



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper

Allergenet Can f 5 i hundurin

Helena Åsén

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:68*

Allergenet Can f 5 i hundurin

Helena Åsén

*Handledare: Åke Hedhammar, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU
Biträdande handledare: Jonas Lidholm, Phadia AB, Uppsala*

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: Can f 5, hund, allergen, hundallergi, androgenberoende

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:68*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY.....	2
INLEDNING	3
Bakgrund.....	3
Syfte.....	3
LITTERATURÖVERSIKT	3
Androgener	3
Allmänt om androgener.....	3
Testosteron och dihydrotestosteron.....	4
Testosteron regleras via negativ feedback	4
Blodkoncentrationen av testosteron kan mätas.....	6
Androgenproduktion efter kastration.....	6
Prostatan hos hund	7
Anatomi	7
Funktion.....	8
Androgenernas påverkan	8
Benign prostatahyperplasi (BPH).....	9
Typ 1 hypersensitivitet / allergi.....	9
T- och B-celler, APC och MHC.....	10
IgE.....	12
Mastceller.....	13
Basofiler.....	14
Eosinofiler.....	14
Vad händer vid en allergisk reaktion?.....	14
Symptom	15
Allergi mot hundar	15
Olika hundallergen.....	15
Förekomsten av allergen i urin.....	16
Can f 5 (argininesteras)	17
Androgenernas inverkan på Can f 5 (argininesteras).....	17
Hypoallergena hundraser	19
MATERIAL OCH METODER	20

Genomförande.....	20
<i>Urval av hundar</i>	20
<i>Rekrytering av hundar och studieformulär</i>	20
<i>Insamling och förvaring av urinproverna</i>	21
Laborativ analys	21
<i>Sandwich assay</i>	21
<i>Detektion av Can f 5 i hundurin</i>	22
Statistisk bearbetning.....	24
RESULTAT	24
Test av inhibitionsassay.....	24
Optimering av sandwich assay för Can f 5.....	25
<i>Utformning av standardkurvan</i>	25
<i>Urinprovstester</i>	31
<i>Utvärdering av tillförlitligheten hos standardkurvan och instrumenten</i>	34
Analys av insamlade urinprover	37
<i>Översikt över insamlade urinprover</i>	37
<i>Standardkurvan</i>	39
<i>Redovisning av responser och koncentrationer</i>	40
<i>Jämförelse mellan könen</i>	43
<i>Rasskillnader</i>	44
<i>Åldersskillnader</i>	46
<i>Jämförelse av koncentrationen beroende på insamlad urinmängd</i>	47
DISKUSSION	49
SLUTSATSER.....	52
LITTERATURFÖRTECKNING.....	53

SAMMANFATTNING

I denna uppsats redovisas en studie där förekomsten av hundallergeniet Can f 5 undersökts i urinprover från 50 hundar. Urinproverna samlades in från könsmogna tikar och hanar av raserna schäfer och pudel. Uppsatsen innehåller även en litteraturstudie vilken omfattar androgener, prostatan hos hund och allergi (typ 1 hypersensitivitet) hos människa.

Det finns fem beskrivna allergena proteiner från hund varav Can f 5 upptäcktes senast. Innan detta protein karakteriserades som ett allergen gick det under benämningen argininesteras. Argininesteras är den främsta sekretoriska produkten i prostatan hos hund och det finns flertalet studier på detta protein i vilka man undersökt en teori om att det är beroende av androgener. Det finns dock inga studier på koncentrationen av Can f 5 (argininesteras) i hundurin beroende på kön, hormonell status och ras.

Syftet med denna studie var att undersöka koncentrationen av Can f 5 i hundurin. En jämförelse beroende på kön, kastrationsstatus, ras, ålder och insamlad urinvätskemängd har utförts. Även den individuella variationen i koncentration har studerats.

För att en analys av urinproverna skulle vara möjlig utformades och optimerades en sandwich assay baserad på ett par av monoklonala α -Can f 5 antikroppar. Vissa steg i optimeringen redovisas i denna uppsats. Urinproverna analyserades ospädda samt i spädningen 1:300, 1:600 och 1:1200. Genom att jämföra urinprovernas responser (RU) med en standardkurva som tagits fram för denna studie, kunde en koncentration av Can f 5 för varje urinprov beräknas.

Koncentrationen av Can f 5 i urinproverna från tikarna och den enda kastrerade hanhunden låg på $\leq 0,001 \mu\text{g/ml}$ medan den genomsnittliga koncentrationen hos de okastrerade hanhundarna var $69 \mu\text{g/ml}$. Detta var en signifikant skillnad vilket stödjer den tidigare teorin om att produktionen av Can f 5 är beroende av androgener.

Vid en jämförelse av koncentrationen av Can f 5 mellan de två studerade hundraserna kunde ingen signifikant skillnad observeras och det var en stor individvariation hos de okastrerade hanhundarna även inom en och samma ras. Det påvisades dock ett samband mellan koncentrationen av Can f 5 och den urinvätskemängd en hund kastade vid provtagningstillfället. Detta samband var tydligast hos pudlarna där det även var signifikant vid användning av logaritmerade koncentrationer. Ett mycket svagt samband mellan koncentration och ålder kunde även ses. Troligtvis hade detta samband blivit starkare vid en större studiepopulation och fler gamla hundar i studien.

SUMMARY

This report presents a study of the occurrence of the dog allergen Can f 5 in urine samples from dogs. A total of 50 urine samples were collected from sexually mature male and female dogs of two different breeds; German Shepherd and Poodle. This report also contains a review of the existing literature on androgens, the dog prostate and allergy (type 1 hypersensitivity) in humans.

Five allergenic proteins from dog have been described and the most recently discovered dog allergen is Can f 5. Prior to its discovery as an allergen, Can f 5 was known by the name "arginine esterase". Arginine esterase is the main secretory product of the dog prostate and there are multiple studies of this protein where its androgen-regulated production was investigated. However, there are no reported studies of the Can f 5 (arginine esterase) concentration in dog urine depending on gender, hormonal status or breed.

The purpose of this study was to investigate the concentration of Can f 5 in dog urine from a large number of dogs. A comparison depending on gender, castration status, breed, age and sample volume has been performed. The individual variation in concentration was also evaluated.

To enable the analysis of the urine samples, a sandwich assay based on a pair of monoclonal α -Can f 5 antibodies was established. Some of the steps in the assay development and optimization work are described in this report. The urine samples were analyzed undiluted and in the dilution 1:300, 1:600 and 1:1200. By comparing the assay responses (arbitrary response units, RU) of the urine samples with those obtained from a set of Can f 5 calibrators of known concentration (a standard curve), the Can f 5 concentration could be calculated for each urine sample.

The concentration of Can f 5 in the urine samples from all female dogs and a castrated male dog was $\leq 0,001$ $\mu\text{g/ml}$ while the average concentration among the non-castrated male dogs was 69 $\mu\text{g/ml}$. This difference was significant and these results are consistent with the previous theory that the production of Can f 5 is androgen-dependent.

There was no significant difference in concentration of Can f 5 between the two studied dog breeds but there was a large individual variation among the non-castrated male dogs regardless of breed. However, there was a relationship between Can f 5 concentration and the amount of urine released by the animal when the sample was collected. This relationship was significant among the poodles when using logarithmic values for the concentrations. There was also a very weak relationship between Can f 5 concentration and age of the animal, but a larger study population including more elderly dogs would be required to confirm this observation.

INLEDNING

Bakgrund

Hundar är en relativt vanligt förekommande orsak till allergiska besvär hos människor och vanliga symptom är exempelvis rhinit, konjunktivit och astma. Ett flertal allergena proteiner från hund har identifierats och det som upptäcktes senast benämns Can f 5. Detta protein har isolerats från hundurin och dess förekomst har även påvisats i päls. I tidigare studier har man sett att de flesta hundallergiker främst har IgE-reaktivitet mot Can f 1 men i en nyligen utförd studie var Can f 5 det dominerande allergenet. I samma studie kunde man även konstatera att vissa hundallergiker var sensibiliserade mot enbart Can f 5 (Mattsson et al., 2009).

Det finns flertalet studier där Can f 5 (biokemiskt namn argininesteras) undersökts i prostatan hos hund och det pekats där ut som ett androgeninducerat protein. Dessa studier utfördes innan man visste att proteinet var ett allergen och det finns idag inga omfattande undersökningar av koncentrationen av Can f 5 i varken urin eller mjäll/päls från hundar.

Om det stämmer att Can f 5 är strikt beroende av androgener så ska det inte gå att påvisa detta allergen hos tikar eller kastrerade hanhundar. Det finns dock inga studier på Can f 5 i hundurin där man undersökt förekomsten av ämnet beroende på kön och hormonell status.

Om det går att visa att Can f 5 endast förekommer hos köns mogna okastrerade hanhundar så skulle det innebära att hundallergiker som enbart har IgE-reaktivitet mot just Can f 5 inte utvecklar allergiska reaktioner mot tikar eller kastrerade hanar.

Syfte

Huvudsyftet med denna studie var att bestämma koncentrationen av allergenet Can f 5 i hundurin för att undersöka om det föreligger någon skillnad mellan tikar och hanhundar. Även skillnaden i förekomst av Can f 5 beroende på ras (schäfer och pudel), ålder, individ, kastrationsstatus och insamlad urinmängd studerades.

LITTERATURÖVERSIKT

Androgener

Allmänt om androgener

Androgener är steroidhormoner och härstammar liksom alla hormoner inom denna grupp från kolesterol. Den viktigaste androgenen är det hanliga könshormonet testosteron som produceras i testiklarna. Androstenedion och dehydroepiandrosteron är exempel på två andra steroidhormoner. Dessa produceras dock inte i testiklarna utan i binjurarna. Deras biologiska funktion liknar testosteronets, men de har en lägre androgen aktivitet och måste även omvandlas till testosteron för att ha en fysiologisk effekt i kroppen. På grund av detta har dessa androgener troligtvis ingen betydelse hos handjur (Sjaastad, Hove & Sand, 2003).

Testosteron och dihydrotestosteron

Testosteron produceras av Leydigceller i testiklarna och koncentrationen av hormonet är hög i hela testikelvävnaden genom diffusion från ven till artär i funikeln. Testosteron spelar en viktig roll i utvecklingen av de hanliga könsorganen under fosterlivet. När ett handjur går in i puberteten medför en ökad produktion av just detta hormon även tillväxt av accessoriska könskörtlar och penis samt påverkar utvecklingen av sekundära könskaraktistika. Hormonet stimulerar dessutom spermieproduktionen och tillväxten av muskler och skelett (Sjaastad, Hove & Sand, 2003) samt behövs för utvecklandet och upprätthållandet av prostatan (Feldman & Nelson, 2004).

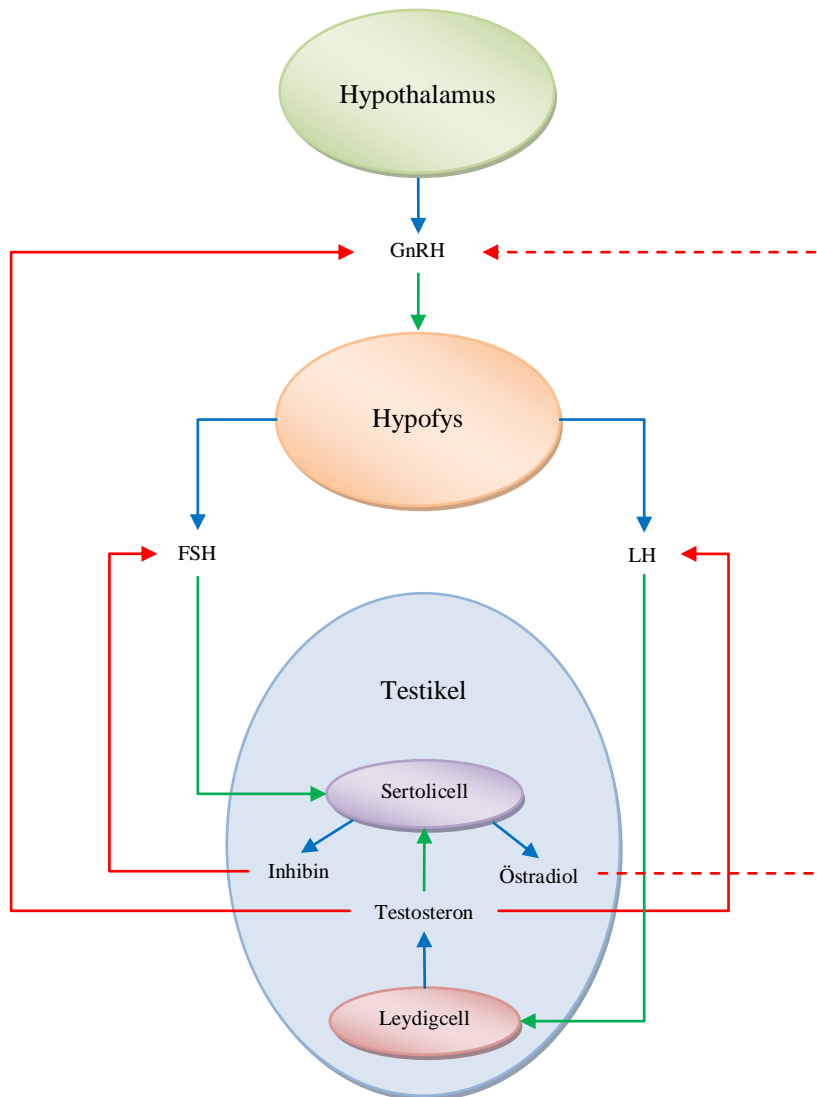
Det är delvis testosteronet själv som medför dessa effekter hos handjuret men även dihydrotestosteron spelar in. När något av dessa två hormoner binder till receptorer i cytosolen hos androgenkänsliga celler bildas komplex. Dessa komplex kan därefter binda till DNA i cellkärnan vilket medför en ökad transkription av specifika gener (Sjaastad, Hove & Sand, 2003).

Testosteron kan via enzymet 5 α -reduktas omvandlas till dihydrotestosteron i vissa vävnader i kroppen. Eftersom dihydrotestosteron har en starkare bindningsaffinitet till de intracellulära androgenreceptorerna, samt en långsammare dissociation från dessa receptorer, så är detta hormon betydligt mer potent än testosteron (Feldman & Nelson, 2004). Det har även en större betydelse som androgen i organ som exempelvis penis och prostata (Sjaastad, Hove & Sand, 2003).

Testosteron regleras via negativ feedback

För att en hanhund ska kunna upprätthålla sin libido och producera spermier behövs hormoner. Dessa regleras via negativ feedback (se figur 1). I det hanliga reproduktionssystemet finns två hormonsystem varav det ena involverar GnRH (gonadotropin releasing hormone), LH (luteiniserande hormon) och testosteron medan det andra involverar GnRH, FSH (follikelstimulerande hormon) och inhibin (Feldman & Nelson, 2004).

Gonadotropiner är en grupp av hormoner som stimulerar tillväxt och utveckling av ett djurs gonader (testiklarna hos handjur och äggstockarna hos hondjur). FSH och LH är exempel på hormoner inom denna grupp och deras utsöndring regleras av GnRH (se figur 1). GnRH utsöndras av neuroendokrina celler i hypothalamus vilka har en endogen sekretionsrytm. Cellerna kan dock även påverkas av neuron i andra delar av hjärnan samt via feedback från blodets koncentration av könshormoner. GnRH transporteras via portavenssystemet från hypothalamus till adenohipofysen där det stimulerar till utsöndring av FSH och LH. Eftersom utsöndringen av GnRH regleras av hypothalamus så regleras även syntes och utsöndring av FSH och LH indirekt via denna del av hjärnan (Sjaastad, Hove & Sand, 2003).



Figur 1. Hormonernas reglering via negativ feedback (Åsén, 2010).

FSH och LH från adenohipofysen kontrollerar testiklarnas aktivitet (Sjaastad, Hove & Sand, 2003). LH stimulerar produktionen av testosteron av leydigcellerna medan FSH stimulerar sertolicellerna till spermatogenes (Feldman & Nelson, 2004). Eftersom frisättningen av GnRH från hypothalamus sker i pulser 4-12 gånger per dag så utsöndras även FSH och LH pulsativt. Fluktuationen av FSH hos vuxna handjur är dock mindre jämfört med LH eftersom FSH även regleras av peptidhormonet inhibin via negativ feedback (Sjaastad, Hove & Sand, 2003). Utsöndringsmönstret hos LH är nödvändigt för en normal utsöndring av testosteron (Sjaastad, Hove & Sand, 2003) och medför att även testosteronet frisätts i pulser vilket leder till en varierande serumkoncentration över dygnet (Feldman & Nelson, 2004).

En hög testosteronkoncentration inhiberar utsöndringen av GnRH och därmed även utsöndringen av FSH och LH (se figur 1). Vid en ökad plasmakoncentration av LH stimuleras däremot leydigcellerna att syntetisera och utsöndra mer testosteron (Sjaastad, Hove & Sand, 2003). En ökad koncentration av detta hormon påverkar via negativ feedback hypothalamus och adenohipofysen att

minska utsöndringen av GnRH respektive LH. En minskad utsöndring av GnRH medför en indirekt hämning av FSH men även inhibin från sertolicellerna utövar negativ feedback på FSH. För att det ska kunna produceras mogna spermier hos ett handjur krävs det närvaro av både FSH och androgener (främst testosteron och dihydrotestosteron) i djurets testiklar (Feldman & Nelson, 2004).

Östradiol är ett honligt könshormon till vilket testosteron kan omvandlas efter diffusion från Leydigceller till sertoliceller. När koncentrationen av FSH ökar så stimuleras sertolicellerna till en ökad produktion av östradiol och inhibin (se figur 1). Funktionen av östradiol hos hanhund är okänd men det finns teorier om att detta hormon liksom testosteron utövar negativ feedback på hypothalamus utsöndring av GnRH (Sjaastad, Hove & Sand, 2003).

Innan ett djur blivit könsmogt så utsöndras GnRH endast i små mängder. I och med detta så utsöndras heller inte FSH och LH i tillräcklig mängd för att testikeltillväxt och spermieproduktion ska stimuleras. Testosteron inhiberar utsöndringen av GnRH och teorin är att även mycket små mängder av testosteron har förmåga att inhibera utsöndringen av GnRH innan ett djur genomgått puberteten, vilket sker vid cirka 6-12 månaders ålder hos hundar (Sjaastad, Hove & Sand, 2003).

Blodkoncentrationen av testosteron kan mätas

Genom att mäta koncentrationen av gonadotropiner och testosteron i blodet kan information om det hormonella regleringssystemets funktionella status hos ett djur erhållas. Ett enskilda blodprov avseende testosteronkoncentrationen är dock av begränsat värde eftersom nivåerna fluktuerar över dygnet. Det går heller inte att använda blodprover till att utvärdera ett handjurs spermatogenes eftersom koncentrationen av testosteron är 50-100 gånger högre i testiklarna än i blodet vilket medför att blodkoncentrationen av testosteron inte reflekterar testiklarnas testosteronhalter (Feldman & Nelson, 2004).

Att mäta blodkoncentrationen av testosteron kan dock vara värdefullt i vissa situationer. Exempelvis kan det vara till hjälp för att avgöra huruvida en hund är kastrerad eftersom en hanhund med normal libido och fortplantningsförmåga sällan har en plasmakoncentration av testosteron under 0,4 ng/ml oavsett fertilitet (Feldman & Nelson, 2004).

