutation som orsakar ett felaktigt stopp-kodon vilket leder till ett icke-funktionellt förkortat P-gp om hunden är homozygot. Även heterozygota hundar uppvisar ökad känslighet för de läkemedel som interagerar med P-gp, men får inte lika kraftiga biverkningar som homozygoter. Exempel på sådana biverkningar inkluderar kramper, ataxi, koma, letargi, mydriasis eller blindhet (Beckers *et al.* 2022).

		Förälder 2		
		Vildtyp	Heterozygot	Homozygot
Förälder 1	Vildtyp	100 % vildtyp	50 % vildtyp 50 % heterozygot	100 % heterozygot
	Heterozygot	50 % vildtyp 50 % heterozygot	25 % vildtyp 50 % heterozygot 25 % homozygot	50 % heterozygot 50 % homozygot
	Homozygot	100 % heterozygot	50 % heterozygot 50 % homozygot	100 % homozygot

Figur 2. Arvbarheten av ABCB1-1Δ. Föräldrarna ses i mörkblått och den eventuella avkomman i ljusblått.

Sekvensen för ABCB1-1Δ överensstämmer till 99,9 % med sekvensen för vildtypshundar (Roulet *et al.* 2003). Deletionen av de fyra basparen återfinns på den fjärde kodande exonen inom en sekvens av 5 baser, nämligen $^{164}\text{GATAG}^{168}$. Huruvida det är ^{164}G eller G^{168} som återfinns hos ABCB1-1Δ är okänt på grund av den palindroma sekvensen men resultatet blir detsamma. Deletionen orsakar ett prematurt stoppkodon vid peptid nummer 91 i den färdiga proteinprodukten. Resultatet är ett protein bestående av enbart 91 av de totala 1 281 peptiderna, det vill säga 7,1 % av den totala sekvensen. I denna förkortade sekvens finns inga enzymatiskt aktiva domäner. I *Figur 3* visas nukleotidsekvensen för den fjärde kodande exonen i ABCB1-genen. Deletionens påverkan på kodningen visas i *tabell 1*.

TTTCGCTATTCAAATTGGCTTGATAGGTTGTATATGTTGGTGGGGACAATGGCTGCCATC
ATCCATGGAGCTGCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTT
GCAAAATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTTTCCAGTTATAATTAATGAAA

Figur 3. Nukleotidsekvens av den fjärde kodande exonen i ABCB1-genen. Deletionen som orsakar ABCB1-1Δ är markerad med röd text.

Tabell 1. Resultat av deletionen i ABCB1-genen som orskar polymorfism av P-gp. Deletionen i ABCB1 är markerad med röd text. Angränsande kodon innan och efter deletionen är inkluderade.

Variant	Sekvens
ABCB1	ATG-ACA-GAT-AGC-TTT
ABCB1-1Δ	ATG-ACA-GCT-TTG

2.2 Klinisk betydelse av polymorfismen

Om hunden är bärare av ABCB1-1Δ finns risk att den reagerar negativt mot flera olika läkemedel (Mealey *et al.* 2023). Exempelvis så kan behandling med ivermectin orsaka biverkningar vid en tiondel av dosen hos hundar med homozygot mutation jämfört med hundar som inte är bärare av mutationen. De senaste åren har fler och fler läkemedel som interagerar med P-gp upptäckts. I *tabell 2* presenteras P-gp substrat med veterinärmedicinsk relevans. Med avseende på den ökade komplexitet av de läkemedel som används veterinärmedicinskt och tillämpning av multimodal läkemedelsanvändning behöver veterinärer kunskap om ABCB1-1Δ för att kunna ta relevanta beslut kring patienters behandling (Martinez *et al.* 2008).

Tabell 2. P-gp substrat med veterinärmedicinsk relevans (Mealey 2004; Martinez *et al.* 2008; Beckers *et al.* 2022).

Substansgrupp	Läkemedelssubstans
Läkemedel mot tumörer	Doxorubicin, docetaxel, vincristin, vinblastin, etoposid, mitoxantron, actinomycin D, tamoxifen, vinorelbin, paclitexal
Opioider	Loperamid, morfin, metadon, pentazocin, butorfanol
Hjärtläkemedel	Digoxin, diltiazem, verapamil, talinolol, amiodaron, carvedilol, quinidin, nicardipin, mexiletin,
Steroidhormoner	Aldosteron, kortisol, dexametason, metylprednisolon
Immunhämmande läkemedel	Cyklosporin, tacrolimus
NSAID	Grapiprant
Antimikrobiella läkemedel	Erytromycin, ketoconazol, itraconazol, tetracyklin, doxycyklin, levofloxacin, sparfloxacin
Antiparasitära läkemedel	Ivermectin, milbemycin oxime, doramectin, moxidectin, emodepsid, selamectin,
Antihistaminer	Terfenadin, fexofenadin
Antiemetika	Ondansetron, maropitant
Antidepressiva läkemedel	Fluoxetin, paroxetin, amitriptylin
Övriga substanser	Domperidon, fenotiaziner så som acepromazin och klorpromazin, vecuronium, bromocriptin, apomorfin
Växter	Johannesört, grapefrukt

ABCB1-1 Δ påverkar även hypotalamus-hypofys-binjureaxeln (HPA-axeln). Den basala plasmakoncentrationen av kortisol är signifikant lägre hos collies med ABCB1-1 Δ . Även efter administrering av ACTH är kortisolkoncentrationen signifikant lägre. Efter administrering av dexametason är plasma-ACTH även signifikant lägre hos hundar med den muterade genen än hos collies av vildtyp. Detta kan förklara varför collies upplevs hantera stress sämre än andra raser, samt svarar sämre på behandling vid vissa sjukdomar (Martinez *et al.* 2008).

2.3 Förekomst hos collie

Förekomsten av ABCB1-1Δ hos collies i både Sverige och övriga Skandinavien har hittills varit okänt då inga studier har genomförts. I andra delar av världen är det dock studerat. I *tabell 3* presenteras en sammanfattning av resultatet från flertalet studier utförda i olika delar av världen för att få en överblick över förekomsten av mutationen.

Tabell 3. Förekomst av MDR1-mutationen hos collies i olika delar av världen. Studier markerade med ¹ är sammanställda från Gramer et al. (2011). MDR1 (-/-) är homozygota för ABCB1-1Δ, medan MDR1 (+/-) är heterozygota. LH = långhårig collie, KH = korthårig collie.

Land och årtal	Antal collies	Vildtyp	MDR1 (+/-)	MDR1 (-/-)
USA 2008 ¹	1 424	22,6 %	42,0 %	35,4 %
USA 2004 ¹	161	26,0 %	46,0 %	28,0 %
USA 2002 ¹	40	22,5 %	42,5 %	35,0 %
Tyskland 2011 ¹	2 227	19,0 %	45,0 %	36,0 %
Tyskland 2005 ¹	578	23,9 %	43,1 %	33,0 %
Tyskland 2008 ¹	14	50,0 %	50,0 %	0 %
UK 2008 ¹	42	7,1 %	40,5 %	52,4 %
UK 2004 ¹	94	14,9 %	51,1 %	34,0 %
Australien 2005 ¹	33	12,1 %	63,6 %	24,3 %
Frankrike 2004 ¹	25	20,0 %	32,0 %	48,0 %
Japan 2005 ¹	12	25,0 %	33,3 %	41,7 %
Belgien, (Beckers et al. 2022)	89	0 %	42 %	58 %
Israel, (Dekel et al. 2017)	20 LH	50 %	45 %	5 %
Thailand, (Lerdkrai & Phungphosop 2021)	21 LH	14,29 %	57,14 %	28,57 %
Brasilien, (Monobe et al. 2015)	103	0 %	50,5 %	35,9 %
Italien, (Marelli et al. 2020)	190 LH	11 %	45 %	44 %
Italien, (Marelli et al. 2020)	6 KH	0 %	50 %	50 %

Studierna utförda av Beckers *et al.* (2022) samt Marielli *et al.* (2020) använde prover specifikt inskickade för genetisk testning av ABCB1-1Δ, medan studierna utförda av Dekel *et al.* (2017), Monobe *et al.* (2015) samt Lerdkrai & Phungphosop (2021) samlade in prover genom aktiv provtagning. Beckers *et al.* (2022) och Monobe *et al.* (2015) specificerade inte vilka hårlag de collies som ingick i deras studier hade.

3. Material och metoder

För att genomföra studien krävdes DNA-material från collies. DNA samlades in från collies bosatta i Sverige oavsett ursprungsland. Både långhåriga och korthåriga collies deltog. Hundarna identifierades som renrasiga collies genom fenotyp samt registreringsnummer i Svenska Kennelklubben (SKK). Alla hundägare deltog med skriftligt samtycke (bilaga 1) för djurägarmedgivande. I Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd om försöksdjur (SJVFS 2019:9) Saknummer L150, 2 kap 17–18 § listas förutsättningar för ett djurförsök ska vara undantaget kravet på etisk prövning. Då dessa paragrafer uppfylldes krävdes inget etiskt tillstånd för genomförandet av studien.

3.1 Provtagningsteknik

För att samla in DNA från hundarna utfördes en så kallad *buccal swab*. En tops för cellprovtagning (Cetrobrush, Wing Plast AB, Smålandsstenar, Sverige) roterades mot insidan av kindslemhinnan. Engångshandskar användes vid provtagningen som byttes mellan varje hund för att undvika kontamination av DNA mellan prover. Provtagningstopsen placerades sedan omedelbart i ett papperskuvert som märktes med hundens individuella provtagningskod. Provet förvarades sedan i kuvertet i rumstemperatur fram tills analysen på laboratoriet påbörjades. För varje provhund fördes även ett provtagningsprotokoll för att kunna koppla provet till den individuella hunden (bilaga 2).

3.2 Insamling av provmaterial

Provmaterial till studien samlades in under september och oktober 2023. Evenemang arrangerade av Svenska Kennelklubben eller till dem kopplade läns-, special-, eller rasklubbar besöktes för att komma i kontakt med collieägare. Dessa evenemang var följande;

- Nationell utställning i Gimo 10 september 2023 arrangerat av Uppsala Läns Kennelklubb.

- Lydnadstävling på Västerås Brukshundklubb 23 september 2023 arrangerat av Collieklubbens lokalområde Södra Svealand.
- Vallningsprov i Norrtälje 15 oktober 2023 arrangerat av Collieklubbens lokalområde Norra Svealand.

Uppfödare av korthårig och långhårig collie i området runt Uppsala län tillfrågades att delta med sina hundar i studien. Deras kontaktuppgifter inhämtades på Svenska Kennelklubbens hemsida samt Svenska Collieklubbens hemsida. Ägare av korthårig och långhårig collie bjöds även in till att genomföra provtagningen vid Universitetsdjursjukhuset vid Sveriges lantbruksuniversitet i Uppsala den 13 oktober 2023.

3.3 Laboratorieanalyser

För att extrahera DNA från provtagningstoppen användes ”QIAamp DNA Investigator Kit” enligt instruktion från QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden, Tyskland). Kortfattat var metoden följande;

1. Buffert AW1 och buffert AW2 preparerades enligt instruktion.
2. Tops klipptes ner med hjälp av steril sax i 2 ml provrör. 20 µl Proteinase K och 400 µl buffert ATL tillsattes. Provrören blandades med hjälp av en vortex i 10 sekunder, och inkuberades sedan i 56 grader och 900 rpm i en timme i en skakinkubator.
3. Proverna centrifugerades i 8 000 rpm i 1 minut, och sedan tillsattes 400 µl buffert AL. Efter detta blandades de med hjälp av en vortex i 15 sekunder följt av inkubation i ytterligare 10 minuter i 70 grader och 900 rpm i skakinkubator.
4. Proverna centrifugerades i 8 000 rpm i 1 minut, och efter detta tillsattes 200 µl etanol. Sedan blandades de med hjälp av en vortex de i 15 sekunder och centrifugerades i 8 000 rpm i 1 min. Sedan överfördes 700 µl av lysatet till MinElute-kolumnen. Kolumnerna centrifugerades efter det i 8 000 rpm i 1 minut innan kolumnen överfördes till ett nytt rent samlingsrör.
5. 500 µl av buffert AW1 tillsattes, följt av centrifugering i 8 000 rpm i 1 minut. Kolumnen flyttades till ett nytt rent samlingsrör.

6. 700 µl av buffert AW2 tillsattes. Sedan centrifugerades proverna i 8 000 rpm under 1 minut, och kolumnen flyttades efter det till ett nytt rent samlingsrör.
7. Proverna centrifugerades i 14 000 rpm i 3 minuter, innan kolumnen flyttades över till ett 2 ml provrör. Med locket öppet inkuberades proverna sedan i 56 grader i 3 minuter.
8. 100 µl av buffert ATE tillsattes och proverna inkuberades sedan i rumstemperatur i 5 minuter. Efter det centrifugerades de i 14 000 rpm i 1 minut. Provrören med det extraherade DNA:t förvarades i -20 grader.

Efter att DNA framrenats från provtagningstoppen mättes DNA-koncentrationen i 20 slumpmässigt utvalda prover, samt två prover från hundar som redan testats heterozygota vid annat laboratorium. För detta användes ”Qubit dsDNA HS Assay Kit” enligt instruktion från Invitrogen (Invitrogen, Waltham, USA). Metoden var följande;

1. Standard 1 och standard 2 preparerades enligt instruktion.
2. Qubit reagens och Qubit buffer blandades för att skapa arbetslösningen.
3. 10 µl DNA-prov och 190 µl av arbetslösningen blandades i 3–5 sekunder med hjälp av en vortex.
4. Provrören inkuberades i rumstemperatur i 2 minuter.
5. Koncentrationerna avlästes med hjälp av Qubit 4 Fluorometer.

En *Polymerase Chain Reaction* (PCR) utfördes med två olika primrar för att sedan kunna utveckla en Taqman-PCR för ABCB1-1Δ. För detta ändamål användes provmaterial från fem hundar som inte ingick i studien. Den första primern var utvecklad av medarbetare vid Institutionen för husdjursgenetik på SLU. Den andra primern utvecklades av Beckers *et al.* under deras studie i Belgien. De två primrarna presenteras i *tabell 4*. För att utföra PCR användes ”Invitrogen Platinum SuperFi PCR Master Mix” enligt instruktion från tillverkaren (Invitrogen, Waltham, USA). Temperaturschemat för denna PCR presenteras i *figur 4*. Följande utfördes;

1. Alla reagenser som förvarades i -20 grader tinades, blandades med en vortex och centrifugerades kort före användning.
2. Primrarna späddes från 100 µM till 10 µM med destillerat vatten.