Om funktionen hos Leydigcellerna ska utvärderas kan ett GnRH-stimuleringstest utföras. Vid detta test mäts testosteronhalten i blodet före samt efter administration av GnRH till ett handjur. Hos ett normalt djur ses en peak i LH-koncentrationen 15 minuter efter givan av GnRH, samt en testosteronpeak efter ytterligare 45 minuter. Hos ett djur där testosteronhalten inte ökar i detta test används den uppmätta koncentrationen av LH för att fastställa om det är testiklarna eller hypofysen som är orsaken till den uteblivna testosteronpeaken (Feldman & Nelson, 2004).

Androgenproduktion efter kastration

Testosteron regleras via negativ feedback. När testosteronkoncentrationen ökar så inhiberas utsöndringen av GnRH och LH vilket i sin tur resulterar i en lägre testosteronproduktion. Vid kastrering av ett handjur avlägsnas testiklarna vilket

medför att möjligheten till utsöndring av testosteron från leydigcellerna samt inhibin från sertolicellerna försvinner. Detta leder till en utebliven negativ feedback och resulterar därför i att blodkoncentrationen av FSH och LH ökar (Sjaastad, Hove & Sand, 2003).

Androgenproduktionen hos ett handjur kan även påverkas via farmakologisk kastration exempelvis genom användning av GnRH-agonisten deslorelin. Deslorelin undertrycker funktionen hos hypofys-gonadaxeln vilket resulterar i att produktionen och/eller frisättningen av FSH och LH blir otillräcklig. Suprelorin® är ett implantat vilket frisätter en låg kontinuerlig dos av deslorelin. Detta leder till en sänkning i plasmakoncentrationen av testosteron med en effekt i minst sex månader efter implantationen. Effekten hos de behandlade hundarna är en minskad funktion i de hanliga reproduktionsorganen samt en lägre könsdrift och spermatogenes (EMEA, 2008).

Prostatan hos hund

Anatomi

Alla husdjur har en prostata (Dyce, Sack & Wensing, 2005) och hos hundar är detta den enda accessoriska könskörteln (Ettinger & Feldman, 2005; Sjaastad, Hove & Sand, 2003).

Prostatans embryologiska utveckling har sin början från multipla utväxter av urethras epitel. Under fosterutvecklingen utsöndrar testiklarna hos ett handjur testosteron vilket sedan omvandlas till dihydrotestosteron i celler i urogenitala sinus. Dihydrotestosteron stimulerar därefter bildandet av prostatans lobber i det retroperitoneala rummet vilket är beläget caudalt om urinblåsan (Ettinger & Feldman, 2005).

Hundar har en prostata som består av en diffus och en kompakt del men det är endast den kompakta delen som är stor och välutvecklad. Den diffusa delen är utspridd i den del av urethras mucosa som finns i bäckenhålan och den kompakta delen består av själva prostatakroppen vilken ligger runt urethra (Dyce, Sack & Wensing, 2002). Prostatans kompakta del består av två ovala lobber och är innesluten i en kapsel. Lobberna är tillplattade dorsalt och täckta av ett fettlager på ventralsidan. De separeras från varandra via ett median septum. Både den diffusa och den kompakta delen tömmer sig i ett stort antal gånger som öppnar sig i den del av urethra där prostatan är belägen (Ettinger & Feldman, 2005). Liksom alla större accessoriska könskörtlar så har prostatan interna septa i vilka det finns glatt muskulatur som kan driva ut vätskan till urethra vid en ejakulation (Dyce, Sack & Wensing, 2002).

Storleken på prostatan påverkas av faktorer som exempelvis kroppsvikt, ålder och ras (Ettinger & Feldman, 2005). Eftersom körteln kan vara av varierande storlek så påverkas även dess position i kroppen. En liten prostata är främst belägen i bäckenhålan men hos äldre hundar är det dock vanligare att man hittar prostatan helt eller åtminstone delvis i bukhålan eftersom den då är större (Dyce, Sack & Wensing, 2002).

När en hund är cirka två månader gammal så bryts resterna från urachus ner vilket medför att prostatan flyttar sig till en position inuti bäckenhålan. När hunden sedan från cirka åtta månaders ålder genomgår sexuell mognad via androgenstimulering så sker en förstoring av prostatan. Detta medför att körteln förflyttas i cranial riktning över bäckenkanten så att den helt eller delvis får en position inuti bukhålan. Vid kastrering av en hanhund genomgår prostatan atrofi vilket i sin tur medför att den återgår till positionen i bäckenhålan (Ettinger & Feldman, 2005). Prostatans storlek är alltså till stor del reglerad av testosteron (Sjaastad, Hove & Sand, 2003).

Det är svårt att fastställa en prostatas normala dimensioner hos en hund. Prostatahyperplasi av den parenkymala delen uppstår vanligen i tidig medelålder och medför en större prostata. Hos gamla hundar ses däremot oftare fibros och atrofi av prostatan vilket leder till att den minskar i storlek (Dyce, Sack & Wensing, 2002).

Funktion

Ejakulationen är en reflex vid vilken sperma kan deponeras i vaginan hos ett hondjur. Genom kontraktion av glatt muskulatur i bitestiklar och sädesledare kan spermerna transporteras till urethra där de sedan blandas med vätska från de accessoriska könskörtlarna innan de pressas ut ur penis via starka muskelkontraktioner i urethra (Sjaastad, Hove & Sand, 2005).

Ett ejakulat är uppdelat i olika fraktioner och hos hundar består den första och tredje fraktionen av prostatavätska vilken står för mer än 97% av den totala volymen hos ejakulatet (Ettinger & Feldman, 2005). I och med att de spermier som lagras i bitestiklarna endast har en mycket liten vätskevolym omkring sig, och hundar dessutom bara har en accessorisk könsörtel vilket är prostatan, så är dess utsöndring nödvändig för att spermier ska kunna transporteras till hondjurets reproduktionsorgan vid en parning. Prostatavätskan bidrar även till energi för spermier eftersom den innehåller fruktos (Sjaastad, Hove & Sand, 2005). Prostatans främsta sekretoriska produkt står för mer än 90% av proteininnehållet i sädesvätskan och kallas för argininesteras (Ettinger & Feldman, 2005).

Prostatavätskan utsöndras förutom vid ejakulationen även i urinen vid urinering. Om urinering/ejakulering uteblir så utsöndras prostatavätskan istället till urethra där den sedan dräneras till urinblåsan (Ettinger & Feldman, 2005).

Androgenernas påverkan

Prostatan är mycket känslig för hormonell påverkan (Dyce, Sack & Wensing, 2002) och dess sekretoriska funktion är beroende av androgener (Ettinger & Feldman, 2005). Både testosteron och dihydrotestosteron stimulerar aktiviteten i prostatan (Ettinger & Feldman, 2005). Testosteron omvandlas av enzymet 5 α -reduktas till dihydrotestosteron (Feldman & Nelson, 2004) vilket är ett betydligt mer potent hormon eftersom det har en starkare bindningsaffinitet till de intracellulära androgenreceptorerna samt en mer långsam dissociation därifrån. I och med detta så är dihydrotestosteron den viktigaste androgenen i prostatan (Sjaastad, Hove & Sand, 2003).

Prostatans storlek och sekretoriska volym regleras av testosteron och en tillväxt av prostatan ses därför vid den ökade testosteronproduktion som infaller vid tidpunkten för puberteten. Det är även avsaknaden av testosteron som medför att prostatan genomgår involution när en hanhund kastrerats (Sjaastad, Hove & Sand, 2003). Om ett djurs androgenstimulering tas bort via kirurgisk eller farmakologisk kastrering atrofierar prostatans körtel- och parenkymvävnad. Prostatans alveolarutveckling är dessutom låg hos kastrerade och sexuellt omogna hundar (Ettinger & Feldman, 2005).

Benign prostatahyperplasi (BPH)

Den absolut vanligaste åkomman i prostatan hos okastrerade hanhundar är BPH (benign prostatahyperplasi). I princip 100% av alla gamla okastrerade hanar har BPH och förstoring av prostatan är vanligt förekommande hos alla hanhundar över fem års ålder. För att BPH ska kunna utvecklas och upprätthållas krävs närvaro av androgener. När en hanhund blir äldre ses en dock liten sänkning i blodkoncentrationen av testosteron. Koncentrationen av östradiol förändras däremot inte vilket resulterar i att det uppstår en relativ sänkning i androgen/östroge-nkvoten. Troligen bidrar detta till utvecklingen av BPH genom en ökning i uttrycket av androgenreceptorer (Ettinger & Feldman, 2005).

Den främsta sekretoriska produkten i prostatavätska är argininesteras. Hundar med BPH har i studier visat sig ha en signifikant högre koncentration av just detta protein i sin prostatavätska än vad friska hundar har (Ettinger & Feldman, 2005).

Vissa hundar har BPH men uppvisar inga kliniska symptom. Andra får dock symptom som exempelvis hematuri, hemospermi och tenesmus. Det är främst då prostatan blivit så förstordad att den trycker på colon (vilket leder till svårigheter att defekera) som en hund får problem av sin BPH (Ettinger & Feldman, 2005).

Eftersom BPH är androgenberoende är en vanlig behandling kastrering och man ser en signifikant minskning i prostatans storlek redan inom 7-10 dagar efter ingreppet. Tillståndet kan dock även behandlas på medicinsk väg med exempelvis Proscar® vilket är en 5 α -reduktasinhibitor. Denna medför att det inte bildas dihydrotestosteron eftersom det behövs 5 α -reduktas för testosteronets omvandling till detta hormon. Medicinsk behandling medför liksom kastrering en reduktion av volym och sekretorisk funktion hos prostatan. För detta krävs dock kontinuerlig behandling och bäst resultat uppnås dessutom vid kastrering (Ettinger & Feldman, 2005).

Typ 1 hypersensitivitet / allergi

I västerländska länder är allergi relativt vanligt och det påverkar en stor del av befolkningen. Det uppskattas att upp till 30% av vuxna och 45% av barn kan vara drabbade av någon form av allergi och det ses även en ökning i dess förekomst (Delves et al., 2006).

Benämningen ”allergi” har länge använts för att täcka in ett stort spektrum av oönskade immunförsvarsreaktioner, men under senare år har dock termen allergi blivit synonymt med typ 1 hypersensitivitet (Mäntyjärvi, Rautiainen & Virtanen, 2000).

Den ärftliga tendensen för en individ att utveckla typ 1 hypersensitivitetsreaktioner kallas för atopi (Lindskog, 2004). Atopi är därmed benägenheten hos en individ att producera IgE-antikroppar vilket leder till uppkomsten av kraftiga allergiska reaktioner (hypersensitivitetsreaktioner). Den som drabbats av allergi mot omgivningsantigener kallas för en atopiker (Abbas & Lichtman, 2006). Hos människor finns det tre principiella atopiska sjukdomar vilka är allergisk rhinit, astma och atopisk dermatit (eksem) (Bona & Bonilla, 1996).

De symptom som uppstår hos en individ med allergi beror på aktivering av främst mastceller och basofiler via antigener. Allergener är benämningen på de antigener som kan framkalla en omedelbar allergisk reaktion via produktion av IgE-antikroppar (Abbas & Lichtman, 2006). De härstammar från ubiquitära växt- eller djurkällor och är glykoproteiner eller proteiner med låg molekylvikt (Morris, 2010).

Allergi är predisponerat av genetiska faktorer och ofta ses allergi mot flera allergener hos en och samma individ. Det är dock inte alltid som personen uppvisar kliniska symptom trots IgE-svar eller ett positivt hudtest (Mäntyjärvi, Rautiainen & Virtanen, 2000).

Både omgivningsfaktorer och interaktionen av multipla gener spelar roll för ursprunget av atopi och typ 1 hypersensitivitet, och genetiken bakom atopi/allergi är komplex. Sjukdomen ses oftare hos barn vars föräldrar också lider av den, men det finns även bevis som tyder på att omgivningsfaktorer också spelar en viktig roll. Det är exempelvis bevisat att barn som haft många infektioner som små löper en lägre risk för att utveckla allergier (Tizard, 2004).

Ett exempel på hur man kan testa en individs känslighet för olika allergen är via hudtester (intradermala pricktester) (Delves et al., 2006). Genom att injicera antigen i huden på en allergisk individ så kan två distinkta inflammatoriska reaktioner uppstå; en omedelbar akut inflammatorisk reaktion och en sen reaktion (Tizard, 2004). Hos en känslig person fås en frisättning av histamin och andra mediatorer vilket medför svullnad och rodnad på stället för injektionen. Den maximala reaktionen brukar uppstå inom 30 minuter men det händer även att reaktionen åtföljs av en så kallad sen reaktion vilken kvarstår i ett dygn (Delves et al., 2006).

T- och B-celler, APC och MHC

De enda celler som har specifika receptorer för antigener är lymfocyter. Dessa finns i två typer; B- och T-lymfocyter (även kallade B- och T-celler). Båda celltyperna har sitt ursprung från benmärgen men de har olika funktion i kroppen. Medan B-cellerna står för antikroppsproduktionen, och därmed medierar humoral immunitet, så är T-cellerna med i den cellmedierade immuniteten (Abbas & Lichtman, 2006).

Mogna B-celler kan antingen producera antikroppar eller ta upp antigen och presentera det för T-celler. B-celler som producerar antikroppar kallas för plasmaceller. Minnesceller är en annan typ av B-cell vilka är känsligare för

antigenstimulering än plasmaceller. Det är minnescellerna som ger upphov till den mer snabba produktion av antikroppar i den sekundära immunresponen då djuret redan stött på antigenet minst en gång tidigare. För att B-celler ska differentiera till antikroppsproducerande plasmaceller alternativt minnesceller krävs det att de aktiveras via en signal. Denna signal kan bland annat uppstå genom att ett antigen binder till en Ig-receptor på B-cellen (Bona & Bonilla, 1996).

B-celler har membranbundna antikroppar vilka har en direkt funktion som receptorer för olika antigener. De antigenreceptorer som finns på T-cellerna känner däremot endast igen peptidfragment från proteinantigener som är bundna till speciella molekyler vars uppgift är att just visa upp peptider. Dessa molekyler kallas för MHC (major histocompatibility complex). MHC finns i två klasser (klass I och II) och bildar komplex med peptidfragment som sedan blir membranbundna proteiner på ytan av antigenpresenterande celler (APC) (Abbas & Lichtman, 2006). Exempel på APC är dendritiska celler, makrofager och B-celler. De har som funktion är att ta upp antigener och bearbeta dem till antigenfragment vilka därefter kan visas upp för T-celler genom MHC-presentation (Bona & Bonilla, 1996).

Proteiner i cytosolen hos kärnförande celler bearbetas och visas upp av MHC klass I molekyler. MHC klass II molekyler visar däremot upp peptider från extracellulära proteiner som tagits och bearbetats av APC. De T-celler som svarar på MHC klass II presentation är främst T_H -celler (T-hjälparceller). En viktig uppgift för T_H -cellerna är att via produktion av diverse cytokiner hjälpa B-cellerna att producera antikroppar (Abbas & Lichtman, 2006).

T-celler är lymfocyter som mognar i thymus. De reglerar utvecklingen, proliferationen och aktiviteten hos B-celler, T-celler och andra celler som deltar i immunförsvaret. T-celler finns i två olika grupper; effektorceller (cytotoxiska T-celler) vilka medierar cellulär immunrespon och regulatoriska celler (T_H -celler och T_S -celler) som påverkar aktiviteten hos B-celler och andra T-celler. T_H -cellerna finns i två fenotyper; T_H1 och T_H2 . T_H1 -celler har som främsta uppgift att generera fördröjda hypersensitivetsreaktioner medan T_H2 -celler framför allt stimulerar till produktion av antikroppar och då särskilt IgE. MHC klass II molekyler är viktiga för att antigener ska kännas igen av T_H -celler och för samarbetet mellan T- och B-celler (Bona & Bonilla, 1996).

När T_H2 -celler känner igen ett antigen börjar de producera cytokiner som exempelvis IL-4 och IL-5. IL-4 stimulerar produktionen av antikroppar från B-celler och IL-5 aktiverar eosinofiler (Abbas & Lichtman, 2006).

Klassbyte

B-celler som inte träffat på ett antigen än har membranbundna IgM- och IgD-molekyler vilka fungerar som antigenreceptorer. När en B-cell bundit ett antigen och stimulerats av T_H -celler kan den differentiera till en antikroppsproducerande B-cell. Under denna differentiering kan en enda aktiverad B-cell generera upp till 4000 antikroppsproducerande celler via klonal expansion. Vissa B-celler kan börja producera antikroppar av en annan klass än de Ig-molekyler som kände igen antigenet. Detta kallas för klassbyte (Abbas & Lichtman, 2006).

Klassbytet då en B-cell stimuleras att gå från produktion av IgM eller IgD till produktion av IgE initieras via uttryck av en specifik ligand på T-cellen (CD40L). Uttrycket sker när en T_H-cell känner igen ett antigen som presenteras på en B-cell. CD40L på T-cellen binder till CD40 som uttrycks på B-cellen. De signaler som skickas till B-cellen vid ligandbindningen påverkar tillsammans med cytokiner från T-cellen avkomman till vissa aktiverade B-celler av genomgå klassbyte (Abbas & Lichtman, 2006). Hos individer som utvecklar typ 1 hypersensitivitetsreaktioner svarar kroppen på detta sätt med att producera stora mängder IgE-antikroppar och starta ett överdrivet T_H2-svar (Tizard, 2004).

IgE

Immunoglobuliner (Ig) kallas även för antikroppar. Det finns fem olika Ig-klasser varav IgE är en av dem. Alla antikroppar består av fyra polypeptidkedjor varav två tunga (H) samt två lätta kedjor (L) vilka bildar en Y-form. Varje kedja har en variabel och en konstant region. Den del av antikroppen som känner igen antigener kallas Fab (fragment antigen binding). Det finns två identiska Fab-regioner hos varje Ig-molekyl. Antikropparna har även en Fc-region som är ansvarig för majoriteten av den biologiska aktivitet och funktion antikroppen har (Abbas & Lichtman, 2006).

IgE finns endast i små mängder i blodet och har här en kort halveringstid på cirka två dagar (Abbas & Lichtman, 2006). Majoriteten av kroppens IgE finns alltså inte i blodet utan är istället starkt bundet till speciella receptorer (Fcε-receptorer) fästa till vävnadsmastceller (Delves et al., 2006).

De två olika receptorerna som finns för IgE är högaffinitets FcεRI och lågaffinitets FcεRII (CD23). FcεRI finns dessutom i två former varav den ena återfinns på bland annat mastceller och består av en α-, en β- och två γ-kedjor (αβγ₂). IgE binds till α-kedjan medan β-kedjan stabiliserar komplexet och γ-kedjorna agerar som signalförmedlare. Eftersom affiniteten mellan IgE och FcεRI är mycket hög så är bindningen mellan dem nästan irreversibel. Detta leder till att mastcellerna, vilka uttrycker FcεRI, är konstant täckta med IgE. Den andra varianten av FcεRI saknar β-kedja och finns på dendritiska celler och monocyter. När IgE hos en allergisk individ binder till APC som uttrycker FcεRI fås en MHC klass II presentation (Tizard, 2004). Detta innebär att T_H-celler kan binda in vilket resulterar i produktion av cytokiner (Abbas & Lichtman, 2006). Cytokinerna (främst IL-4) sätter därefter igång syntesen av IgE från B-celler (Tizard, 2004).