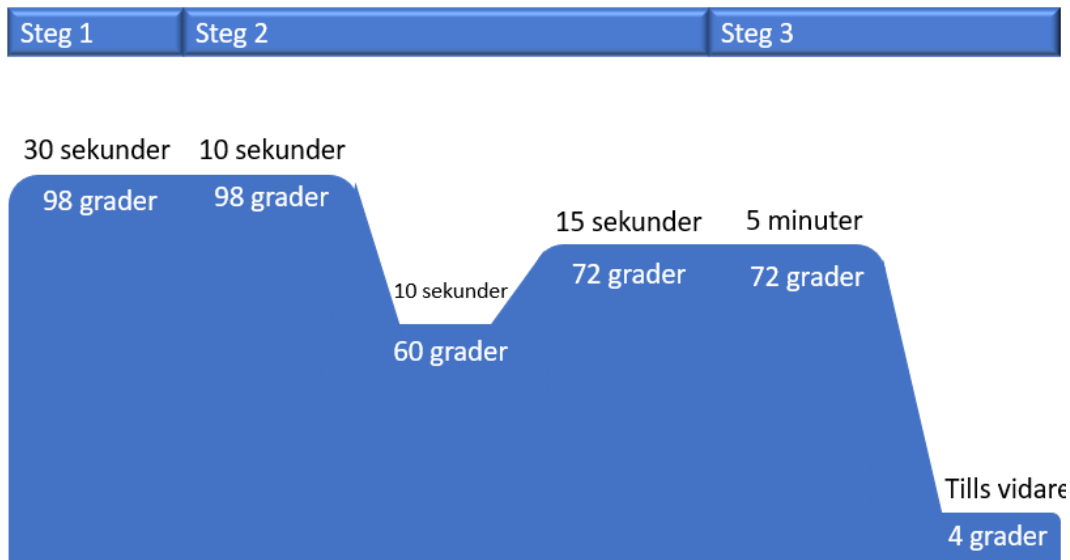
3. Vatten, Master Mix, forward primer och reverse primer blandades för att skapa reaktionsmixen.
4. 49 µl reaktionsmix och 1 µl DNA-prov blandades innan PCR påbörjades.

För att åskådliggöra vilken primer som gav tydligast resultat utfördes en gelelektrofores. Provernas placering i brunnarna på gelen presenteras i *tabell 5*. Stegen vid gelelektroforesen var följande;

1. 10xTBE spädades med destillerat vatten till 0,5xTBE.
2. Agaros-gel preparerades till en koncentration av 2,4 % tillsammans med 5 µl gelred.
3. 1 µl loading buffer tillsattes till 10 µl PCR-produkt, och pipetterades sedan till gelens brunnar.
4. 3 µl stege tillfördes i de avsedda brunnarna i gelen.
5. Gelelektrofores utfördes på 100 volt i 40 minuter.

Tabell 4. De primer-sekvenser som användes vid utformning av Taqman-PCR. ABCB1 är utvecklad vid HGEN, medan Pub är primern utvecklad av Beckers et al. Versaler representerar exon medan gemener är en del av introner. F = forward, R = reverse.

Namn	Sekvens 5´-3´
ABCB1 F	tgtaaacgacggccagtCATCATCCATGGAGCTGCAC
ABCB1 R	caggaaacagctatgaccAACCTCTAAGATCAGTGCCACA
Pub-Primer F	GATAGGTTGTATATGTTGGTG
Pub-Primer R	CTAAGATCAGTGCCACAA



Figur 4. Temperaturschema för PCR då primers testades. Steg 2 upprepades i 35 cykler.

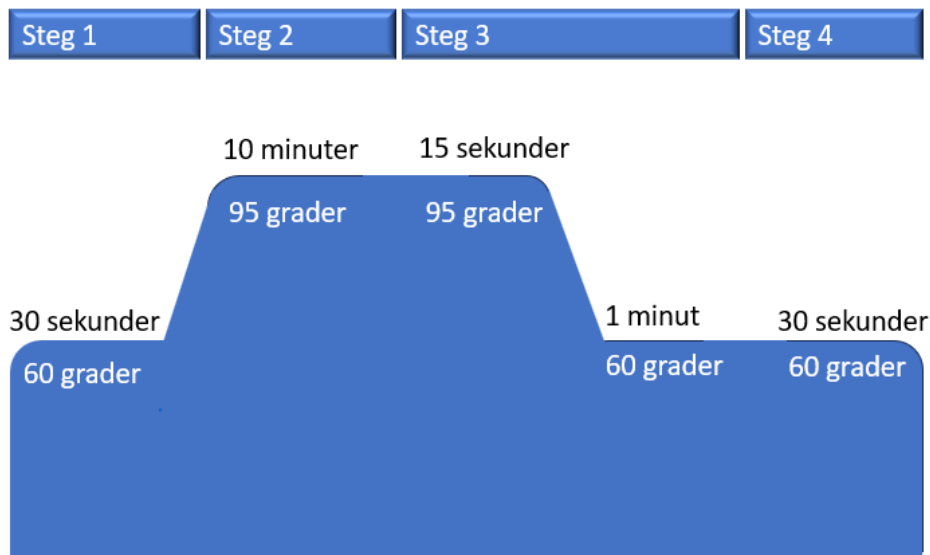
Tabell 5. Brunnarnas innehåll under gelelektroforesen.

Brunn	Innehåll	Primer
S1	Stega GeneRuler 1kb Plus 0,1 µg/µl	Ingen
S2	Stega GeneRuler 1kb Plus 0,5 µg/µl	Ingen
S3	Stega GeneRuler 100 bp Plus 0,1 µg/µl	Ingen
S4	Stega FastRuler High Range DNA Ladder	Ingen
A1	Hund nr 1 Golden retriever	ABCB1
A2	Hund nr 2 Golden retriever	ABCB1
A3	Hund nr 3 Bedlington terrier	ABCB1
A4	Hund nr 4 Border collie	ABCB1
A5	Hund nr 5 Labrador retriever	ABCB1
B1	Hund nr 1 Golden retriever	Pub-Primer
B2	Hund nr 2 Golden retriever	Pub-Primer
B3	Hund nr 3 Bedlington terrier	Pub-Primer
B4	Hund nr 4 Border collie	Pub-Primer
B5	Hund nr 5 Labrador retriever	Pub-Primer

Primern utvecklad vid HGEN (kallad ABCB1) valdes och när Taqman för ABCB1-1A skapats utfördes PCR av proverna. Det PCR-kit som användes var ”Taqman Genotyping Master Mix” (Applied Biosystems, Waltham, USA). Analysen utfördes enligt tillverkarens instruktion, metoden var följande;

1. Master Mix, Assay Mix och vatten blandades för att skapa en reaktionsmix.

2. 9 µl av reaktionsmix blandades med 1 µl av framrenat DNA-prov innan PCR utfördes. Temperaturschemat som användes vid Taqman-PCR presenteras i *figur 5*.

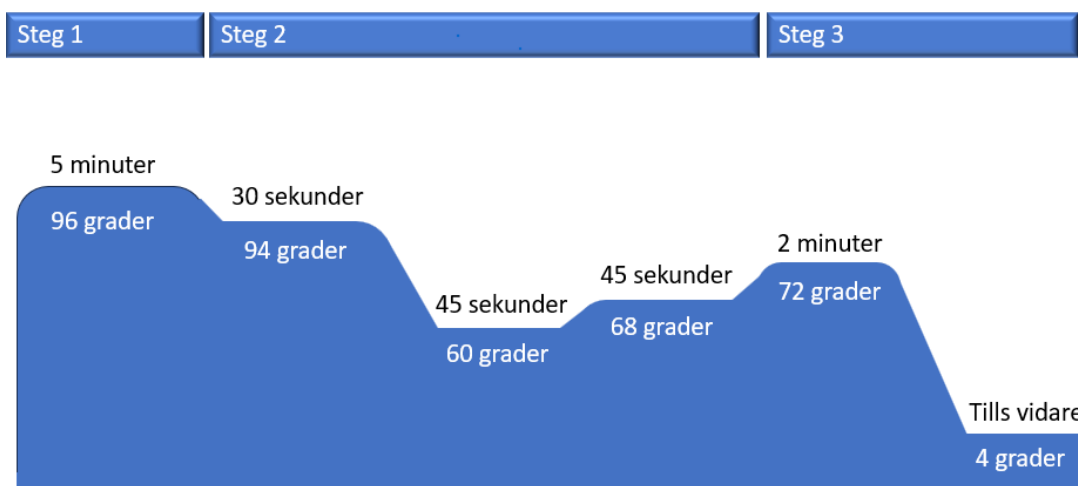


Figur 5. Temperaturschema för Taqman-PCR. Steg 3 upprepas i 40 cykler.

Efter Taqman-PCR valdes två heterozygota, två vildtyp och två homozygota prover ut och sekvenserades. För detta ändamål användes "BigDye Direct Cycle Sequencing Kit" enligt instruktion (Applied Biosystems, Waltham, USA). Metoden var följande;

1. För den första omgången med PCR blandades Master Mix, Primers Mix och vatten för att skapa den första reaktionsmixen.
2. 1 µl DNA-prov blandades med 9 µl av den första reaktionsmixen. Proverna förslöts med lock och centrifugerades därefter kort.
3. PCR utfördes. Temperaturschema för den första omgången PCR ses i *figur 6*.
4. För den andra omgången PCR blandades Master Mix med antingen Forward Primer eller Reverse Primer för att skapa Forward Mix och Reverse Mix. 3 µl av antingen Forward Mix eller Reverse Mix tillsattes proverna.
5. Proverna förslöts med lock och centrifugerades kort.

6. PCR utfördes. Temperaturschema för den andra omgången PCR ses i *figur 6*. Efter den andra omgången PCR centrifugerades proverna kort.
7. Proverna centrifugerades i 100 x g i 1 minut.
8. En premix bestående av 540 µl SAM-lösning och 120 µl XTerminator-lösning gjordes.
9. 55 µl av premixen tillsattes till varje prov och förslöts sedan med lock.
10. Proverna blandades med hjälp av en vortex i 20 minuter på 2 000 rpm, och centrifugerades sedan i 2 minuter i 1000 x g.
11. Kapillär elektrofores utfördes.



Figur 6. Temperaturschema för omgång ett och två av PCR vid sekvenseringen. Steg 2 upprepades i 35 cykler.

3.4 Statistiska analyser

För att analysera skillnader mellan de långhåriga och de korthåriga hundarna utfördes den icke-parametriska metoden chitvå-test. Formeln är följande;

$$x^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

där O är det observerade värdet och E är det förväntade värdet. Tre kategorier användes (vildtyp, heterozygot, homozygot) och två frihetsgrader valdes därför, samt en signifikansnivå på 95 %. All data analyserades i Excel (Microsoft, Washington, USA)

4. Resultat

4.1 Studiematerial

Totalt samlades det in prover från 125 hundar. Av dessa var 45 hundar korthåriga collies och 80 hundar långhåriga collies. De deltagande hundarna hade en medianålder på 1 år, där den yngsta hunden var född 2023 och den äldsta 2011. Majoriteten av de deltagande hundarna var tikar (84 tikar och 41 hanar). En stor del av hundarna var bosatta i området kring Uppsala och Stockholm, men enstaka hundar från övriga Sverige deltog också. Även importerade hundar samt hundar som skulle exporteras men som var bosatta i Sverige under studien deltog.

4.2 Laboratorieresultat

4.2.1 DNA-koncentrationer

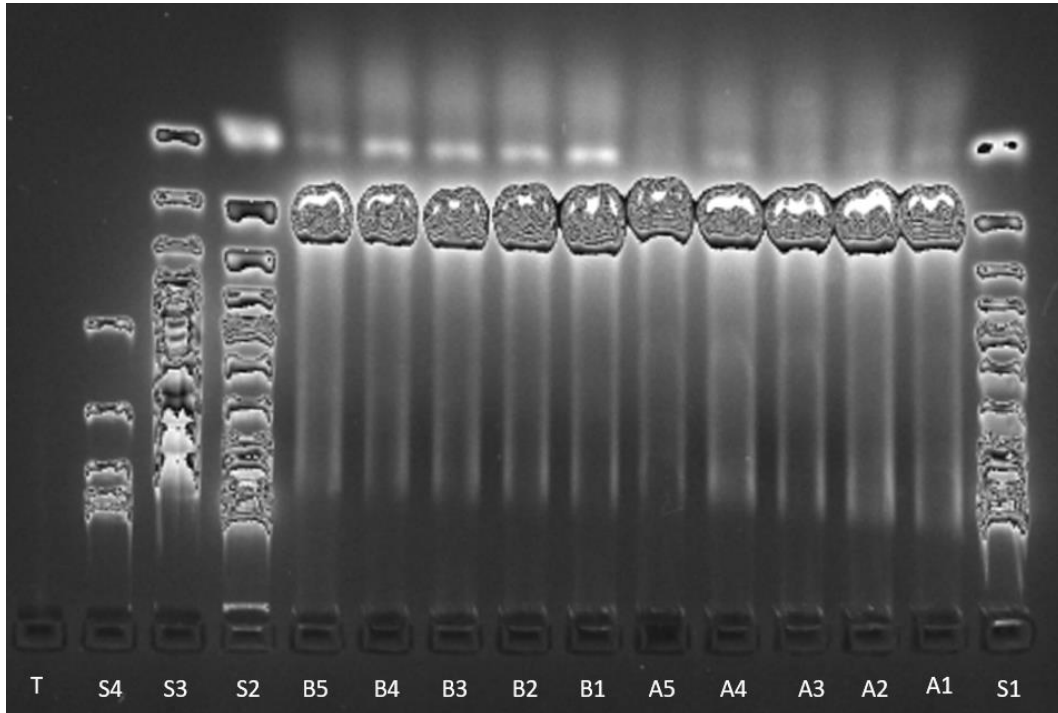
För att säkerställa att framreningen av DNA från topsarna hade lyckats uppmättes DNA-koncentrationen i 20 slumpmässigt utvalda prover, samt 2 prover från heterozygota hundar. Resultatet från DNA-mätningen presenteras i *tabell 6*.