Uttrycket av FcεRI förstärks av IL-4 från T_H2-celler vilket medför en mer effektiv presentation av antigener till denna celltyp. Detta leder i sin tur till en ökad utsöndring av cytokinet och därmed en ytterligare förstärkt produktion av IgE från B-cellerna (Tizard, 2004).

Den andra IgE-receptorn (FcεRII) finns på bland annat B-celler, eosinofiler och dendritiska celler. Denna receptortyp är även en ligand för komplementreceptorn CR2 (CD21) vilket innebär att B-celler som uttrycker FcεRII kan binda till CR2 på en annan B-cell, T-cell eller dendritisk cell. Genom att länka B-celler till dendritiska celler så ökar B-cellens överlevnad vilket i sin tur gynnar IgE-produktionen (Tizard, 2004).

Specifikt IgE kan via serologiska metoder mätas i kroppsvätskor. Några exempel på sådana mätmetoder är RAST (radioallergosorbent test), western blotting och ELISA (Tizard, 2004). Det är en relativt god korrelation mellan intradermala hudtester och RAST för allergenspecifikt IgE i serum (Delves et al., 2006).

Mastceller

Mastceller härstammar från benmärgen och det är främst denna celltyp som ger upphov de symptom som ses vid allergiska reaktioner (Abbas & Lichtman, 2006). Mastceller innehåller en rad olika inflammatoriska mediatorer, enzymer och cytokiner. Frisättningen av dessa molekyler, samt produktionen av många andra, påbörjas när receptorbundet IgE triggas av ett antigen. Det är frisättningen av mastcellens olika substanser som orsakar den akuta inflammatoriska reaktion vilken är typisk för typ 1 hypersensitivitetsreaktioner (Tizard, 2004).

En av de molekyler som främst associeras till allergi är histamin. Histamin är en vasoaktiv amin som finns i mastceller. Den resulterar bland annat i ökad vaskulär permeabilitet och kontraktion av glatt muskulatur i bronker och tarmar (Abbas & Lichtman, 2006).

IgE som bundit till FcεRI på en mastcell medför ingen uppenbar direkt effekt på cellen men gör dock att den blir redo för att binda ett antigen. Den kan nu uppehålla sig i olika vävnader och vänta på att ett antigen ska dyka upp. Det är när mastcellen kommer i kontakt med ett antigen och detta dubbelbinder två IgE-molekyler (och därmed även två FcεRI-receptorer) till varandra som mastcellen triggas till att frisätta sitt granulainnehåll och inflammatoriska mediatorer (Tizard, 2004).

Responser som fås när en mastcell triggats är mycket snabb och exempelvis så frisätts dess granula inom ett fåtal sekunder efter att ett antigen bundit till IgE. Det är denna plötsliga och omfattande frisättning som resulterar i en akut inflammation (Tizard, 2004).

Förutom IgE så finns det även vissa subklasser av IgG som kan binda till mastcellsreceptorer och mediera typ 1 hypersensitivitetsreaktioner. Deras affinitet till mastcellerna är dock betydligt lägre än den hos IgE och de har därför en lägre klinisk relevans (Tizard, 2004).

α- och β-adrenoceptorer hos mastceller

Katekolaminer är hormoner som exempelvis adrenalin, noradrenalin och dopamin (Lindskog, 2004). På mastceller finns två typer av ytreceptorer (α- och β-adrenoceptorer) vilka reglerar aktiviteten hos dessa hormoner. De två receptorerna har motsatt effekt till varandra. Molekyler som stimulerar α-receptorer eller blockerar β-receptorer leder till en ökad degranulering hos mastcellerna. På motsatt sätt leder en stimulering av β-receptorerna till en inhibering av degranuleringen (Tizard, 2004).

α- och β-adrenoceptorer uttrycks inte enbart på mastceller utan återfinns även på sekretoriska celler och glatt muskulatur. Detta utnyttjas bland annat för att behandla svåra allergiska reaktioner genom att α-agonister medför vasokonstriktion och därför kan minska ödem och öka blodtrycket. β-agonister

kan i sin tur relaxera glatt muskulatur. Rena α - och β -agonister används sällan eftersom de inte räcker för att motverka de effekter en allergisk individ får vid mastcellsdegranulering. Adrenalin är dock en agonist på både α - och β -receptorer vilket medför att den fungerar bra för att motverka den vasodilatation och kontraktion av glatt muskulatur som uppstår vid typ 1 hypersensitivitetsreaktioner (Tizard, 2004).

Basofiler

Basofiler är slutgiltigt differentierade granulocyter (Tizard, 2004). De härstammar från benmärgen och har både strukturella och funktionella likheter med mastceller. En likhet är exempelvis uttrycket av högaffinitetsreceptorn Fc ϵ RI (Abbas & Lichtman, 2006). Basofiler innehåller liksom mastceller granula med en komplex mix av vasoaktiva molekyler samt inflammatoriska och toxiska mediatorer. Normalt sett finns inte basofiler extracellulärt men under inflytande av kemokiner från T-celler kan de dock ta sig in i vävnader (Tizard, 2004).

Eosinofiler

Liksom basofiler så är eosinofiler granulocyter som härstammar från benmärgen (Abbas & Lichtman, 2006). De ses karakteristiskt i stora mängder i vävnader hos individer med typ 1 hypersensitivitetsreaktioner. Frisättningen av eosinofiler till blodet stimuleras av molekyler som producerats av T_H2- och mastceller (exempelvis kemokiner). Eosinofilerna dras via molekyler som exempelvis histamin till de ställen där mastceller redan degranulerat. Här frisätter de (också via degranulering) sina egna biologiskt aktiva molekyler (Tizard, 2004).

Eosinofiler kan fagocytera små partiklar men är dock mer lämpade för extracellulär destruktion av stora parasiter i och med att de kan degranulera till omgivningen. Degranuleringen uppstår som en respons på bland annat parasiter med IgE på sin yta eller antigenbundna IgE-molekyler. Det medför att små vesikler av sekundära granula knoppas av och släpps till vävnaderna (Tizard, 2004).

Vid allergiska reaktioner interagerar eosinofiler med mastceller. Eosinofiler frisätter proteiner från sitt granulinnehåll vilka aktiverar mastcellens histaminfrisättning. Mastceller i sin tur aktiverar eosinofiler samt ökar uttrycket av eosinofila receptorer och frisätter mediatorer vilka befrämjar degranulering, tillväxt och överlevnad hos eosinofilerna (Tizard, 2004).

Vad händer vid en allergisk reaktion?

För att allergi ska kunna uppstå måste en individ komma i kontakt med ett allergen som den stött på tidigare. Det allra första mötet med allergenet kallas för den primära immunresponsen och medieras av naiva lymfocyter som aldrig tidigare stött på allergenet (Abbas & Lichtman, 2006). Resultatet av den primära immunresponsen är produktion av IgM av B-celler. De andra immunoglobulinerna inklusive IgE dyker upp senare i förloppet genom ett klassbyte i Ig-produktionen som delvis regleras av cytokiner från T-celler. IL-4 som produceras av T_H2-celler styr produktionen av immunoglobuliner från B-celler mot IgE. Basofiler och mastceller tar sedan upp allergenspecifikt IgE från cirkulationen och binder dem till sina ytreceptorer (Bona & Bonilla, 1996).

Vid upprepad kontakt med samma allergen inträffar sekundära immunresponser. Dessa går vanligen snabbare och är mer kraftfulla eftersom det bildats minnesceller under den primära immunresponsen (Abbas & Lichtman, 2006). Allergenet kan nu reagera med de cellbundna IgE-antikropparna vilket leder till degranulering och syntes av ytterligare hypersensitivitetsmediatorer från basofiler och mastceller (Bona & Bonilla, 1996).

Symptom

En kraftig överproduktion av IgE medför en omdelbar hypersensitivitetsreaktion i och med att symptomen utvecklas inom sekunder/minuter efter att individen kommit i kontakt med antigenet. Det är frisättningen av inflammatoriska mediatorer från mastceller, eosinofiler och basofiler som ger upphov till de symptom som uppstår. Beroende på var frisättningen sker, mängden antigen och individens känslighet kan olika delar av kroppen drabbas samt i olika allvarlighetsgrad. Om de vasoaktiva molekyler från mastcellerna frisätts i en snabbare hastighet än den drabbade individens möjlighet att svara på förändringen i sitt vaskulära systemet, så uppstår en akut anafylaktisk chock. Hypersensitivitetsreaktionen är då systemisk och så allvarlig att den kan bli livshotande för den drabbade individen. Det är dock vanligare med lokala allergiska reaktioner (Tizard, 2004).

Typiska symptom på allergi hos människor är astma, allergisk rhinit och konjunktivit (Delves et al., 2006). Hos individer med födoämnesallergi ses dock främst symptom från digestionstrakten (Mäntyjärvi, Rautianinen & Virtanen, 2000).

Allergi mot hundar

I västerländska länder är det vanligt med allergier vilka medför lokala IgE-medierade reaktioner, och päls från husdjur är exempel på ett typiskt allergen. Vanliga symptom är astma och allergisk rhinit/konjunktivit. Dessa symptom uppstår genom frisättning av allergiska mediatorer när allergenet kommer i kontakt med cellbundet IgE i bronkerna samt i näs- och ögonslemhinnan (Delves et al., 2006).

Termen mjäll (dander) hänvisar till partiklar som fallit av från huden på ett djur och nu återfinns i pälsen. Mjäll anses främst bestå av hudflagor men eftersom det inte går att standardisera och korrekt definiera dess fysiska egenskaper så används termen i en allmän bemärkelse (Morris, 2010). En vanlig orsak till allergi med symptom från luftvägarna är hundmjäll (Mattsson et al., 2009).

När det gäller just allergi mot husdjur finns det många missförstånd. Ett sådant är tron om att det finns hund- och kattraser som är mindre allergiframkallande än andra (Morris, 2010).

Olika hundallergen

Alla allergen tilldelas koder som indikerar artens ursprung av allergenet samt ett löpande nummer (exempelvis Can f 1 - Canis familiaris allergen 1). Detta nomenklatursystem är fastställt av "The Allergen Nomenclature Subcommittee of

the Interational Union of Immunological Societies” (Mäntyjärvi, Rautiainen & Virtanen, 2000).

Hittills har fyra olika hundallergen identifierats och detaljstuderats. Dessa är Can f 1, Can f 2, Can f 3 (hundserumalbumin) och Can f 4. Nyligen påvisades dock även ytterligare ett hundallergen vilket fick namnet Can f 5. Detta allergen analyserades i hundurin och kunde även renas fram därifrån. Ett protein som var identiskt med Can f 5 (eller nära relaterat till det) kunde i samma studie även påvisas i extrakt från hundhår och -mjäll men det är dock oklart hur det hamnar där (Mattsson et al., 2009).

De huvudsakliga allergen som hittills är påvisade i hundmjäll är Can f 1 och Can f 2. Can f 1 produceras av epitelvävnad i tungan och Can f 2 produceras av både tungan och parotiskörteln. Båda dessa allergen är salivära lipokalinproteiner (Konieczny et al., 1997). Medan urin och avföring endast innehåller mycket små mängder av Can f 1 och Can f 2, så är hundsalliv däremot är ett starkt allergenextrakt för dem båda (de Groot et al., 1991).

I en studie på 592 patienter med rhinokonjunktivit och/eller astma hade 70% av individerna med hundallergi en IgE-reaktivitet mot Can f 1. Can f 1 ansågs därför vara ett viktigt hundallergen med kapacitet att provocera fram ett IgE-svar hos en majoritet av hundallergikerna (de Groot et al., 1991). Saarelainen et al. (2004) utförde en liknande studie men konstaterade då att prevalensen av IgE-reaktivitet mot Can f 1 var betydligt lägre (44%).

Även Mattsson et al. (2009) fick i en studie en lägre IgE-reaktivitet till Can f 1 på 49%. Istället hade 70% av de allergiska individer som testades en IgE-reaktivitet till rekombinant Can f 5. 38% reagerade dessutom enbart på just Can f 5 vilket visar att det är ett viktigt hundallergen. Immunresponsen mot detta allergen påvisades vara oberoende av sensibilisering till de andra hundallergen (Mattsson et al., 2009).

Allergenet Can f 4 har påvisats i hundmjäll (Saarelainen et al., 2004) men däremot inte tidigare detaljstuderats och heller inte tagits fram i rekombinant form. Detta utfördes dock i en studie från 2010. Man såg då även att 35% av de testade allergiska individerna var sensibiliserade mot just Can f 4 vilket tyder på att det är ett viktigt hundallergen (Mattsson et al., 2010).

Förekomsten av allergen i urin

För att utveckla respiratorisk allergi mot ett allergen krävs det att det finns i en luftburen form. Lipokalinallergener från däggdjur hittas därför ofta i mjäll, hår och sekret (exempelvis urin och saliv) (Mäntyjärvi, Rautiainen & Virtanen, 2000). Hos möss och råttor är den största allergenkällan deras urin och en sensibilisering till dessa allergen kan bland annat uppkomma av urinkontaminerat luftburet damm (Taylor, Longbottom & Pepys, 1977).

Även urin från hundar och katter har påvisats innehålla IgE-aktivitet. I en studie från 1980 användes extrakt från katt- och hundallergen med ursprung från mjäll och epitel för att jämföras med urin från samma djurslag. Genom att använda RAST för att diagnosticera djurallergi kunde man påvisa att urinprover från både

hundar och katter innehöll stora mängder av allergent material (Hoffman, 1980). Det enda allergen som man dock hittills lyckats rena fram och karakterisera på molekylär nivå från hundurin är Can f 5 (Mattsson et al., 2009).

Can f 5 (argininesteras)

Mer än 90% av det totala proteininnehållet i prostatavätska består av ett glykoprotein vars syntes är under strikt androgen kontroll. Detta protein är dessutom den främsta lösliga proteinkomponenten i prostatavävnad hos hundar (Isaacs & Shaper, 1983). År 1984 identifierades proteinet som argininesteras (Chapdelaine et al., 1984).

Argininesteras är ett proteolytiskt enzym som liknar trypsin (Isaacs & Coffey, 1984). År 1991 genomfördes en studie i vilken man tydligt kunde visa att argininesteras var en medlem av genfamiljen tillhörande kallikrein (Chapdelaine et al., 1991). Kallikreinfamiljen är en grupp av serinproteaser med bioregulatorisk inverkan (Lazure et al., 1984).

Källan till detta sekretoriska protein är prostatan (Isaacs & Coffey, 1984) och det finns både i prostatans cytosol samt i sädesvätska (Chapdelaine et al., 1984). I en nyligen utförd studie kunde man dock även konstatera att argininesteras är ett hundallergen som utsöndras via hundurin. Samma protein, eller ett nära relaterat protein, påvisades även i päls och mjäll från hundar (Mattsson et al., 2009).

Argininesteras fick benämningen Can f 5 (*Canis familiaris* allergen 5) av WHO/IUIS's allergen nomenklatur subkommitté när det konstaterades vara ett allergen (Mattsson et al., 2009). Det biokemiska namnet är dock argininesteras.

Androgenernas inverkan på Can f 5 (argininesteras)

Prostatans sekretoriska funktion är beroende av androgener (Ettinger & Feldman, 2005). Kastration eller testosteronbehandling påverkar förutom prostatans innehåll av argininesteras även dess kapacitet till att syntetisera detta protein (Chapdelaine et al., 1984).

År 1983 utfördes en studie på hanhundar i vilken aktiviteten hos ett antal hydrolytiska enzymer i prostatans cytosol undersöktes. Man jämförde aktiviteten hos enzymerna vid kastrering och injektion av steroidhormoner. Argininesteras föreföll vara helt lokaliserat till det glandulära epitelet i en hunds prostata och hade en mycket hög aktivitet i cytosolen. Flera av de undersökta enzymerna var androgenberoende och aktiviteten hos argininesteras svarade väl på både kastrering och tillförsel av androgener. Man såg även att dess aktivitet i prostatans cytosol var obefintlig tre månader efter kastration (Frenette, Dubé & Tremblay, 1983). I en annan studie utförd samma år såg man att mängden av argininesteras i prostatavävnad hos okastrerade hanhundar ej skiljde sig från den mängd man påvisade hos kastrerade hanar som behandlats med testosteron (Isaacs & Shaper, 1983).

Lokalisationen av argininesteras i prostatan är i dess sekretoriska epitel. Genom användning av immunokemiska metoder har man kunnat konstatera att stora mängder argininesteras enbart finns i prostatavävnad från okastrerade hanhundar.

Frånvaron av detta protein i prostatan hos kastrerade hundar konfirmerade åter igen att det är androgenberoende (Isaacs & Shaper, 1985).

Regleringen av argininesteras med androgener och/eller antiandrogener undersöktes i en studie år 1990 och de experiment som utfördes stödjer teorin om att argininesteras är androgenberoende. Både antagonist till en så kallad steroidandrogenreceptor, respektive användning av 5 α -reduktasinhibitorer, påverkade aktiviteten hos argininesteras. Kastrering minskade även dess nivåer i förhållande till de okastrerade kontrollerna. Kastrerade hanhundar som behandlats med steroider uppvisade liknande aktivitet av argininesteras som de okastrerade kontrollerna, men vid samtidig tillförsel av WIN (en antagonist till steroidandrogenreceptorn) så uppstod dock en dosberoende inhibition. Även okastrerade hanhundar behandlades med WIN och man såg även hos dessa hundar en dosberoende inhibition av argininesterasaktiviteten. Genom att utvärdera prostatan histomorfologiskt och ultrastrukturellt kunde man konstatera att behandling med antiandrogener resulterade i atrofi av prostatans glandulära epitel samt medförde en reduktion av antalet sekretoriska granula (Juniewicz et al., 1990).

Argininesteras mRNA

I en studie från 1988 visades att mRNA från argininesteras fanns i hög koncentration i prostatan hos okastrerade hanhundar. Hundar som kastrerats tre veckor tidigare hade dock över 100 gånger lägre nivåer av mRNA från argininesteras än okastrerade alternativt testosteronbehandlade hundar. Detta påvisar att minskningen av argininesterassyntesen vid exempelvis kastrering av en hanhund beror på en minskning av nivåerna av mRNA och inte på grund av inaktivering av det mRNA som fortfarande finns kvar (Chapdelaine et al., 1988).

År 1993 utfördes en studie i vilken man kunde konstatera att kastration av hanhundar resulterade i en snabb minskning av aktiviteten hos argininesteras redan inom ett dygn. Denna sänkning beror troligen på ett massivt läckage av prostatavätska orsakat av ökade nivåer av neurotransmittorer vilket inducerats av anestesin och den kirurgiska stress kastrationen i sig medfört. Denna slutsats kunde dras eftersom de totala nivåerna av mRNA från argininesteras var oförändrad vid samma tidpunkt (Gauthier et al., 1993).

I samma studie undersöktes nivåerna av argininesteras mRNA 5 respektive 12 dagar efter kastration. Dess nivåer var 22% lägre hos de hanar som kastrerats för 5 dagar sedan men vid 12-dagarskontrollen såg man en sänkning på 150 gånger. Genom att behandla de kastrerade hanarna med en testosteroninjektion en vecka efter kastreringen kunde nivåerna av argininesteras mRNA återställas inom fem dagar (Gauthier et al., 1993).

En utvärdering av den histomorfologiska bilden utfördes också, och ett dygn efter kastration var den var praktiskt taget identisk med den hos de okastrerade djuren. Vid undersökning 5 respektive 12 dagar efter kastration såg man dock en ökning av autofagiska vakuoler i prostataepitelet samt tecken på prostataatrofi. Man fastställde även att argininesterasets proteinnivåer varierade parallellt med dess enzymatiska aktivitet (Gauthier et al., 1993).

I en studie från 1991 kunde man visa att mRNA från argininesteras inte bara fanns i prostatan utan dessutom i mycket små mängder i andra vävnader som exempelvis lever, njure, pancreas och skelettmuskulatur. Signifikansen av denna upptäckt är dock oklar och nivåerna av argininesteras mRNA i prostatan är dessutom minst 1000 gånger högre än i någon annan undersökt vävnad. Gener som uttrycks i flera vävnader regleras ofta på olika sätt och slutsatsen drogs därför att det är vävnadsspecifika faktorer som kontrollerar nivåerna av mRNA (Chapdelaine et al., 1991).

Undersökning av argininesteras i blod

Argininesteras har förutom i prostatan även analyserats i blod. I en studie från 1987 undersöktes proteinet i plasma från hundar via användning av en utvecklad radioimmunoassay. Genom att undersöka responsen av argininesteras i serum vid kemisk kastrering av hanhundar föreslogs att en stor andel av detta protein har ursprung från prostatan. Man undersökte även serum från tikar och fann då att argininesteras hos dessa antingen saknades helt alternativt endast kunde påvisas i mycket liten mängd (Frenette et al., 1987).

Hypoallergena hundraser

Pälsen hos hundar växer i cykler. I och med detta så kan den antingen växa, befinna sig i en övergångsfas eller vila. När det finns ett nytt hårstrå som kan ersätta det gamla så uppstår fällning. Hundens hormonella status, antal timmar på dygnet med dagsljus samt vad det är för väder är faktorer som bestämmer hur lång tid det tar för ett hårstrå att fällas. Hundar faller främst under våren och hösten (Whitehead, 2000).

Pudeln har en tät och lockig päls (Whitehead, 2000). När en pudel tappar hårstrån så blir de kvar i pälsen vilket medför att hundar av denna ras inte faller på vanligt sätt (Messent et al., 2005). Följande citat är hämtade ur böcker vilka beskriver pudeln som en hundras vilken även hundallergiker tål på grund av dess speciella päls:

”På grund av sin speciella struktur tåls pudelns päls av en del allergiker som annars inte tål hundar” (Messent et al., 2005, s.51).

”En egenhet för rasen är att pälsen växer hela tiden utan perioder av hårfällning, och det gör rasen mycket lämpad för personer med allergiska besvär” (Bower & Bower, 2004, s.178).

År 2005 utfördes en studie i vilken man visade att antagandet om att hundar som faller mindre päls (exempelvis pudlar) även producerar mindre allergen inte stämmer. Man undersökte då koncentrationen av Can f 1 i hundhår från 288 friska hundar av olika raser (Ramadour et al., 2005). Labradorer som är kända för att ständigt falla (Morris, 2010) visade sig producera en signifikant lägre allergenhalt av Can f 1 än de andra hundraserna (Ramadour et al., 2005). En av de två raser som producerade mest allergen var dessutom pudeln. Variationen mellan övriga hundraser var dock stor. Hanhundarna producerade signifikant mer Can f 1 än tikarna men man såg ingen skillnad beroende på hormonell status (okastrerade respektive kastrerade djur). Variationen i koncentration hos olika hundar inom en

och samma ras var mycket stor och påståendet om att det skulle finnas hypoallergena hundraser kunde därför förkastas (Ramadour et al., 2005).

Även en annan studie förkastade denna teori om ”hypoallergena hundraser” då man visade att de högsta koncentrationerna av Can f 1 i hundhår fanns hos bland annat pudlar. I denna studie såg man dock ingen skillnad i koncentration beroende på kön utan konstaterade att individuella faktorer spelade en större roll än kön och ras (Heutelbeck et al., 2008).

MATERIAL OCH METODER

Genomförande

Urval av hundar

Can f 5 är beskrivet som ett androgeninducerat protein och alla hundar som användes i denna studie var därför köns mogna. Eftersom tiden för köns mognaden varierar mellan olika raser, kön och individer så sattes en nedre åldersgräns på 18 månader.

Ett syfte med denna studie var att undersöka eventuella rasskillnader samt förekomsten av hypoallergenitet och två hundraser valdes därför ut; schäfer och pudel (alla storlekar). Pudel är en hundras som inte har den ”normala” cykliska hårfällningen och kan därför (enligt viss litteratur) uppfattas som mindre allergiframkallande hos en del människor trots att tidigare studier visat att just pudlar generellt sett bär på högre halter allergen än andra hundraser som exempelvis schäfer.

För att undersöka könsskillnader så samlades urinprover in från såväl hanhundar som tikar. Både okastrerade och kastrerade hundar inkluderades i studien för att en undersökning beroende på hormonell status skulle kunna genomföras.

För att erhålla tillförlitliga resultat och minska risken för bias så fick endast fullt friska hundar delta i studien. Hundarna fick heller inte stå på någon som helst pågående medicinering.

Rekrytering av hundar och studieformulär

Insamlingen av urinprover från schäfrar utfördes på Försvarmaktens hundtjänstenhet i Rosersberg. Urinproverna från pudlarna samlades in genom närvarande vid pudelutställningar samt via kontakt med uppfödare.

Ägare till lämpliga hundar erbjöds att delta i studien och tog del av en kort muntlig och skriftlig information om studiens syfte och genomförande. För att samla information om hundarna så fick djurägarna fylla i ett studieformulär och lämna ett undertecknat medgivaravtal. I studieformuläret noterades följande uppgifter:

- Provtagningsdatum
- Typ av prov
- Djurslag
- Hundens namn och ID-nummer

- Födelsedatum
- Kön
- Kastrationsstatus – okastrerad / farmakologiskt kastrerad / kirurgiskt kastrerad
- Datum för eventuell kastration
- Eventuell kryptorchism hos hanhundarna

För tikarna noterades dessutom nedanstående uppgifter:

- Datum för senaste lopp
- Löpningsintervall
- Dräktighetsstatus – dräktig / ej dräktig
- Eventuella valpningar och dess datum
- Eventuell användning av p-piller

I studieformuläret noterades även uppgifter om djurägarens namn, adress och telefonnummer. Detta utifall att det skulle uppstå oklarheter och djurägaren skulle behöva kontaktas för att exempelvis ta ett nytt urinprov.

Varje hund försågs med en providentitet. Både urinprovet (alla rör) och studieformuläret för varje hund märktes sedan med samma providentitet via klisteretiketter.

Det samlades även in urinprover från de undervisningshundar (beaglar) som finns att tillgå på KC på SLU. Dessa urinprover användes uteslutande till att optimera den sandwich assay som skulle användas vid analysen av urinproverna.

Insamling och förvaring av urinproverna

Urininsamlingen genomfördes med godkänt etiskt tillstånd (Dnr C 139/9).

Urinproverna som samlades in var spontankastade och alla prover sparades oavsett mängd. Generellt kunde merparten av den urin en hund kastade vid insamlingstillfället samlas upp.

Urinen samlades upp i uppsamlingskärl. Vissa uppsamlingskärl återanvändes efter noggrann rengöring och torkning. Efter uppsamling överfördes varje urinprov till en uppmärkt 100 ml flaska. En gräns på förvaring i rumstemperatur sattes till högst 12 timmar. Urinproverna portionerades därefter ut i 10 ml rör som överfördes till en frys med temperaturen -70°C . De urinprover som inte kunde frysas direkt efter insamlingen förvarades i kylskåp i maximalt ett dygn innan de portionerades ut och frystes ned. Alla rör märktes med en klisteretikett med information om provtagningsdatum och providentitet. En motsvarande etikett sattes fast på det studieformulär som hörde till det insamlade urinprovet.

Laborativ analys

Sandwich assay

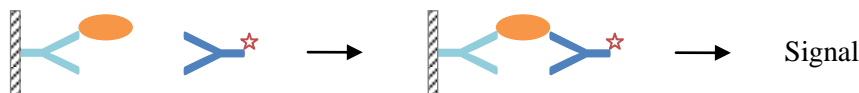
En sandwich assay används normalt för att bestämma mängden av ett specifikt makromolekylärt antigen i ett prov. Genom denna analysmetod tillåts en samtidig

bindning av två antikroppar till det undersökta antigenet. Det prov som ska analyseras pipetteras på en fast fas. Den fasta fasen är täckt (coatad) med ett överskott av en ”fångande” antikropp (se figur 2). Provet inkuberas därefter varpå den fångande antikroppen binder specifikt till det antigen som ska analyseras. Alla andra ämnen i provet tvättas sedan bort och det bundna antigenet kvantifieras i ett andra steg genom att ett överskott av en märkt antikropp (detektionsantikropp) tillsätts. I och med att denna assay utförs i två steg så kallas den även för en tvåstegs assay. Efter ytterligare en inkubering tvättas de obundna antikropparna bort och signalen från detektionsantikroppen, som nu är bunden till den fasta fasen, är direkt relaterad till antigenkoncentrationen i provet (Diamandis & Christopoulos, 1996).

Steg ett:



Steg två:



Figur 2. De olika stegen i en sandwich assay (Åsén, 2010).

Detektion av Can f 5 i hundurin

Allt laborativt arbete utfördes på Phadia AB i Uppsala. Först testades en inhibitionsassay men eftersom det inte gick att analysera låga koncentrationer av Can f 5 med denna typ av assay utformades och optimerades istället en sandwich assay. Denna användes sedan för att analysera koncentrationen av Can f 5 i de insamlade urinproverna. En standardkurva upprättades även där standardpunkterna bestod av rekombinant Can f 5 (rCan f 5) i känd koncentration. All assayoptimering samt själva urinprovsanalyserna utfördes i analysinstrumentet Phadia 100.

Efter optimering av sandwich assayen utfördes urinprovsanalyserna med nedanstående parametrar:

- Buffertlösning: mus-IgG-diluent
- Fast fas (fångande antikropp): anti Can f 5 mAb cl 1038 (kop b21 och b65)
- Konjugatbuffert: IgG buffert 34-2294-49 C5/DP1D
- Konjugat (detektionsantikropp): stamlösning av anti Can f 5 mAb cl 1037 beta-galaktosidase konjugat i koncentrationen 0,12 mg/ml
- Stamlösning av rekombinant Can f 5 till standardkurvan: rCan f 5 (#504) i koncentrationen 4,9 mg/ml
- Standardkurva med spädning 1:3,5 mellan punkterna: rCan f 5 i koncentrationen 0.50, 0.14, 0.041, 0.012, 0.0033 och 0.00095 µg/ml
- Urinproverna analyserades utan föregående avsättning ospädda samt i spädningen 1:300, 1:600 och 1:1200

- Analysinstrumentet Phadia 100 användes

Spädning av konjugatet

Koncentrationen i konjugatets stamlösning var 0,12 mg/ml. För varje körning behövdes 3 ml konjugatlösning i koncentrationen 1 µg/ml. 25 µl konjugatlösning + 2975 µl konjugatbuffert = 3 ml konjugatlösning i koncentrationen 1 µg/ml.

Spädning av standardkurvan

En stamlösning av rCan f 5 i koncentrationen 4,9 mg/ml (#504) användes. Eftersom denna koncentration var för hög för att kunna få hanterbara volymer vid spädning av standardkurvan gjordes en förspädning genom att ta 25 µl stamlösning + 975 µl mus-IgG-diluent = 1 ml i koncentrationen 122,5 µg/ml. Första punkten på kurvan (0,5 µg/ml) togs fram genom att ta 36,7 µl av förspädningen i koncentrationen 122,5 µg/ml + 8963,3 µl mus-IgG-diluent. Detta medförde 9 ml i koncentrationen 0,5 µg/ml. Övriga punkter på standardkurvan togs fram genom spädning på 1:3,5 (2400 µl av föregående punkt + 6000 µl av mus-IgG-diluent). Genom att späda på detta sätt fanns tillräckligt med lösning för att köra sex omgångar utan att behöva flytta standardkurvas prover från ett instrument till ett annat.

Spädning av urinproverna

Varje urinprov analyserades i ospädd form samt i tre olika spädningar. Detta utfördes för att de urinprover med en hög koncentration av Can f 5 skulle hamna inom standardkurvas dynamiska område. Spädning medför även att en eventuell hook-effekt kan upptäckas. Vid en hook-effekt erhålls falskt låga responser på grund av mycket höga koncentrationer av det analyserade ämnet. Om man vid spädning får ökade responser istället för sänkta så har en hook-effekt påvisats.

För att få spädningen 1:300 blandades 8 µl urin med 2392 µl mus-IgG-diluent. Detta medförde 2400 µl i spädningen 1:300. För nästa spädning på 1:600 togs 600 µl av spädningen på 1:300 + 600 µl mus-IgG-diluent. 600 µl av spädningen på 1:600 + 600 µl mus-IgG-diluent gav en spädning på 1:1200.

Analys av urinproverna i Phadia 100

Phadia 100 rymmer 48 prover i en körning. Den framtagna standardkurvan bestod av sex punkter samt ett "nollprov" bestående av ren mus-IgG-diluent. Vid varje körning analyserades punkterna till standardkurvan och nollprovet två gånger (totalt 14 prover). Resterande 34 platser i varje instrument fylldes upp av urinproverna i sin respektive spädning.

Efter att alla urinprover analyserats en gång valdes den spädning från respektive prov ut som låg närmast mitten på standardkurvan. Denna spädning kördes därefter en gång till varvid två responser (RU) och därmed även två koncentrationer för samma spädning på ett urinprov erhöles. Koncentrationen av Can f 5 i varje urinprov beräknades slutligen genom att ta medelvärde av dessa två koncentrationer.

Statistisk bearbetning

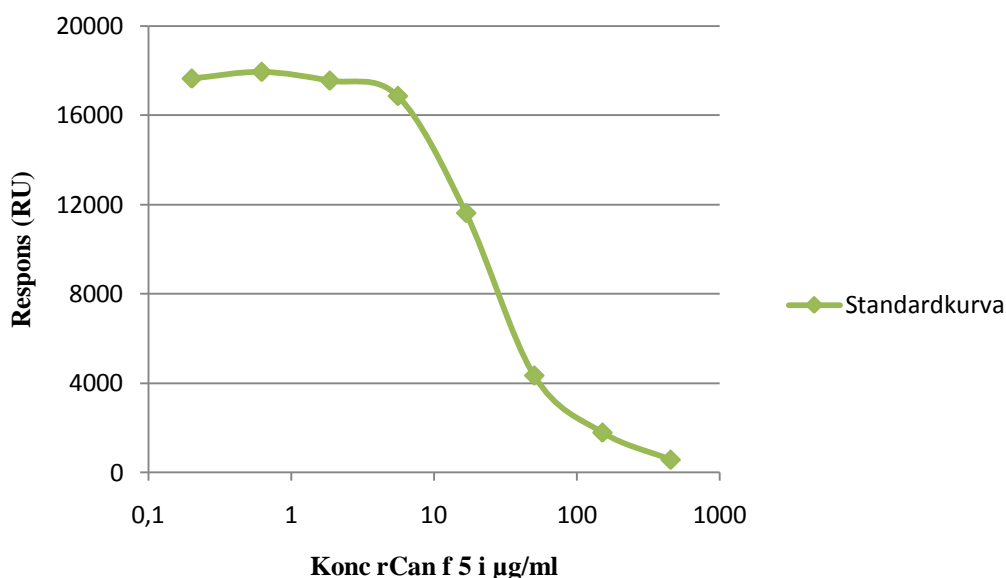
Vid jämförelse av skillnaden i Can f 5 koncentration beroende på kön och ras användes Mann-Whitney U-test. För beräkningen av sambanden mellan urinprovsmängd/koncentration respektive ålder/koncentration användes korrelationsanalys och dessa beräkningar utfördes med logaritmerade värden (naturlig logaritm) på koncentrationen av Can f 5. Detta för att få en mer normalfördelad population.

Genom att sammanställa nollproverna (proverna med ren buffertlösning) från varje körning kunde en LoD (Limit of Detection) beräknas. Vid beräkningen användes formlerna $LoB = \text{mean}_{\text{blank}} + 1,645 \cdot SD_{\text{blank}}$ och $LoD = LoB + 1,645 \cdot SD_{\text{low concentration sample}}$.

RESULTAT

Test av inhibitionsassay

De första testerna som genomfördes vid utvecklingen av en assay för Can f 5 var på en inhibitionsassay. Den fasta fasen som användes var rekombinant Can f 5 och antikroppen mAb cl 1038. Inhibitorn (rCan f 5) späddes i trisbuffert till åtta olika koncentrationer och antikroppen späddes till 20 µg/ml i mus-IgG-diluent. En av standardkurvorna som erhöles vid testerna redovisas nedan (se figur 3).



Figur 3. Standardkurvan vid test av en inhibitionsassay (logaritmerad x-axel).

Slutsatsen var att inhibitionsassayen i detta test hade ett dynamiskt område på cirka 8-450 µg/ml och därmed en relativ hög koncentration på den lägsta punkten på standardkurvan (se figur 3). I de andra testerna på inhibitionsassayen var det dynamiska området liknande och koncentrationen på den lägsta standardpunkten hög.

Eftersom ett syfte med studien var att undersöka koncentrationen av Can f 5 hos tıklar (vilka förväntas ha en låg/obefintlig koncentration) var det inte optimalt att

ligga så högt i den lägsta mätbara koncentrationen. Detta resulterade i att en sandwich assay istället utvecklades och optimerades för användning till urinprovsanalyserna.

Optimering av sandwich assay för Can f 5

Vid optimeringen av den sandwich assay som sedan användes till urinprovanalyserna utfördes en rad olika tester. Resultatet av ett urval av dessa tester redovisas i denna uppsats.

Utformning av standardkurvan

Jämförelse av olika fasta faser

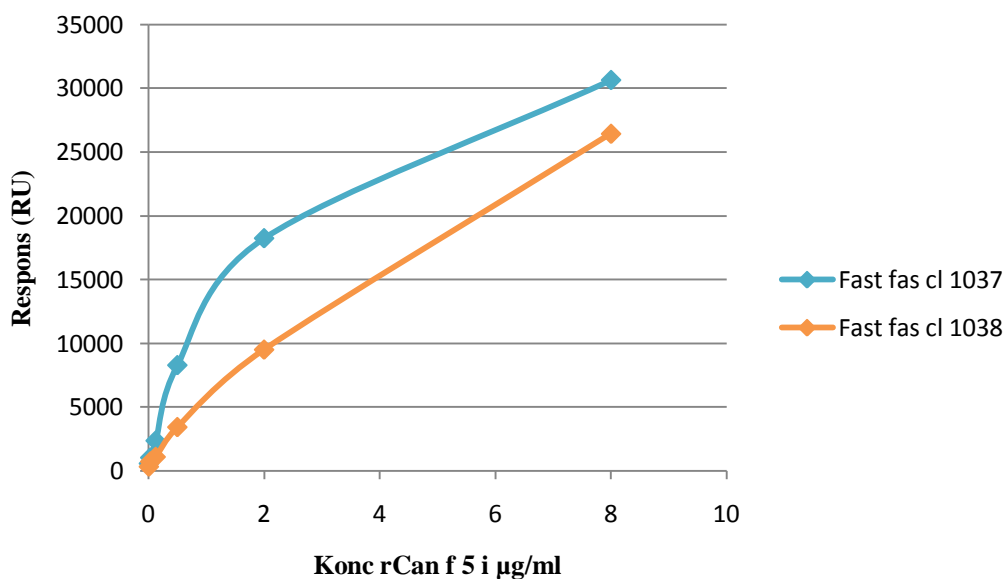
Som en inledning i optimeringen av sandwich assayen jämfördes standardkurvas utseende beroende på val av fast fas. Den buffertlösning som användes var trisbuffert och konjugatet hade en koncentration på 1 µg/ml. Två olika fasta faser testades (anti Can f 5 clone 1037 respektive clone 1038). En standardkurva med rekombinant Can f 5 (rCan f 5) späddes till sex olika koncentrationer och responsen beroende på fast fas jämfördes (se tabell 1).