Tabell 6. DNA-koncentrationer efter framrening från tops. H1 = heterozygot 1, H2 = heterozygot 2.

Prov	Koncentration (ng/ μ l)	Prov	Koncentration (ng/ μ l)	Prov	Koncentration (ng/ μ l)
1	8,72	9	26,0	17	1,91
2	2,00	10	35,4	18	2,90
3	4,50	11	3,02	19	8,28
4	6,20	12	9,76	20	6,72
5	0,750	13	2,12	H1	9,34
6	0,780	14	2,00	H2	11,0
7	6,84	15	4,42		
8	8,78	16	8,30		

4.2.2 PCR och sekvensering

Vid utformning av Taqman utfördes först en gelelektrofores för att åskådliggöra vilken primer som gav tydligast resultat. Resultatet av detta visas i *figur 5*.



Figur 5. Resultatet av gelelektroforesen. Till brunn A1-A5 användes ABCB1-primern utvecklad vid HGEN, till brunn B1-B5 användes primern utvecklad av Beckers et al. S1-S4 innehåller stegar, T är en tom brunn.

Resultatet från Taqman-PCR presenteras i *tabell 7*. Sekvenseringen av de sex proverna (två vildtyp, två heterozygota och två homozygota) påvisade samma resultat som Taqman-PCR.

Tabell 7. Förekomsten av ABCB1-1Δ hos colliers i Sverige. Resultat från Taqman-PCR.

Hårslag	Vildtyp	Heterozygot	Homozygot
Långhårig	25 %	50 %	25 %
Korthårig	13,3 %	44,4 %	42,2 %
Totalt	20,8 %	48,0 %	31,2 %

4.3 Statistiska analyser

För att analysera om det fanns statistiskt signifikanta skillnader mellan de långhåriga collierna och de korthåriga collierna utfördes ett chitvå-test. De tre kategorierna ”korthårig vildtyp”, ”korthårig heterozygot” och ”korthårig homozygot” jämfördes mot respektive långhårig kategori. Resultatet blev 8,47, och med

två frihetsgrader är resultat över 5,99 med 95 % säkerhet inte slumpmässiga. De skillnader som sågs mellan de korthåriga hundarna och de långhåriga var därmed statistiskt säkerställda.

5. Diskussion

5.1 Förekomst av ABCB1-1Δ

I studien provtogs 45 korthåriga collies och 80 långhåriga collies. Enligt SKKs register finns det 462 korthåriga collies i Sverige och 1 940 långhåriga collies (Svenska Kennelklubben 2023). Detta medför att 9,7 % av den svenska populationen av korthåriga collies deltog, samt 4,1 % av den svenska populationen av långhåriga collies. Det resultat som erhöles från de långhåriga collierna stämmer väl överens med vad tidigare studier har sett i andra delar av världen, det vill säga majoriteten av hundarna är heterozygota, följt av en jämn fördelning mellan hundar av vildtyp och hundar som är homozygota för ABCB1-1Δ. Enbart en studie utförd av (Marelli *et al.* 2020) hittades som delade upp resultatet mellan de långhåriga och de korthåriga collierna, och den innehöll enbart sex korthåriga collies, se *tabell 3*. Då stickprovet var relativt litet kan det påverka resultatet och göra det icke representativt för populationen i sin helhet. I denna studie ingick 45 korthåriga collies, vilket motsvarar 9,7 % av den svenska populationen av korthåriga collies. Resultatet från denna studie är därmed unikt. Trots de få individerna i Marellis studie ses liknande resultat som i denna studie, nämligen att bara ett fåtal hundar är av vildtyp, och en relativt jämn fördelning mellan heterozygota och homozygota hundar. Fler studier av ABCB1-1Δ hos korthåriga collies behövs för att styrka resultatet att mutationen är vanligare hos korthåriga collies än hos långhåriga collies.

Hos de korthåriga collierna förekom ABCB1-1Δ i högre utsträckning än hos de långhåriga, och vildtypen var ovanligare. Orsaken till skillnaden i förekomst mellan de olika hårlagen kan vara flera. De korthåriga collierna är en numerärt liten ras vilket gör att avelsurvalet även är mindre. Populära avelsdjur kan därmed få stor spridning av sina gener i populationen. En annan möjlighet är en skillnad i djurägarnas medvetenhet kring mutationen. Under studiens gång diskuterades ABCB1-1Δ med djurägare och flertalet som var ägare till korthårig collie var tveksamma till att delta i studien då de var övertygade om att mutationen inte förekom hos det korthåriga hårlaget. Ägare till långhåriga collies var i större

utsträckning medvetna om mutationen och denna kunskap kan eventuellt leda till ett medvetet avelsurval som i sin tur minskar prevalensen av mutationen i populationen. En del ägare av långhårig collie valde att utesluta sin hund ur avel enbart baserat på om den uppvisat läkemedelsbiverkningar, utan att testa för ABCB1-1 Δ . Detta kan vara en bidragande faktor till varför förekomsten är lägre hos de långhåriga collierna än hos de korthåriga collierna. Det kan dock även medföra att individer som inte bär på ABCB1-1 Δ utan uppvisade en läkemedelsbiverkning av annan orsak utesluts ur aveln.

5.2 Avel

Då ABCB1-1 Δ nedärvs autosomt recessivt finns möjlighet att genom riktad avel minska prevalensen i populationen. Är båda föräldrarna heterozygota kommer enbart 25 % av avkomman bli homozygot för ABCB1-1 Δ , se *figur 2*. Är däremot ett av föräldrarna heterozygot och den andra homozygot kommer i stället 75 % av avkomman vara homozygot för mutationen. Då det är de homozygota individerna som uppvisar de allvarligaste läkemedelsbiverkningarna är det framför allt dessa som bör minskas i första hand. Att utesluta alla homozygota avelsdjur ur aveln kan göra en stor skillnad för sjukdomsförekomsten i populationen. Den korthåriga collien är en numerärt liten ras kan det finnas flera andra faktorer som påverkar valet av att låta en individ gå i avel. Exempel kan vara mentalitet, bruksegenskaper, utställningsresultat eller andra för rasen viktiga egenskaper. Uppfödare av rasen måste ta hänsyn till individens sammanlagda egenskaper innan ett avelsbeslut tas.

Ett första steg i riktningen att minska förekomsten av ABCB1-1 Δ i populationen kan vara att införa krav från Svenska Colliklubben eller Svenska Kennelklubben att hundar ska vara testade för mutationen innan avel, för att uppfödarna ska kunna göra medvetna val. Även de som köper valpar från uppfödarna bör beaktas i denna fråga då de påverkas om valpen de köper är homozygot för ABCB1-1 Δ . Ivermectin, som i värsta fall kan orsaka fatala biverkningar hos homozygota collies, används som antiparasitiskt medel till lantbrukets djur samt hästar. Flertalet djurägare som deltog i studien uppgav att de kände stor oro då deras hundar vistades i stallar över att hunden skulle få i sig ivermectin, antingen direkt eller via avföring. Denna oro kan antingen stillas eller vara befogad beroende på om de väljer att köpa en valp från en uppfödare där föräldrarna är genotypade. Ytterligare ett steg i att minska prevalensen kan vara att sprida kunskap kring mutationen och dess konsekvenser, i syfte att få fler djurägare att välja att testa sina hundar samt köpa valpar från genotypade föräldradjur.