Tabell 1. Jämförelse av standardkurvan vid användning av olika fasta faser

Konc rCan f 5 i µg/ml	Respons (RU*)	
	Clone 1037	Clone 1038
8,0	30618	26431
2,0	18226	9518
0,50	8283	3449
0,13	2370	1114
0,031	1045	744
0,0078	585	352
Ren trisbuffert	465	309
Ren konjugatbuffert	273	197

* RU = Response Units.

Vid användning av clone 1038 som fast fas blev resultatet en jämnare ökning av responsen på standardkurvan än med clone 1037 (se figur 4). Clone 1038 valdes därför ut som fast fas till assayen och användes även i de följande optimeringstesterna.



Figur 4. Standardkurvan vid användning av olika fasta faser.

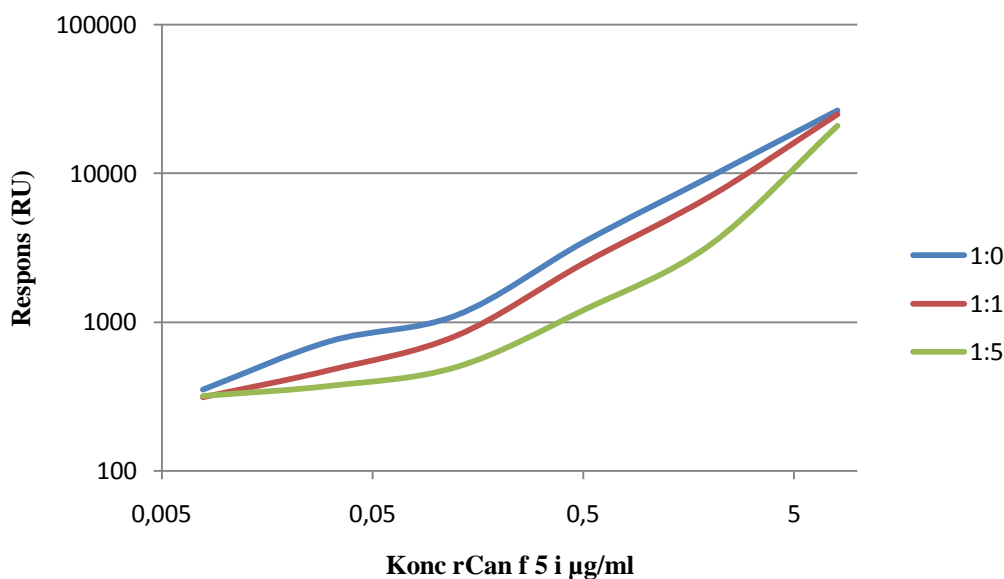
Kontroll av responsen genom tillsats av ren kall antikropp

Här jämfördes standardkurvas utseende med eller utan tillsats av ren kall antikropp (#3883) i konjugatet. Ren kall antikropp är en ej enzymkonjugerad antikropp. Som buffert användes trisbuffert. Konjugatet var i koncentrationen 1 µg/ml utan tillblandning av antikroppen. Generellt blev responsen på standardpunkterna lägre ju mer kall antikropp som tillsatts i konjugatet (se tabell 2).

Tabell 2. Standardkurvan med eller utan tillsats av kall antikropp

Konc rCan f 5 i µg/ml	Respons (RU) – konjugat:kall antikropp		
	1:0	1:1	1:5
8,0	26431	24869	20949
2,0	9518	7026	3326
0,50	3449	2488	1205
0,13	1114	815	499
0,031	744	478	372
0,0078	352	314	318
Ren trisbuffert	309	298	287
Ren konjugatbuffert	197	221	182

Utan inblandning av kall antikropp fick standardkurvan en jämnare ökning av responsen över koncentrationsintervallet (se figur 5). När kall antikropp blandades i konjugatet blev kurvan flackare i de låga koncentrationerna och brantare i de högre koncentrationerna. Detta särskilt vid en större inblandning av kall antikropp. Eftersom standardkurvas utseende var jämnare utan tillsats av kall antikropp så användes det heller inte vid de resterande optimeringstesterna samt urinprovsanalyserna. Den utvalda konjugatkoncentrationen blev därmed 1 µg/ml.



Figur 5. Jämförelse av standardkurvan med eller utan tillsats av kall antikropp (logaritmerade axlar).

Standardkurvan vid användning av nativt och rekombinant Can f 5

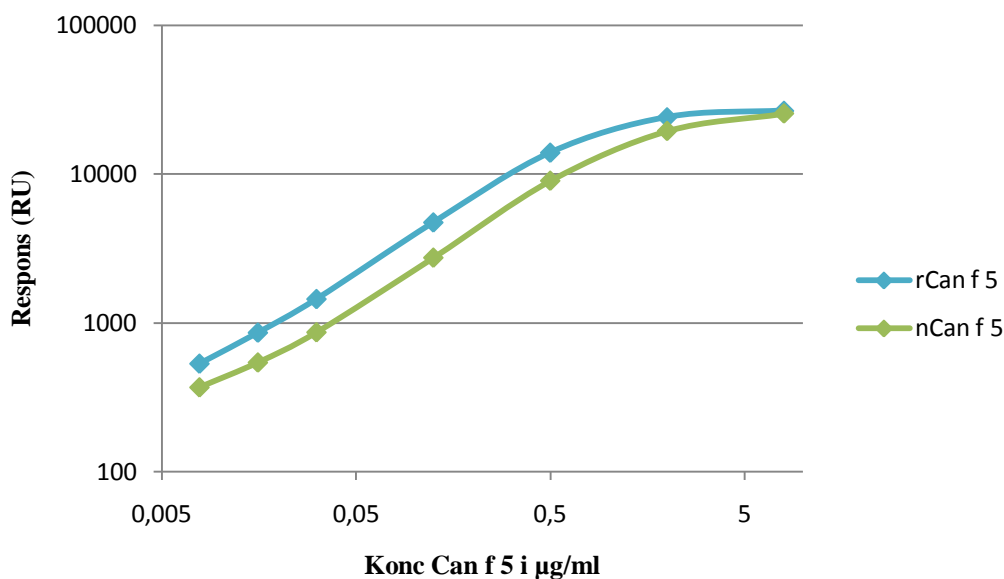
Vid analys av de insamlade urinproverna analyseras Can f 5 i nativ form. Standardkurvan består dock av rekombinant Can f 5. I detta test jämfördes responsen på standardkurvan vid användning av nativt Can f 5 (nCan f 5) respektive rekombinant Can f 5 (rCan f 5) för att se huruvida det var en skillnad i respons beroende på vilken form av Can f 5 som användes. Även den procentuella skillnaden i respons vid upprepade analyser av samma standardpunkt jämfördes (se tabell 3). Som buffert användes IgE-diluent och konjugatet var i koncentrationen 1 µg/ml.

Tabell 3. Jämförelse mellan rekombinant och nativt Can f 5

Konc Can f 5 i µg/ml	Rekombinant Can f 5		Nativt Can f 5	
	Respons (RU)	Skillnad i %	Respons (RU)	Skillnad i %
8,0	26675	1,1	25532	0,9
2,0	24115	3,0	19482	0,8
0,50	13955	2,0	9018	2,3
0,13	4739	3,6	2743	1,5
0,031	1447	3,7	865	0,9
0,016	860	4,2	542	6,3
0,0078	532	2,4	369	6,6
Ren IgE-diluent	191	2,3	191	2,3

Standardkuvans utseende (lutning) skiljde sig inte nämnvärt beroende på om nativt eller rekombinant Can f 5 använts (se figur 6). Dock var kurvan vid användning av nativt Can f 5 parallellförskjuten eftersom standardpunkterna generellt hade en lägre respons än för rekombinant Can f 5. För beräkning av

absoluta koncentrationer av Can f 5 i ett urinprov skulle därmed en korrigeringsfaktor avseende denna förskjutning vara nödvändig.



Figur 6. Jämförelse av responsen vid användning av rekombinant respektive nativt Can f 5 (logaritmerade axlar).

Jämförelse av olika buffertar

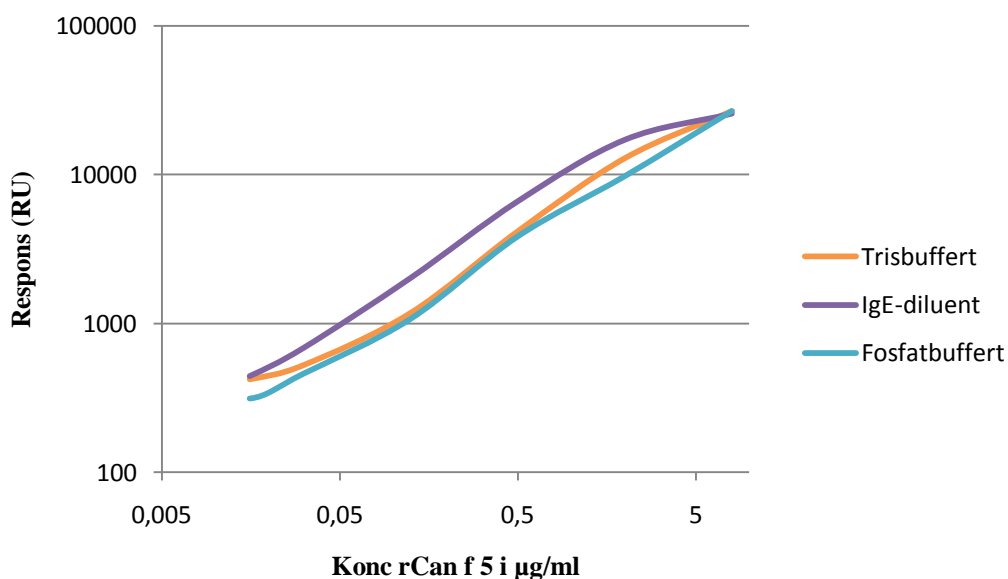
För att välja en lämplig buffert till sandwich assayen testades olika buffertar vid tillverkningen av en standardkurva. De olika standardkurvorna (beroende på buffert) jämfördes sedan.

Först testades tre buffertar; trisbuffert, IgE-diluent och fosfatbuffert (se tabell 4). Av dessa hade IgE-diluents lägst bakgrundsvärde vilket medförde att denna buffert genererade ett bredare dynamiskt område för standardkurvan och en möjlighet att komma lägre ner i koncentration eftersom det blev en signifikant skillnad mellan nollprovet (ren buffert) och den lägsta punkten på standardkurvan.

Tabell 4. Jämförelse av standardkurvan beroende på buffert

Konc rCan f 5 i µg/ml	Respons (RU)		
	Trisbuffert	IgE-diluent	Fosfatbuffert
8,0	26701	25795	26780
2,0	12869	17186	9764
0,50	4154	6619	3836
0,13	1177	2019	1070
0,031	526	683	458
0,016	423	442	312
0,0078	371	315	386
Ren buffert	331	189	291

Standardkurvan fick även en något jämnare ökning av responsen över koncentrationsintervallet vid användning av IgE-diluent i jämförelse med tris- respektive fosfatbuffert (se figur 7).



Figur 7. Jämförelse av standardkurvan beroende på buffert (logaritmerade axlar).

Även den procentuella skillnaden i respons vid upprepade analyser av samma standardpunkter jämfördes mellan de olika buffertarna (se tabell 5). IgE-diluents medförde en mindre skillnad än övriga buffertar vilket resulterade i ett mer tillförlitligt analysresultat.

Tabell 5. Procentuell skillnad i respons vid upprepade analyser av samma standardkurva

Konc rCan f 5 i µg/ml	Procentuell skillnad i respons (RU)		
	Trisbuffert	IgE-diluent	Fosfatbuffert
8,0	0,5	0,7	0,2
2,0	18	2,1	11
0,50	20	4,5	1,2
0,13	15	2,4	6,1
0,031	7,7	2,2	3,0
0,016	5,2	0,2	34
0,0078	5,4	7,1	5,1
Ren buffert	12	1,9	6,8

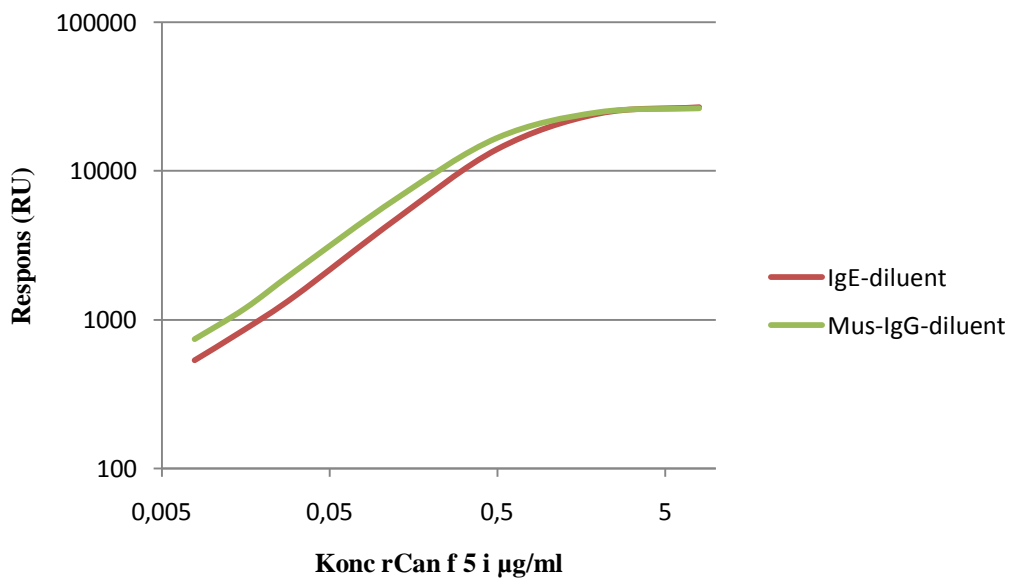
Vid test av trisbuffert, IgE-diluent och fosfatbuffert var slutsatsen att IgE-diluents gav bäst resultat och hade högst tillförlitlighet. IgE-diluent innehåller dock EDTA vilket skulle kunna störa analysen av Can f 5 eftersom det binder upp tvåvärdade joner. I och med detta gjordes ytterligare ett bufferttest då IgE-diluents jämfördes med mus-IgG-diluent (se tabell 6). Förutom vid analysen av nollprovet (ren buffertlösning) så hade mus-IgG-diluents lägst procentuell skillnad vid

upprepade analyser av samma standardpunkt. IgE-diluenten hade dock ett lägre bakgrundsvärde än mus-IgG-diluenten.

Tabell 6. Jämförelse av standardkurvan beroende på buffert

Koncentration i µg/ml	IgE-diluent		Mus-IgG-diluent	
	Respons (RU)	Skilnad i %	Respons (RU)	Skilnad i %
8,0	26675	1,1	26389	0,6
2,0	24115	3,0	24829	1,1
0,50	13955	2,0	16741	0,5
0,13	4739	3,6	6538	0,2
0,031	1447	3,7	2140	0,2
0,016	860	4,2	1196	3,2
0,0078	532	2,4	744	3,5
Ren buffert	191	2,3	260	21

Standardkurvorna för mus-IgG-diluenten respektive IgE-diluenten följde varandra relativt väl men kurvan blev något flackare i de högre koncentrationerna vid användning av mus-IgG-diluent (se figur 8). Sammanfattningsvis så var IgE-diluenten eventuellt något bättre än mus-IgG-diluenten, men eftersom den innehåller EDTA valdes istället mus-IgG-diluenten ut som buffert till assayen och användes även i de följande optimeringstesterna.



Figur 8. Jämförelse av standardkurvan beroende på buffert (logaritmerade axlar).

Urinprovstester

Test på avsaltade / ej avsaltade urinprover i olika spädningar

I detta test undersöktes skillnaden i respons mellan avsaltade och ej avsaltade urinprover för att se huruvida det fanns något i urinproverna som stör analysen och därför resulterar i falskt höga/låga responser.

Urinprover från tre beaglehanar analyserades i fyra olika spädningar både före och efter avsaltning (se tabell 7). Spädning ner till 1:80 räckte dock inte för att få in responserna på standardkurvan varvid ytterligare en spädningsserie utfördes (se tabell 8).

Tabell 7. Jämförelse mellan avsaltade / ej avsaltade urinprover i olika spädningar

Spädning	Respons (RU)					
	Beagle 1		Beagle 2		Beagle 3	
	Ej avsaltat	Avsaltat	Ej avsaltat	Avsaltat	Ej avsaltat	Avsaltat
1:10	23883	24357	24297	24351	24210	25368
1:20	24469	23276	24655	24274	23030	22819
1:40	23055	22370	24767	22102	22736	21999
1:80	20283	19505	21934	22349	21033	19772

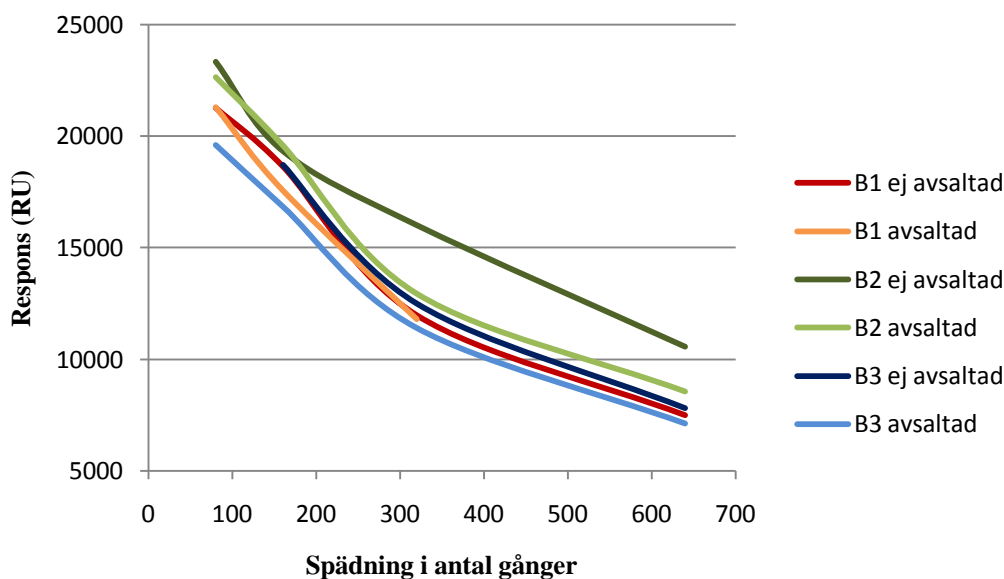
Tabell 8. Jämförelse mellan avsaltade / ej avsaltade urinprover i olika spädningar

Spädning	Respons (RU)					
	Beagle 1		Beagle 2		Beagle 3	
	Ej avsaltat	Avsaltat	Ej avsaltat	Avsaltat	Ej avsaltat	Avsaltat
1:80	21277	21282	23336	22654	*	19609
1:160	18657	17562	19337	19599	18719	16854
1:320	11984	11794	16003	12947	12492	11410
1:640	7509	*	10554	8565	7809	7133

* En respons kunde inte utläsas för dessa prover.

Generellt var responsen lägre hos de avsaltade urinproverna jämfört med samma spädning hos prover som inte avsaltats (se tabell 8 och figur 9). De två kurvorna för respektive urinprov följde varandra relativt väl med undantag för prov B2 (se figur 9).

De avsaltade urinproverna gav en lägre respons än de som inte avsaltats vilket medförde slutsatsen att det inte fanns något i urinproverna som skulle kunna skapa falskt låga värden vid analysen. Det gick även att konstatera att avsaltning resulterar i en förlust av en viss andel av det mätbara Can f 5 som finns i ett urinprov. I och med detta så valdes avsaltning av urinproverna bort, både vid optimeringen och den slutgiltiga analysen.



Figur 9. Jämförelse mellan avsaltade / ej avsaltade urinprover i olika spädningar.

Beräkning av koncentrationen av Can f 5 efter spädning av urinproverna

Genom att använda responsen hos de ej avsaltade urinproverna i tabell 8 kunde en beräkning av ursprungskoncentrationen av Can f 5 i varje urinprov göras (se tabell 9). Syftet med detta var att se vid vilka spädningar som de urinprover med förväntat höga koncentrationer av Can f 5 fick en respons som hamnade väl inom standardkurvas intervall. Genom spädningen kunde en eventuell hook-effekt även utvärderas.

Det var främst de två lägsta spädningarna (1:320 och 1:640) som kunde anses tillförlitliga då det endast var dessa som med god marginal hamnade inom standardkurvas gränser. Responsen vid spädning kunde fås tillbaka relativt väl så länge den låg inom standardkurvas mätområde. Skillnaden i beräknad koncentration mellan spädningarna 1:320 och 1:640 hamnade på cirka 5%. Detta säkerställde att spädning av urinproverna kunde utföras utan att den beräknade koncentrationen av Can f 5 avvek särskilt mycket från koncentrationen i det ospädda urinprovet.

En spädning av urinproverna i detta test med cirka 300 och 600 gånger medförde att responsen hamnade inom standardkurvas intervall (se tabell 9). Det fanns dock fortfarande marginal för ytterligare spädning och de spädningar som därför valdes till de slutgiltiga urinprovsanalyserna var 1:300, 1:600 och 1:1200. Ingen hook-effekt kunde ses.

Tabell 9. Beräknade koncentrationer av Can f 5 i ej avsaltade urinprover från tabell 8

Spädning	Beagle 1		Beagle 2		Beagle 3	
	Respons (RU)	Can f 5 i $\mu\text{g/ml}$	Respons (RU)	Can f 5 i $\mu\text{g/ml}$	Respons (RU)	Can f 5 i $\mu\text{g/ml}$
1:80	21277*	40	23336*	56	-	-
1:160	18657	57	19337	61	18719	57
1:320	11984	53	16003	84	12492	56
1:640	7509	56	10554	88	7809	59

* Responsen för dessa mätningar ligger utanför standardkurvans mätområde och den beräknade koncentrationen är därför inte tillförlitlig.

Kontroll av responsen hos "negativa" urinprover vid spetsning

Genom att spetsa negativa urinprover kunde eventuella störningar i urinproverna utvärderas. Störningar skulle kunna resultera i falskt höga/låga responser och därmed ge missvisande utslag vid analysen av urinproverna.

För detta test valdes urinprover från två pudeltikar ut (där det förväntas en mycket låg respons). Dessa urinprover spetsades sedan med rekombinant Can f 5 i känd koncentration (se tabell 10). Bakgrundsvärdet hos de ospetsade urinproverna var mycket lågt vilket medförde slutsatsen att det inte fanns något i urinproverna som skulle kunna resultera i falskt höga responser.

Tabell 10. Respons vid spetsning av urinprover från två pudeltikar

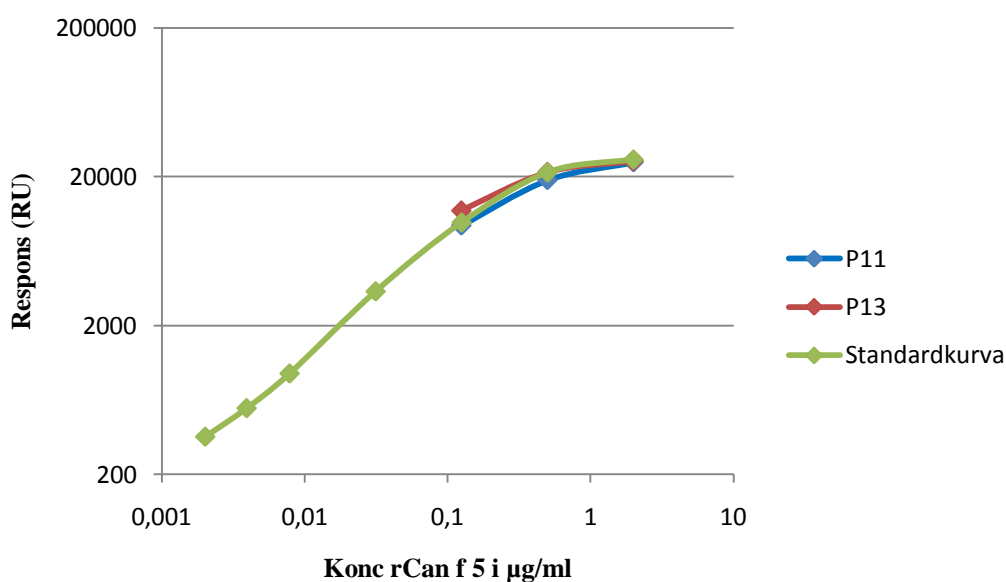
Spetsad konc av rCan f 5 i $\mu\text{g/ml}$	Respons (RU)	
	Pudelprov 11	Pudelprov 13
2,0	25024	25407
0,50	18981	21387
0,13	9393	11844
0	116	95

För att kunna kontrollera responsen hos de spetsade urinproverna upprättades en standardkurva med samma koncentrationer av rekombinant Can f 5 som vid spetsningen samt ytterligare några punkter (se tabell 11). Den procentuella skillnaden i respons vid upprepade analyser av samma punkter på standardkurvan noterades också. Denna var generellt låg med undantag för den rena buffertlösningen som var något högre.

Tabell 11. Standardkurva för jämförelse av responsen hos de spetsade urinproverna

Konc rCan f 5 i $\mu\text{g/ml}$	Respons (RU)	Skillnad i %
2,0	26091	0,4
0,50	21354	0,2
0,013	9834	1,5
0,031	3384	0,04
0,0078	948	2,8
0,0039	554	3,4
0,0020	356	4,9
Ren mus-IgG-diluent	168	9,8

De spetsade urinproverna gav en respons som passade väl in på standardkurvan (se figur 10). Det gick därför att utesluta att det fanns något i dessa (så kallade negativa) urinprover som stör analysen och därför resulterar i falskt låga responser.



Figur 10. Respons vid spetsning av urinprover från två pudeltikar (logaritmerade axlar).

Utvärdering av tillförlitligheten hos standardkurvan och instrumenten

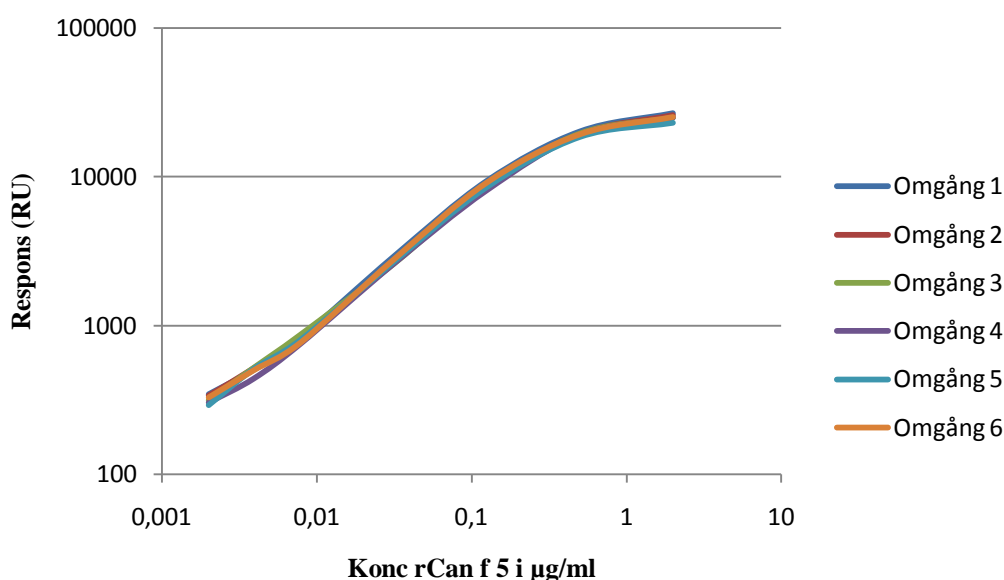
Kontroll av upprepbarheten hos punkterna på standardkurvan

För att säkerställa en tillförlitlig standardkurva gjordes upprepade analyser av punkterna på kurvan genom användning av samma prover (se tabell 12).

Tabell 12. Kontroll av upprepbarheten hos punkterna på standardkurvan

Konc rCan f 5 i $\mu\text{g/ml}$	Respons (RU) vid de olika omgångarna					
	1	2	3	4	5	6
2,0	26652	26027	24982	24891	22916	25240
0,50	20073	19499	19514	19058	18414	19298
0,13	9335	8887	8616	8092	8472	9124
0,031	2896	2636	2587	2596	2667	2766
0,0078	822	841	863	753	799	763
0,0039	504	518	518	441	512	499
0,0020	346	340	315	305	293	328
Ren mus-IgG-diluent	204	172	154	141	177	155

Standardkurvan vid de olika omgångarna uppvisade en mycket liten variation (se figur 11). Felmarginalen blev därför låg och standardkurvan kunde anses tillförlitlig.



Figur 11. Jämförelse av upprepbarheten hos punkterna på standardkurvan vid flera körningar (logaritmerade axlar).

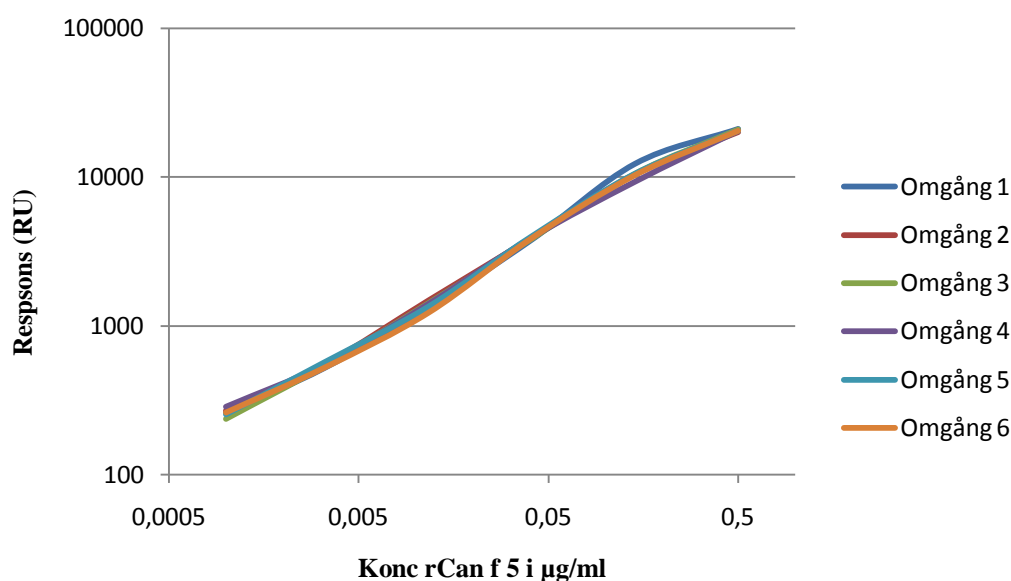
Vid tidigare analyser av standardkurvan hade punkterna på kurvan inte samma spädningsintervall. Det fanns även punkter som hamnade utanför standardkurvans mätområde. Exempelvis en koncentration av rCan f 5 på 2 $\mu\text{g/ml}$ (se figur 11) låg utanför och valdes därför bort som standardpunkt.

För att underlätta inför de slutgiltiga urinprovsanalyserna, samt få punkter med samma intervall, testades standardkurvans upprepbarhet ytterligare en gång men nu med andra koncentrationer på punkterna (se tabell 13). De standardpunkter som valdes ut hade en koncentration som låg inom standardkurvans dynamiska område. Spädningsintervallet som testades var 1:3,5.

Tabell 13. Kontroll av upprepbarheten hos punkterna på standardkurvan

Konc rCan f 5 i $\mu\text{g/ml}$	Respsns (RU) vid de olika omgångarna					
	1	2	3	4	5	6
0,50	21155	20146	20895	20502	20504	20393
0,14	12318	10445	10537	9315	10560	10278
0,041	3812	3920	3865	3936	4023	3889
0,012	1330	1485	1424	1406	1355	1225
0,0033	520	550	538	548	571	522
0,00095	261	269	237	285	255	261
Ren mus-IgG-diluent	186	187	141	177	151	171

Även denna gång var standardkurvans variation relativt liten mellan de olika omgångarna (se figur 12). Ingen hook-effekt kunde utläsas varken vid detta test eller i något av de andra testerna som genomförts på sandwich assayen. Standardkurvans dynamiska område var cirka 0,001-0,5 $\mu\text{g/ml}$ och de standardpunkter som testades vid denna körning var de som valdes ut för att användas vid den slutgiltiga analysen av urinproverna.



Figur 12. Jämförelse av upprepbarheten hos punkterna på standardkurvan vid flera körningar (logaritmerade axlar).

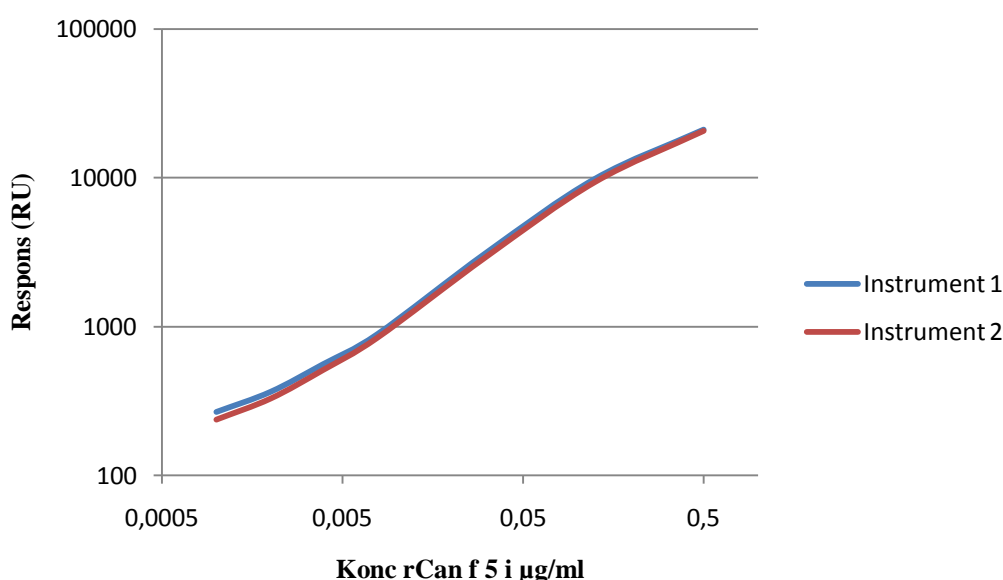
Jämförelse av standardkurvan vid användning av olika instrument

För att spara tid så utfördes den slutgiltiga analysen av urinproverna i flera olika Phadia 100 instrument. I detta test kontrollerades att responsen hos punkterna på standardkurvan var oberoende av vilket instrument som användes (se tabell 14). Den procentuella skillnaden vid upprepade analyser av samma standardpunkter skiljde sig inte nämnvärt mellan de olika instrumenten.

Tabell 14. Jämförelse av standardkurvan beroende på instrument

Konc rCan f 5 i µg/ml	Instrument 1		Instrument 2	
	Respons (RU)	Skillnad i %	Respons (RU)	Skillnad i %
0,50	21082	4,1	20711	2,3
0,13	9846	3,2	9386	5,8
0,031	3138	3,4	2955	2,9
0,0078	890	4,4	845	2,5
0,0039	559	6,3	513	9,5
0,0020	365	5,6	330	6,2
0,00098	267	7,5	238	4,7
Ren mus-IgG-diluent	167	4,5	155	11

Standardkurvans utseende skiljde sig endast marginellt beroende på vilket instrument som användes (se figur 13). Detta säkerställde att användning av olika instrument vid analysen av urinproverna inte medförde en ökad felmarginal.



Figur 13. Jämförelse av standardkurvan vid användning av olika instrument (logaritmerade axlar).

Analys av insamlade urinprover

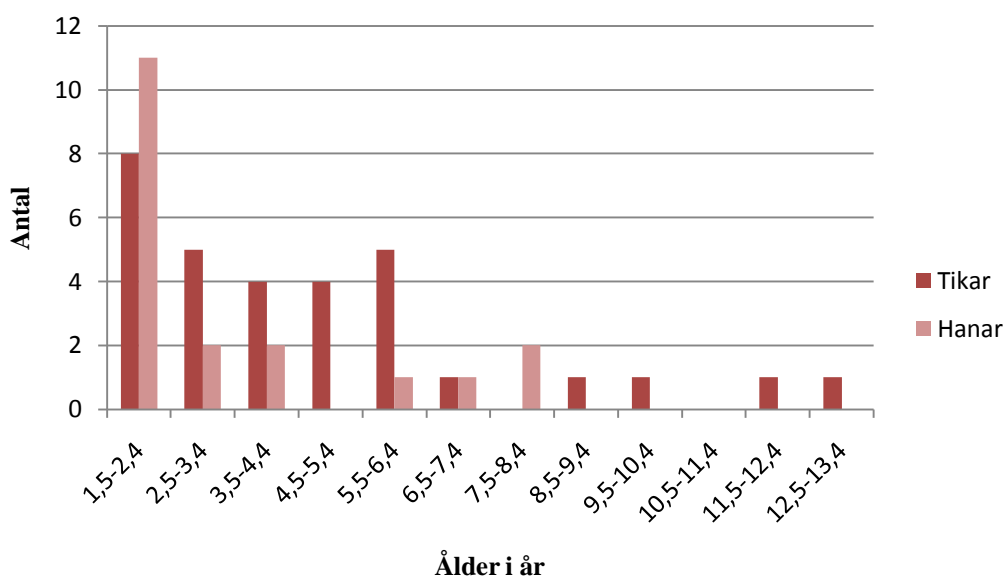
Översikt över insamlade urinprover

Totalt samlades 50 urinprover in varav 35 från pudlar och 15 från schäfrar (se tabell 15). 31 urinprover var från tikar med fördelningen 24 pudlar och 7 schäfrar. Kön fördelningen inom respektive ras var jämnare hos schäfrarna än hos pudlarna. Två av pudeltikarna var kirurgiskt kastrerade sedan två år tillbaka men alla schäfertikar var okastrerade. Endast en av totalt 19 hanhundar var kastrerad. Denna hund var en pudelhane och hade kastrerats på farmakologisk väg (med Suprelorinchip) sex månader tidigare.