SKKs avelskommitté har fastslagit att ABCB1-1Δ inte utgör något kliniskt problem hos de drabbade raserna och att ett DNA-testresultat inte ska utgöra hinder för fortsatt avel (Svenska Kennelklubbens avelskommitté 2022). Svenska Collieklubben rekommenderar inte att djurägare testar sina collies, oavsett om det är i avelssyfte eller ej (Svenska Collieklubben 2012). Svenska Collieklubben uppger på sin hemsida att det finns andra viktigare faktorer att ta hänsyn till i dagsläget. Fortsatta studier på mutationens kliniska relevans krävs då ABCB1-1Δ kan orsaka fatala biverkningar. Under denna studie uppgav en uppfödare att hen visste om att tre av dennes uppfödningar avlidit till följd av läkemedelsbiverkningar efter intag av ivermectin. Även om enbart ett fåtal individer drabbas kan det diskuteras att mutationen kan orsaka så pass grava symptom för de drabbade att hänsyn ska tas vid avelsarbetet. Högre krav ställs idag på veterinärmedicinen och komplex multimodal läkemedelsbehandling blir allt vanligare. Därmed ökar risken för att P-gp-substrat används i högre utsträckning än vad de gjorts tidigare. Även om biverkningarna sällan har fatal utgång även för hundar som är homozygota för ABCB1-1Δ kan det argumenteras att hänsyn borde tas till mutationen i avelsarbetet för att minska risken hos de hundar som drabbas. Veterinärer bör i största möjliga mån undvika biverkningar för sina patienter, och detta kan antingen uppnås genom att veterinären har fördjupad kunskap kring mutationen som orsakar icke-funktionellt P-gp samt de läkemedel som interagerar med proteinet. Ett annat alternativ är att med avel minska prevalensen av ABCB1-1Δ i populationen, eller rutinmässigt genotypa alla collies innan medicinering. I akutsituationer kan det dock vara tidsmässigt omöjligt att undersöka om hunden bär på mutationen innan behandling påbörjas, varför avelsåtgärder bör övervägas.

Ytterligare en aspekt att beakta är påverkan ABCB1-1Δ har på HPA-axeln. Svenska Collieklubben, Svenska Brukshundklubben, SKK och SLU driver projektet Mentalt Sund Collie (Sveriges lantbruksuniversitet 2019), vars mål är att förbättra rasens mentalitet. Då ABCB1-1Δ kan påverka individens förmåga att hantera stress kan en minskning av mutationen i populationen vara en del i förbättringsarbetet av colliens mentalitet. Mer forskning krävs dock på ämnet för att undersöka vidare kopplingen mellan ABCB1-1Δ och hundens mentala egenskaper.

5.3 Stickprov och studiepopulation

Vid begränsning av studiepopulationen valdes alla collies bosatta i Sverige, oavsett om de var födda i Sverige eller importerade. Dessa kan tänkas utgöra den kliniska populationen som veterinärer i Sverige stöter på i sitt dagliga arbete, och är därmed den population som var av intresse för denna studie. Prevalensen av ABCB1-1Δ hos collies i Sverige var tidigare okänd, vilket kunde orsaka osäkerhet hos veterinärer då de ska behandla en riskpatient så som en collie. En del av de studier

som gjorts tidigare i andra delar av världen rapporterar ett jämnt resultat, medan andra uppvisar avvikande resultat (se *tabell 3*). Denna skillnad kan bero på storleken av stickprovet som användes, då en del använde ett mycket litet stickprov. Det kan även bero på urvalet av individer till stickprovet, då en del använder sig av provmaterial specifikt inskickat för gentestning medan andra utfört aktiv provtagning av populationen. Är proverna inskickade med syftet att ta reda på om hunden bär på ABCB1-1Δ finns det en risk att de skickas in på grund av att hunden redan uppvisat symptom och djurägaren eller veterinären vill ta reda på om det beror på ABCB1-1Δ. Gentestning av collies har rekommenderats innan medicinering med P-gp-substrat sedan upptäckten av mutationen men det finns studier som har visat att detta inte efterlevs (Beckers *et al.* 2022). Därmed kan de inskickade proverna visa falskt höga resultat av ABCB1-1Δ. Ett mer representativt urval kan uppnås genom att utföra aktiv provtagning, då även individer som inte uppvisat symptom tidigare testas. Det finns även en möjlighet att prevalensen skiljer sig mellan olika grupper beroende på hur uppfödare i olika länder samarbetar med utbyte av avelsmaterial.

5.4 Behandlingsalternativ

De behandlingsalternativ som används för hundar med ABCB1-1Δ är för tillfället baserade på beprövad erfarenhet, viss kunskap från experimentella studier på hundar med mutationen, samt data från *in vitro*-studier. De alternativa behandlingarna som finns är antingen att minska dosen på de läkemedel som är P-gp-substrat, eller att identifiera alternativa läkemedel som inte interagerar med P-gp. I vissa fall finns det säkra alternativa läkemedel som kan användas till hundar med ABCB1-1Δ. För att behandla rävsckabb kan substanser så som amitraz, sarolaner eller lotalaner användas. Detta gäller dock inte alla läkemedel. Loperamid som används vid diarré, och apomorfin som används för att inducera emesis, finns inga studier där säkra dosintervall kunnat påvisas utan alternativa läkemedel bör användas till patienter med ABCB1-1Δ (Mealey *et al.* 2023). För acepromacin, butorfanol, cyklosporin, grapiprant och doxorubicin har generella rekommendationer tagits fram där läkemedelsdosen minskas med 25 % för heterozygoter och 50 % för homozygoter. Sedan kan dosen ökas med 10 % intervall om hunden tolererar det (Mealey *et al.* 2023). Denna praxis att sänka läkemedelsdosen orsakar dock även sänkt effektivitet av den använda substansen (Beckers *et al.* 2022). Beroende på vilket syfte behandlingen med det specifika läkemedlet har samt storleken på det terapeutiska fönstret som substansen har, kan detta vara avgörande för behandlingsresultatet och i vissa fall i stället vara bättre för patienten att välja en alternativ substans. Det krävs mer forskning kring ämnet, speciellt då fler och fler substanser som används inom veterinärmedicin upptäcks vara P-gp-substrat.

5.5 Konklusion

Syftet med denna studie var att undersöka förekomsten av ABCB1-1Δ i den svenska populationen av collies, samt att analysera om det fanns skillnader mellan de långhåriga collierna och de korthåriga collierna. Förekomsten presenteras i *tabell 6*. Studien visade att mutationen är vanligare hos korthåriga collies än hos långhåriga collies i Sverige. Resultatet för de långhåriga collierna stämmer överens med tidigare studier gjorda i andra delar av världen, medan resultatet för de korthåriga collierna är unikt då ingen tidigare studerat enbart de korthåriga hundarna i motsvarande omfattning.