Tabell 15. Översikt över insamlade urinprover

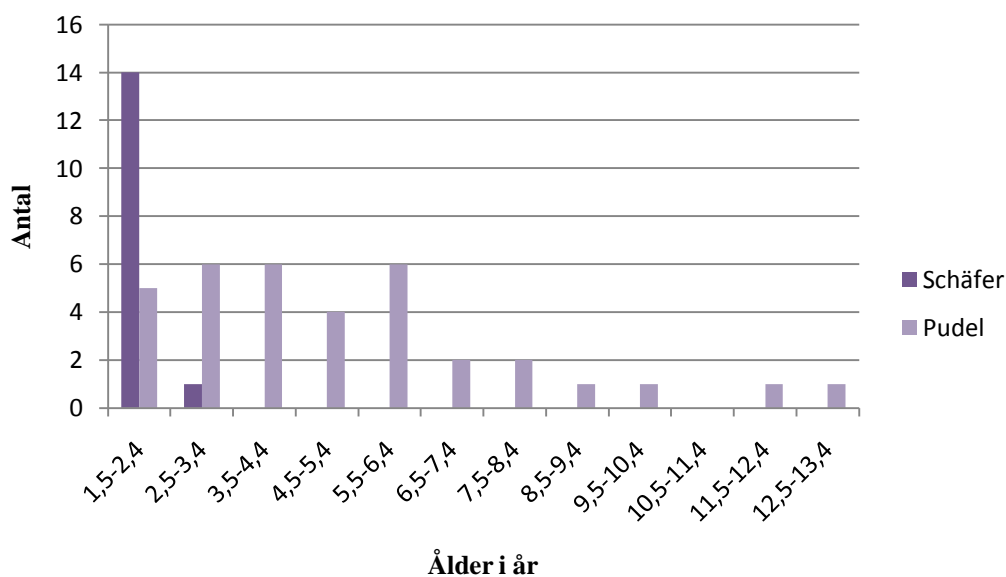
	Pudel	Schäfer
Tik	24	7
Okastrerad	22	7
Kastrerad	2	0
Hane	11	8
Okastrerad	10	8
Kastrerad	1	0
Summa	35	15

Majoriteten av hundarna var unga till medelålders (se figur 14). Åldersfördelningen var något jämnare hos tikarna än hos hanarna eftersom 11 av totalt 19 hanhundar var yngre än 2,5 år. Den äldsta hanhunden var 8,4 år gammal. Det var även denna hund som var den enda kastrerade hanen. Den äldsta tiken var 12,7 år gammal och var en av två kastrerade tikar. Den andra kastrerade tiken hade en ålder på 9,3 år. Den genomsnittliga medelåldern för alla hundar var 4,2 år. Hanhundarna hade en medelålder på 3,4 år medan tikarnas medelålder var 4,7 år.



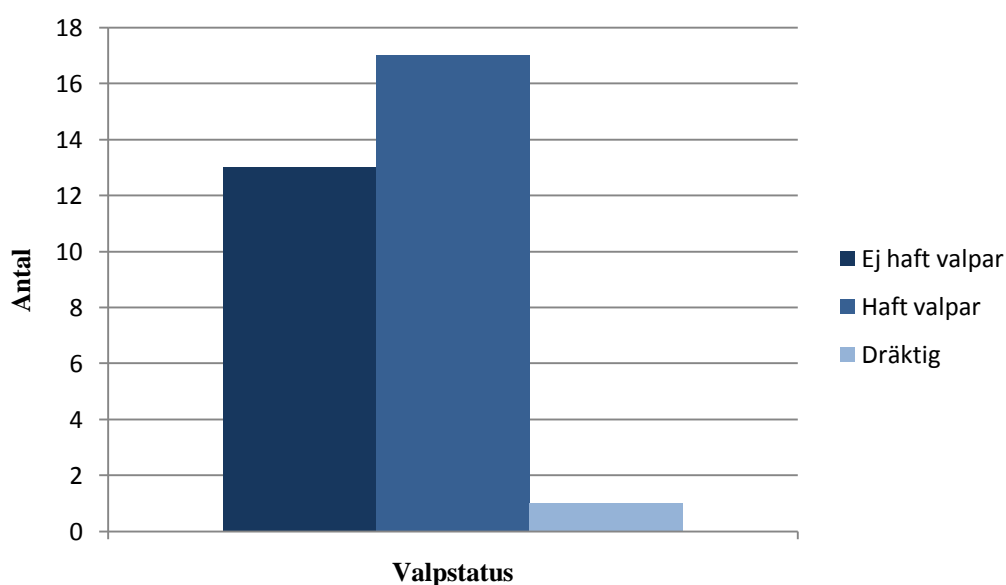
Figur 14. Åldersfördelning med avseende på kön.

Urinproverna från schäfrarna var insamlade från Försvarmaktens hundtjänstenhet i Rosersberg. Här befinner sig hundarna tills de är färdigtränade varpå de slussas ut till bland annat polisstationer och förband. I och med detta så var åldern på schäfrarna som deltog i denna studie låg. Detta återspeglas i jämförelsen av ålder beroende på ras (se figur 15). Av totalt 15 insamlade schäferprover så var 14 yngre än 2,5 år. Spridningen i ålder var betydligt större hos pudlarna vilka hade en medelålder på 5,2 år.



Figur 15. Åldersfördelning med avseende på ras.

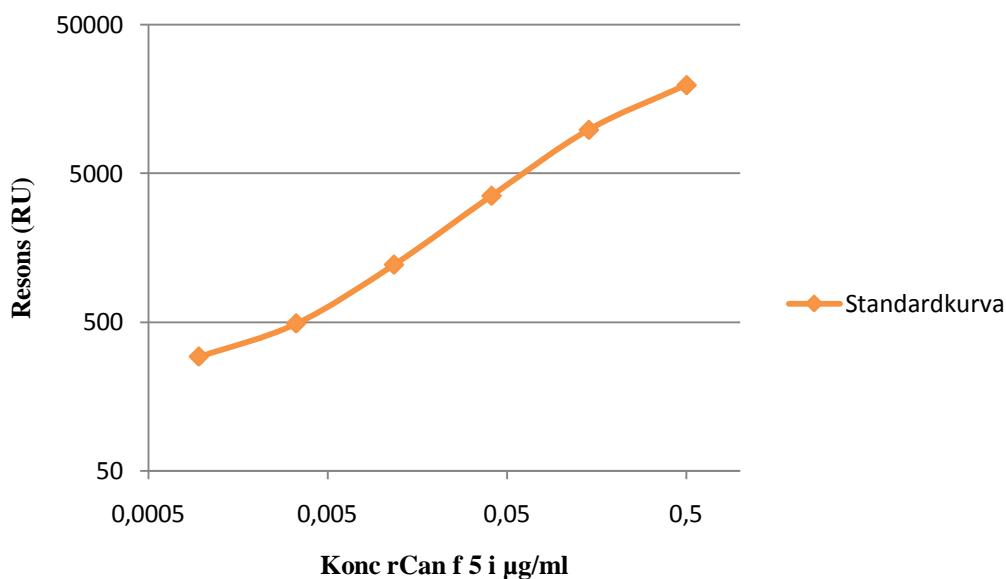
Av de insamlade urinproverna från tikar så var, som tidigare nämnts, två av totalt 31 tikar kasttrade. 13 tikar hade aldrig haft valpar medan 17 hade fått åtminstone en valpkull (se figur 16). Vid provtagningen var en tik dräktig med sin första kull valpar.



Figur 16. Jämförelse av tikarnas valpstatus.

Standardkurvan

Vid urinprovsanalyserna användes en standardkurva vars utformning tagits fram genom optimering av en sandwich assay. Totalt kördes åtta omgångar med urinprover vilket även resulterade i åtta olika standardkurvor. För varje enskild punkt på standardkurvorna beräknades ett medelvärde vilket sedan användes för att skapa en genomsnittlig standardkurva (se figur 17).



Figur 17. Genomsnittlig standardkurva (logaritmerade axlar).

Genom att sammanställa nollproverna (proverna med ren buffertlösning) från varje körning kunde en LoD (Limit of Detection) beräknas. LoD för denna studie var resonsen (RU) 297. Detta motsvarar en koncentration av Can f 5 på cirka 0,001 µg/ml.

Redovisning av responser och koncentrationer

Alla urinprover analyserades i ospädd form samt i spädningen 1:300, 1:600 och 1:1200, och en resons (RU) för varje urinprov erhöles (se tabell 16, 17 och 18). Efter att urinproverna analyserats en gång valdes den spädning för respektive prov ut som låg närmast mitten på standardkurvan. Denna spädning kördes därefter ytterligare en gång. För hundarna med providentitet S14 och S15 valdes dock en spädning ut redan innan första analysen och denna spädning analyserades två gånger direkt i samma körning för att spara tid. De responser i tabell 16, 17 och 18 som är markerade med fet stil är medelvärden från de två körningarna och koncentrationen av Can f 5 är beräknad från dessa medelvärden.

För tikarna blev den valda spädningen det ospädda provet eftersom ingen skillnad i resons kunde utläsas mellan det provet och proverna vid de olika spädningarna (se tabell 16, 17 och 18). Alla hanhundar utom tre hade bäst resons vid spädning 1:1200 och denna spädning valdes ut hos dessa hundar. En pudelhane med providentitet P34 samt en schäferhane med providentitet S15 fick en bättre resons vid spädningen 1:300. För pudelhanen valdes denna spädning ut för ytterligare en körning men för schäferhanen hade två körningar med spädningen 1:1200 redan utförts varpå ingen ytterligare analys gjordes. En pudelhane med providentitet P8 (den enda kastrerade hanhunden) hade responser som liknade tikarnas och för denna hund valdes därför det ospädda provet ut för ytterligare en körning.

Tabell 16. Respons (RU) och koncentration hos pudelproverna

Prov-ID	Kön	Spädning				Beräknad Can f 5 koncentration i µg/ml
		Ospädd	1:300	1:600	1:1200	
P1	Hane	23894	7533	4386	2480	32
P2	Tik	174	193	200	187	≤ 0,001
P3	Tik	159	190	188	189	≤ 0,001
P7	Hane	21763	13115	8317	5235	76
P8	Hane*	186	195	185	178	≤ 0,001
P9	Hane	22967	8965	5318	3066	41
P10	Tik	148	194	179	191	≤ 0,001
P11	Tik*	141	175	185	186	≤ 0,001
P12	Tik	144	204	214	201	≤ 0,001
P13	Tik*	151	195	192	199	≤ 0,001
P15	Tik	150	195	200	195	≤ 0,001
P17	Tik	152	190	188	189	≤ 0,001
P18	Tik	156	197	188	193	≤ 0,001
P22	Tik	166	182	188	193	≤ 0,001
P23	Tik	175	177	191	193	≤ 0,001
P30	Tik	157	178	176	178	≤ 0,001
P31	Tik	171	200	207	203	≤ 0,001
P32	Hane	22803	19601	14355	9293	153
P33	Hane	23492	9711	5488	3061	40
P34	Hane	24406	3533	1907	1122	12
P35	Hane	23905	8603	4829	2675	34
P36	Hane	23348	13115	8263	4661	65
P37	Tik	171	202	196	197	≤ 0,001
P38	Tik	310	196	190	202	0,001
P39	Tik	191	195	190	189	≤ 0,001
P40	Tik	159	190	191	190	≤ 0,001
P41	Tik	211	205	198	195	≤ 0,001
P42	Tik	169	191	204	203	≤ 0,001
P43	Tik	172	192	207	190	≤ 0,001
P44	Hane	22900	14721	9977	6193	93
P45	Tik	247	182	184	175	≤ 0,001
P46	Tik	156	185	191	197	≤ 0,001
P47	Tik	238	203	200	220	≤ 0,001
P48	Tik	218°	186°	178°	176°	≤ 0,001
P49	Hane	22553	18814	12784	7743	136

* Kastrerad, ° Responsen kommer från analysomgång 3 i tabell 17.

För en av pudeltikarna med providentitet P48 erhöles vid första analysen inte något värde på responsen i det ospädda provet. Samma urinprov analyserades därför en gång till i ospädd form (se tabell 17). Denna gång blev responsen betydligt högre än förväntat i jämförelse med övriga tikprover. Eftersom det uppstod en misstanke om kontamination av detta urinprovsvör så analyserades urinprovet ytterligare en gång (analysomgång 3) men nu från ett provrör som inte tidigare använts. Nu erhöles en respons även för det ospädda provet vilken följde samma mönster som övriga tikprover. Även denna tik hade därmed en koncentration av Can f 5 på $\leq 0,001$ $\mu\text{g/ml}$ vilken beräknades från det medelvärde markerat med fet stil i tabell 17.

Tabell 17. Respons (RU) och koncentration hos urinprovet med providentitet P48

Analysomgång	Spädning				Beräknad Can f 5 koncentration i $\mu\text{g/ml}$
	Ospädd	1:300	1:600	1:1200	
1	-	221	226	208	
2	1097				
3	218	186	178	176	$\leq 0,001$

Tabell 18. Respons (RU) och koncentration hos schäferproverna

Prov-ID	Kön	Spädning				Beräknad Can f 5 koncentration i $\mu\text{g/ml}$
		Ospädd	1:300	1:600	1:1200	
S1	Tik	161	195	209	210	$\leq 0,001$
S2	Tik	167	197	213	201	$\leq 0,001$
S3	Hane	24378	10646	6495	3456	52
S4	Hane	25407	8548	4998	2807	41
S5	Tik	157	201	191	189	$\leq 0,001$
S6	Tik	244	226	281	296	$\leq 0,001$
S7	Hane	24318	15274	9851	5385	77
S8	Hane	24183	11166	6562	3375	46
S9	Hane	23919	14960	9707	5274	76
S10	Tik	188	223	279	280	$\leq 0,001$
S11	Tik	190	225	217	211	$\leq 0,001$
S12	Hane	24003	15801	11103	6474	96
S13	Hane	22709	21106	15356	10008	164
S14	Tik	150	183	164	200	$\leq 0,001$
S15	Hane	23877	2442	1366	737	8

Även medelvärdet för responsen hos nollproverna (proverna med ren mus-IgG-diluent) beräknades. Denna respons (RU) var 210 vilket är högre än responsen hos majoriteten av de analyserade tikarnas urinprover. Detta tyder på att buffertlösningen hade ett högre bakgrundsvärde än urinproverna.

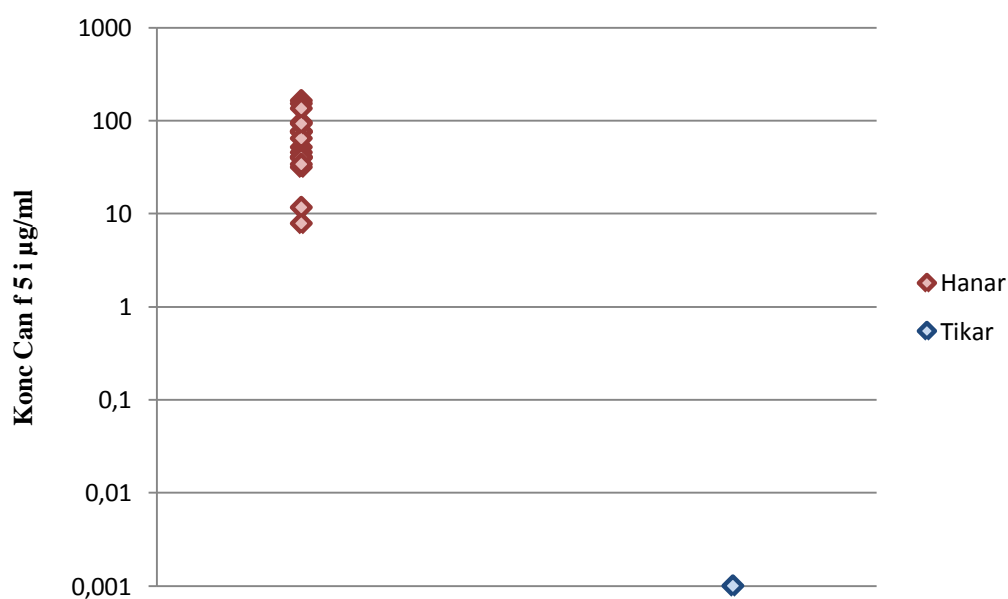
Jämförelse mellan könen

Medelkoncentrationen av Can f 5 för alla okastrerade hanhundar var 69 µg/ml men med en stor individvariation (se tabell 19 och figur 18). Den hane med lägst koncentration låg på 8 µg/ml medan den med högst hade 164 µg/ml. 61% av hanhundarna hade en koncentration på 30-90 µg/ml (se figur 19).

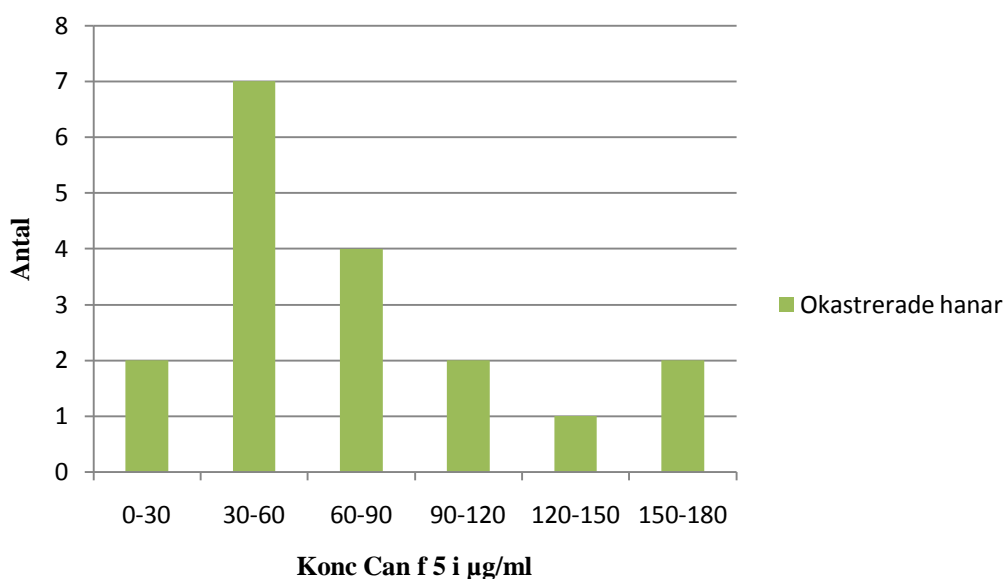
En pudelhane med providentitet P8 hade en koncentration av Can f 5 som låg på samma nivå som tikarna, med andra ord $\leq 0,001$ µg/ml (se tabell 19). Denna hund var farmakologiskt kastrerad.

Tabell 19. Medelkoncentration av Can f 5 hos hanhundarna

Pudel		Schäfer	
Prov-ID	Can f 5 i µg/ml	Prov-ID	Can f 5 i µg/ml
P1	32	S3	52
P7	76	S4	41
P8	$\leq 0,001$	S7	77
P9	41	S8	46
P32	153	S9	76
P33	40	S12	96
P34	12	S13	164
P35	34	S15	8
P36	65		
P44	93		
P49	136		



Figur 18. Spridning i koncentrationen av Can f 5 i urinprover från tikar och okastrerade hanar (logaritmerad y-axel).