Referenser

- Beckers, E., Casselman, I., Soudant, E., Daminet, S., Paepe, D., Peelman, L. & Broeckx, B.J.G. (2022). The prevalence of the ABCB1-1 Δ variant in a clinical veterinary setting: The risk of not genotyping. *PLoS ONE*, 17 (8), e0273706. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273706>
- Dekel, Y., Machluf, Y., Stoler, A., Aderet, A., Baumel, D., Kellerman, E., Plotsky, Y., Noked Partouche, O., Elhalal, G., Ben-Shlomo, I. & Bercovich, D. (2017). Frequency of canine nt230(del4) MDR1 mutation in prone pure breeds, their crosses and mongrels in Israel - insights from a worldwide comparative perspective. *BMC Veterinary Research*, 13, 333. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1251-9>
- Gramer, I., Leidolf, R., Döring, B., Klintzsch, S., Krämer, E.-M., Yalcin, E., Petzinger, E. & Geyer, J. (2011). Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *The Veterinary Journal*, 189 (1), 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.012>
- Lerdkrai, C. & Phungphosop, N. (2021). Prevalence of the MDR1 gene mutation in herding dog breeds and Thai Ridgebacks in Thailand. *Veterinary World*, 14 (11), 3015–3020. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.3015-3020>
- Marelli, S.P., Polli, M., Frattini, S., Cortellari, M., Rizzi, R. & Crepaldi, P. (2020). Genotypic and allelic frequencies of MDR1 gene in dogs in Italy. *Veterinary Record Open*, 7 (1), e000375. <https://doi.org/10.1136/vetreco-2019-000375>
- Martinez, M., Modric, S., Sharkey, M., Troutman, L., Walker, L. & Mealey, K. (2008). The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31 (4), 285–300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00964.x>
- Mealey, K.L. (2004). Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27 (5), 257–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00607.x>
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M. & Cantor, G.H. (2001). Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the mdr1 gene: *Pharmacogenetics*, 11 (8), 727–733. <https://doi.org/10.1097/00008571-200111000-00012>
- Mealey, K.L., Owens, J.G. & Freeman, E. (2023). Canine and feline P-glycoprotein deficiency: What we know and where we need to go. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 46 (1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/jvp.13102>
- Monobe, M.M., Junior, J.P.A., Lunsford, K.V., Silva, R.C. & Bulla, C. (2015). Frequency of the MDR1 mutant allele associated with multidrug sensitivity in dogs from Brazil.

Veterinary Medicine (Auckland, N.Z.), 6, 111–117.

<https://doi.org/10.2147/VMRR.S72373>

Paul, A.J., Tranquilli, W.J., Seward, R.L., Todd Jr., K.S. & DiPietro, J.A. (1987). Clinical observations in collies given ivermectin orally. *American Journal of Veterinary Research*, 48 (4), 684–685

Roulet, A., Puel, O., Gesta, S., Lepage, J.-F., Drag, M., Soll, M., Alvinerie, M. & Pineau, T. (2003). MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology*, 460 (2–3), 85–91. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02955-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02955-2)

Silvestro, C.A., Soria, L.A., Conte, A. & Marrube, G. (2019). Two methods for genotyping a 4-base deletion in the canine ABCB1 gene. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, 31 (6), 889–892. <https://doi.org/10.1177/1040638719887374>

Svenska Collieklubben (2012). *MDR1-defekten*. https://svenskakollieklubben.se/halsa_mdr.htm [2023-12-09]

Svenska Kennelklubben (2023). *Antal hundar och hundägare per ras*. <https://hundar.skk.se/agarreg/Hundagareras.aspx> [2023-12-09]

Svenska Kennelklubbens avelskommitté (2022). *Protokoll fört vid videosammanträde med Svenska Kennelklubbens avelskommitté, AK, 2022-04-05* (Protokoll nr 2 2022). Svenska Kennelklubben. <https://skk.se/contentassets/64ac6723b2c6490986e172cc66d832bf/avelskommitten-protokoll-2-2022.pdf>

Sveriges lantbruksuniversitet (2019). *Mentalt sund collie*. <https://www.slu.se/fakulteter/vh/forskning/forskningsprojekt/hund/hgen-mentalt-sund-collie/> [2023-12-09]

Populärvetenskaplig sammanfattning

P-glykoprotein är ett protein som transporterar substanser över cellmembran. Det är ett av de viktigaste transportproteinerna i barriären mellan hjärnan och blodet, då det skyddar hjärnan genom att transportera ut substanser från cellerna i hjärnan till blodbanan. Det minskar även upptag av olika substanser i tarmen samt ökar utsöndringen till galla och urin. På 80-talet upptäcktes att olika vallhundsraser, däribland collie, uppvisade neurologiska biverkningar då de medicinerades med ivermectin, ett antiparasitiskt medel. 2001 upptäcktes en genmutation som var orsaken bakom denna känslighet som kom att kallas MDR1 eller ABCB1-1 Δ . Fler och fler läkemedel upptäcks ge biverkningar för hundar som bär på ABCB1-1 Δ . Syftet med denna studie var att undersöka hur vanligt förekommande mutationen var i den svenska populationen av collies, både långhåriga och korthåriga. Detta har tidigare undersökts i andra delar av världen men aldrig i Sverige. Studien undersökte även om det fanns skillnader mellan de långhåriga collierna och de korthåriga collierna.

DNA samlades in genom en kindsvabb med tops. Detta gjordes både på olika evenemang samt en provtagningsdag på Universitetsdjursjukhuset i Uppsala. Alla djurägare deltog med skriftligt samtycke. Försöket var undantaget kravet på etiskt tillstånd enligt SJVFS 2019:9 Saknummer L150, kap 2 17-18 §.

Från provtagningsstoppen gjordes olika laboratorieanalyser för att ta reda på om hundarna bär på mutationen eller inte. Det fanns tre olika resultat, antingen bär hunden inte alls på mutationen (var av vildtyp), eller så bär den på en uppsättning av den normala genen och en uppsättning av den muterade genen (heterozygot), eller slutligen så kunde hunden bära på två uppsättningar av den muterade genen (homozygot). 125 hundar deltog, varav 80 långhåriga collies och 45 korthåriga collies. Sammanlagt var förekomsten 48 % heterozygota hundar, 20,8 % av vildtyp och 31,2 % homozygota för ABCB1-1 Δ . Av de långhåriga hundarna var 50 % heterozygota, 25 % av vildtyp och 25 % homozygota för ABCB1-1 Δ , medan de korthåriga hundarna var 44,4 % heterozygota, 13,3 % av vildtyp och 42,2 % homozygota för ABCB1-1 Δ . De skillnader som fanns mellan de korthåriga collierna och de långhåriga collierna analyserades med ett chitvå-test och resultatet visade med 95 % signifikansnivå att mutationen är vanligare hos korthåriga collies.

Det finns många möjliga orsaker bakom skillnaden i förekomst av mutationen mellan hårlagen. Korthårig collie är en numerärt mindre ras och därför kan en populär avelshund få stor spridning på sina gener i populationen. Det finns också en större medvetenhet bland djurägare till långhårig collie angående mutationen, och en del djurägare tror även att mutationen inte förekommer alls hos de korthåriga collierna. Det krävs fler studier kring hur vanlig förekomsten av mutationen är hos specifikt de korthåriga collierna för att styrka denna studies resultat.

ABCB1-1 Δ nedärvs autosomalt recessivt, och det finns därför möjlighet att minska prevalensen av homozygota individer genom avelsarbete. Andra steg för att minska förekomsten av homozygota individer, som är de som drabbas av allvarligast biverkningar, är att rekommendera gentestning innan avel för att uppfödare och valpköpare ska kunna göra välinformerade val. Det finns i dagsläget inga avelsrekommendationer kring ABCB1-1 Δ från varken SKK eller Svenska Collieklubben.

Det fanns vissa skillnader i förekomsten av mutationen mellan olika studier utförda i olika delar av världen. En orsak till detta kan vara att en del studier hade ett relativt litet stickprov som inte var representativt för hela populationen. Det kan även finnas skillnader i förekomst mellan olika länders avelsbaser. Metoden för hur proverna samlas in kan också påverka resultatet.

För en del läkemedel finns det alternativa substanser som kan användas för att undvika läkemedelsbiverkningar hos hundar som bär på mutationen. För vissa läkemedel finns rekommendationer att minska dosen med 50 % för homozygoter och 25 % för heterozygoter. Det kan dock påverka läkemedlets effektivitet och det kan finnas fall där det då är bättre för patienten att välja en annan substans.

Tack

Jag vill börja med att tacka min handledare Carl Ekstrand, min biträdande handledare Minerva Löwgren samt min examinator Eva Tydén för deras stora engagemang och stöd under projektet. Jag vill även tacka all personal på SLU som varit deltagande i projektet och möjliggjort mitt arbete.

Ett stort tack till alla djurägare som deltagit med sina hundar i studien, utan er hade det inte gått att genomföra mitt arbete. Ett speciellt tack till de uppfödare som anordnade träffar för sina valpköpare, detta möjliggjorde att ett stort antal hundar kunde vara med och bidra till studien. De arrangörer som hjälpte till att sprida informationen om projektet har också min tacksamhet.

Bilaga 1



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

2023-09-04

**Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap**

**Forskningsprojekt:
Polymorfism av P-glykoprotein hos
svenska hundar**

Studieinformation

Polymorfism av P-glykoprotein hos svenska hundar

Bakgrund till studien

Colliehundar, Shetland sheepdog, Australian shepherd och flera andra raser kan vara känsliga för vissa läkemedel eftersom de kan ha en mutation i ett så kallat transportprotein som kallas för P-glykoprotein (P-gp). Hur vanligt det är att hundarna har den här mutationen skiljer sig lite mellan raser men även i olika delar av världen. Hur många hundar som har mutationen i Skandinavien är idag okänt.

Syftet med studien

Syftet i studien är att undersöka hur vanlig P-gp-mutationen är hos relevanta raser i Skandinavien.

Försöksupplägg

Genom att ta ett svabbprov från insidan av kinden kan vi genom laboratorieanalyser undersöka om hunden bär på mutationen. Ett svabbprov tas på utsidan av slemhinnan med en tops, det är alltså inte något stick eller någon smärta inblandad. Det är samma princip som provtagning för Corona, men på insidan av kinden är det inte obehagligt eller kittlande som det är att ta i halsen eller näsan. Provet kommer sedan analyseras för att ta reda på om hunden bär på mutationen eller inte.

SLU, Box 7070, SE-750 07 Uppsala, Sweden tel: +46 (0)18-67 10 00
Org.nr 202100-2817 info@slu.se

Vad kommer resultaten att användas till?

Proverna kommer att ligga till grund för att vi i framtiden skall kunna ge bra rekommendationer och säkrare medicinering av hundar.

Övrig information

Svabbprov från hund är undantaget kravet på etiskt tillstånd för djurförsök (Statens Jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd SJVFS 2019:9, saknummer L150, 2 Kap, §18). Framtida presentationer och publikationer kommer inte att innehålla någon information som skulle kunna identifiera deltagande djurägare eller hund. Dokumentation av undersökningar samt det här djurägarmedgivandet kommer att förvaras säkert på en plats som enbart forskare i detta projekt har tillgång till. Personuppgifter som lämnas vid djurägarmedgivande kommer **inte** digitaliseras och kommer att sparas så länge som det behövs för att säkerställa forskningens kvalitet och för att uppfylla övrig lagstiftning för universitet. Läs mer om hur SLU hanterar personuppgifter: <https://www.slu.se/om-slu/kontakta-slu/personuppgifter/#hur-lange>

Tyvärr har vi inte möjlighet att betala ersättning för din hunds deltagande. Men om du anger en e-postadress nedan kan vi berätta om just din hund har mutationen eller inte.

Kontakt

Det går självklart även bra att kontakta någon av oss via mail eller telefon.

Carl Ekstrand, leg. vet., docent carl.ekstrand@slu.se, 018-673171

Minerva Löwgren, leg. vet. minerva.lowgren@slu.se,

Eva Tydén, docent. eva.tyden@slu.se

Alice Gustafsson, veterinärstudent, aegn0002@stud.slu.se

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Sveriges lantbruksuniversitet, Box 7028, 750 07 UPPSALA

Djurägarmedgivande

Jag har tagit del av informationen om studien ”Polymorfism av P-glykoprotein hos svenska hundar”. Härmed godkänner jag att min hund deltar i studien. Jag är införstådd med att deltagandet är frivilligt och att jag när som helst kan ta min hund ur studien utan angivande av orsak. Om jag vill avbryta deltagandet meddelar jag projektansvariga detta. Kostnaderna provtagningen i form av material och analyser, som krävs för försöket, betalas genom forskningsmedel. Tyvärr saknar vi möjlighet att lämna ersättning för deltagande i studien.

Jag ger min tillåtelse att insamlad information och tagna prover får användas i forskningssyfte, inklusive presentationer och publikationer. Jag ger också tillåtelse att hunden får fotograferas och bilderna användas i forskning eller vid forskningsredovisning. Jag tillåter att projektgruppen kontaktar mig igen senare längre fram för en uppföljning om detta skulle vara aktuellt.

Utöver ovan tillstånd för den beskrivna studien tillåter jag att proverna sparas hos SLU, antingen på Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap alternativt på Artdatabanken (eller annan relevant biobank) för att möjliggöra även framtida forskning.

Ja: Nej:

Djurägare:

Förnamn, efternamn: _____

Adress: _____

Postnummer, ort: _____

Hemtelefon, mobil: _____

Mailadress: _____

Hund:

Tilltalsnamn: _____

Kennelnamn: _____

Ort, datum

Namnunderskrift djurägare

Namnförtydligande

Bilaga 2

Protokoll P-gp studie
Polymorfism av P-glykoprotein hos svenska hundar

Kodnummer _____

Datum _____

Namn _____

Födelseår _____

Hane

Tik Kastrerad

Långhårig Korthårig

Reg. Nr. _____

Övriga noteringar: _____

Ägaren informerad och samtycke inhämtat

Svabb från kindslemhinna tagen

Prov packat och märkt

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. **Som student äger du upphovsrätten** till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

- <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag ger härmed min tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag ger inte min tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.