Figur 19. Antal okastrerade hanhundar i respektive koncentrationsintervall.

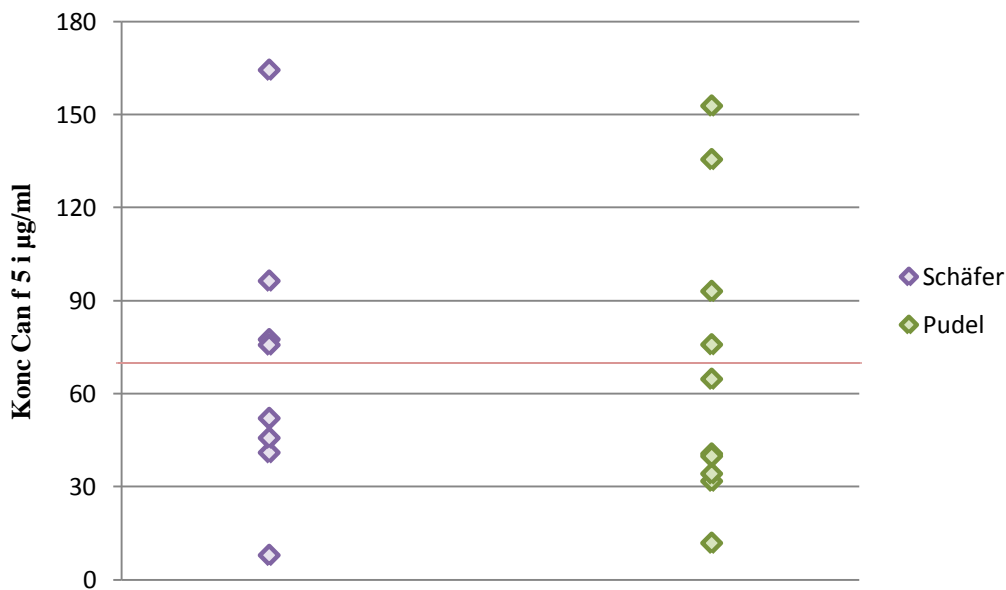
Alla 31 urinprover som samlats in från tikar hade en koncentration på $\leq 0,001$ µg/ml (se tabell 16, 17 och 18 samt figur 18). Detta var en 69 000 gånger lägre koncentration än medelvärdet av Can f 5 hos de okastrerade hanhundarna, samt 8000 gånger lägre än den lägsta koncentrationen som uppmättes hos en okastrerad hane. Det var därmed en signifikant skillnad i koncentrationen av Can f 5 mellan könen ($P < 0,0001$ i Mann-Whitney U-test).

Endast en kastrerad hanhund fanns med i studien (providentitet P8). Urinprovet från denna hund hade en koncentration av Can f 5 på samma nivå som tikarna (se tabell 19). Liksom tikarna så hade även den kastrerade hanhunden en signifikant lägre koncentration av Can f 5 i urinen än de okastrerade hanhundarna.

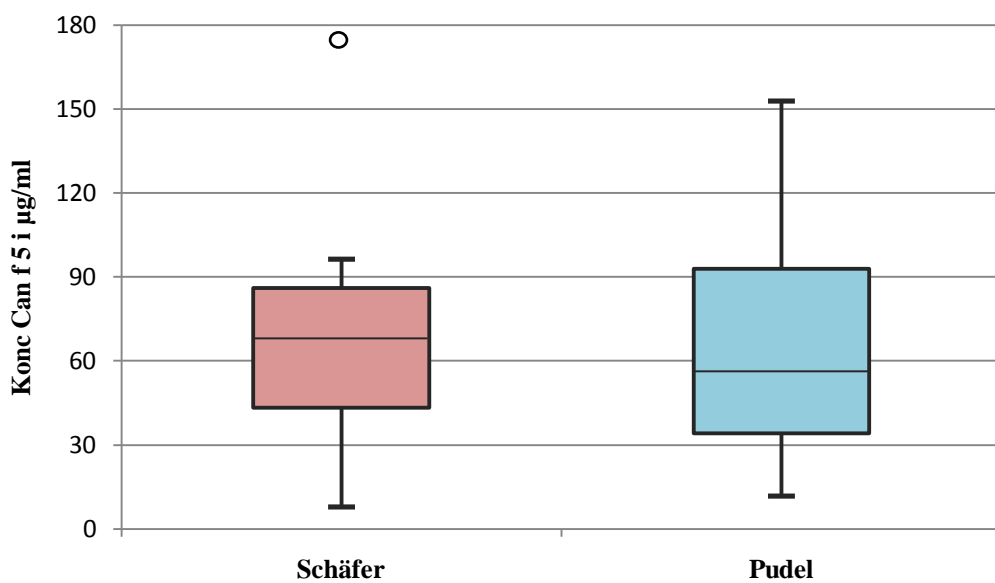
Rasskillnader

Eftersom alla tikar (samt den kastrerade hanhunden) låg på samma koncentration ($\leq 0,001$ µg/ml) så gick det inte att jämföra deras halt av Can f 5 beroende på ras. Därför var endast de okastrerade hanhundarna med i denna jämförelse.

Det fanns en stor individvariation hos både schäfrarna och pudlarna vid jämförelse av koncentrationen av Can f 5 (se figur 20). Majoriteten av hanarna låg oavsett ras inom koncentrationsintervallet 30-100 µg/ml. Hunden med den högsta koncentrationen var en schäfer men det var även inom denna ras den hund med lägst koncentration återfanns. Pudlarna hade ett något lägre medianvärde än schäfrarna (se figur 21).



Figur 20. Spridning i koncentrationen av Can f 5 i urinprover från okastrerade hanar (röd linje representerar medelkoncentrationen för alla okastrerade hanar).



Figur 21. Box-and-whisker plot för koncentrationen av Can f 5 hos okastrerade hanar.

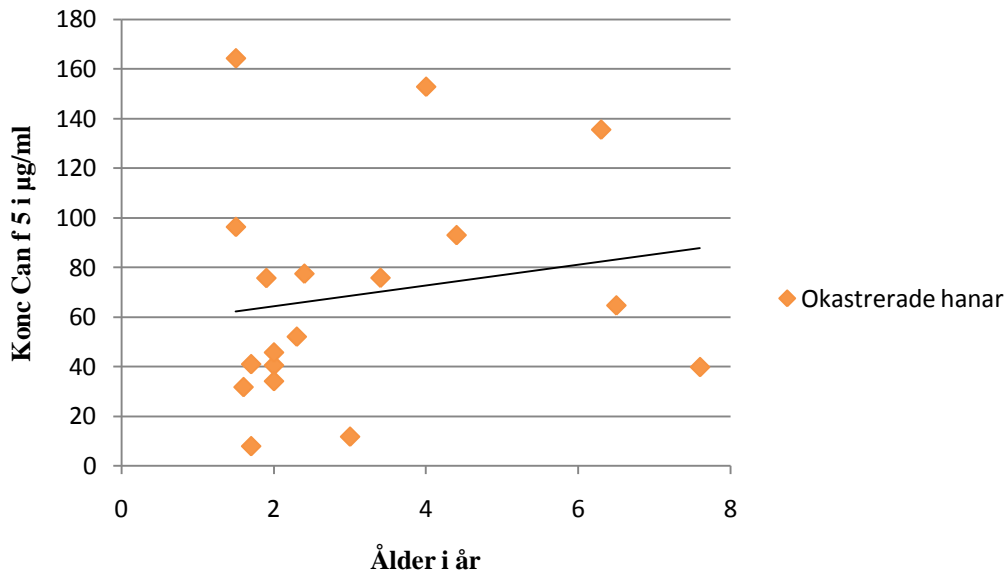
Medelkoncentrationen av Can f 5 hos de okastrerade hanhundarna skiljde sig endast marginellt mellan raserna (schäfrarna hade en medelkoncentration på 70 µg/ml medan pudlarna låg på 68 µg/ml). Det gick alltså inte att påvisa någon signifikant skillnad i koncentrationen av Can f 5 beroende på ras.

En statistisk beräkning avseende skillnaden i koncentration mellan de två hundraserna utfördes genom användning av Mann-Whitney U-test. I detta test blev resultatet att det inte fanns någon signifikant skillnad beroende på ras (P=0,63).

Åldersskillnader

Alla tikar (samt den kastrerade hanhunden) hade samma koncentration av Can f 5 på $\leq 0,001 \mu\text{g/ml}$. Dessa var därför inte med vid jämförelsen av koncentrationen av Can f 5 beroende på ålder.

Majoriteten av de okastrerade hanhundarna var relativt unga (se figur 22). Även den hane med högst koncentration av Can f 5 hade en låg ålder på endast 1,5 år.

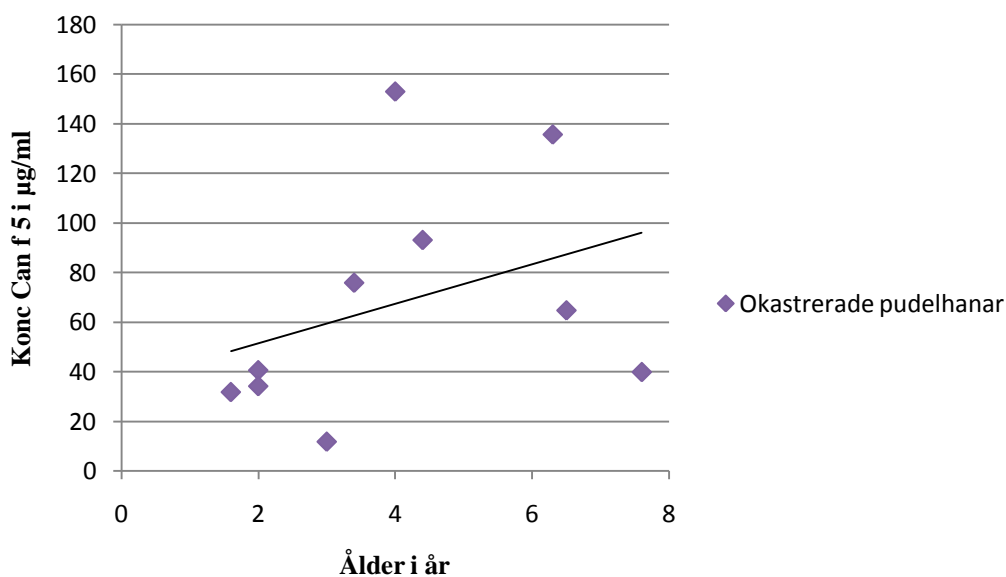


Figur 22. Spridning i koncentrationen av Can f 5 med avseende på ålder.

Vid en linjär jämförelse av koncentrationen av Can f 5 hos okastrerade hanar med avseende på ålder så kunde en åldersberoende koncentrationsökning utläsas (se figur 22). Detta tyder på ett positivt samband mellan en hunds ålder och dess urinkoncentration av Can f 5.

Genom beräkning av korrelationskoefficienten (r) på logaritmerade koncentrationer så gick det att fastställa att det linjära sambandet mellan koncentration och ålder var svagt eftersom r i detta fall blev 0,22. Detta innebar att mindre än 5% av variationen i koncentration av Can f 5 kunde kopplas till hundarnas ålder (determinationskoefficienten $r^2=0,046$).

Eftersom alla okastrerade schäferhanar var yngre än 2,5 år gjordes även en linjär jämförelse avseende koncentrationen av Can f 5 beroende på ålder enbart hos de okastrerade pudelhanarna (se figur 23). Logaritmerade koncentrationer användes därefter för att beräkna korrelationskoefficienten vilken i detta fall blev 0,40. 16% av variationen i koncentration hos pudlarna kunde därmed kopplas till åldern ($r^2=0,16$).

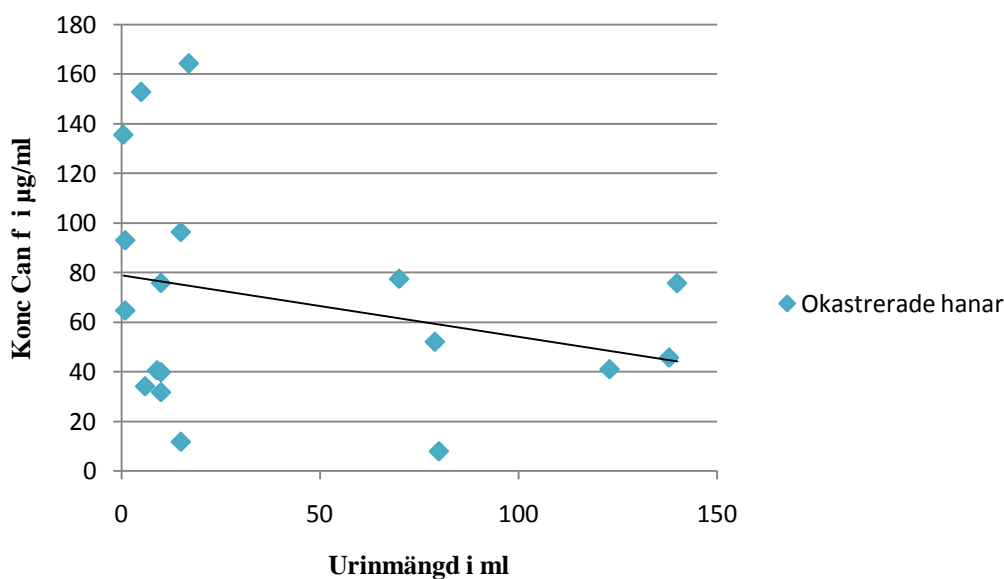


Figur 23. Spridning i koncentrationen av Can f 5 med avseende på ålder hos pudelhanar.

Jämförelse av koncentrationen beroende på insamlad urinmängd

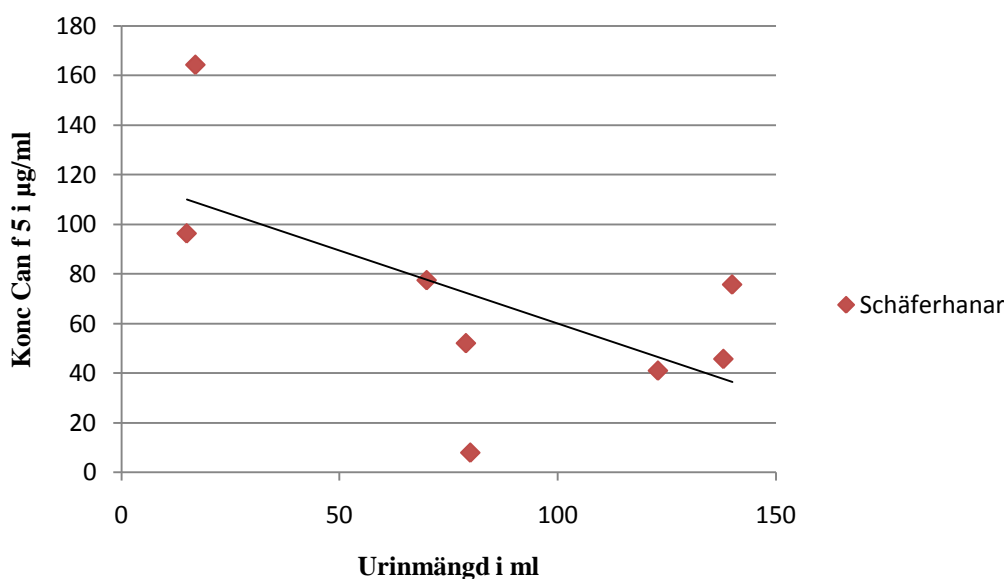
Den mängd urin som kunde samlas in från de olika hundarna vid ett urineringsstillfälle hade en mycket stor variation. Generellt så genererade schäfrarna mer urin än pudlarna, vilket dock kan förklaras relativt enkelt med att schäfern är en stor hundras medan de flesta pudlarna som det samlades urinprover från var mycket små. Även storpudlar kan nog anses ha en mindre urinblåsa än schäfrar då de har betydligt mindre bukvolym.

Återigen så användes inte tikarna eller den kastrerade hanhunden i denna jämförelse. Vid jämförelse av koncentrationen av Can f 5 i förhållande till insamlad urinmängd hos alla okastrerade hanhundar så sågs generellt en minskning av koncentrationen ju större volym urin som samlades upp (se figur 24).

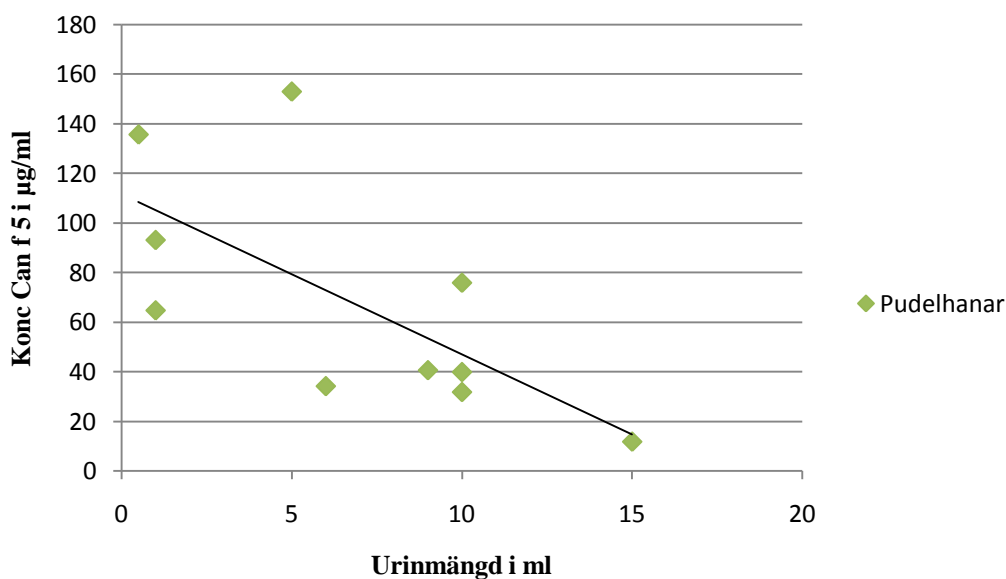


Figur 24. Jämförelse av koncentrationen av Can f 5 beroende på insamlad urinmängd hos hanar .

Ett negativt linjärt samband kunde utläsas hos både schäfrarna och pudlarna när koncentrationen av Can f 5 beroende på insamlad urinmängd hos respektive ras jämfördes (se figur 25 och 26). Detta var allra tydligast hos pudelhanarna (se figur 26). Genom användning av logaritmerade värden på koncentrationen av Can f 5 beräknades korrelationskoefficienten (r). Hos schäfrarna blev den $-0,36$ medan pudlarna låg på $-0,77$. Därefter beräknades determinationskoefficienten (r^2) och resultatet blev att 13% av variationen i koncentration av Can f 5 hos schäfrarna kunde kopplas till den insamlade urinmängden ($r^2=0,13$). Motsvarande siffra för pudlarna var 60% ($r^2=0,60$) och detta samband var även signifikant ($P=0,0085$).



Figur 25. Jämförelse av koncentrationen av Can f 5 beroende på insamlad urinmängd hos schäferhanar .



Figur 26. Jämförelse av koncentrationen av Can f 5 beroende på insamlad urinmängd hos pudelhanar.

DISKUSSION

Detta är den första studie där koncentrationen av Can f 5 (argininesteras) i hundurin har jämförts hos olika kön, raser och individer.

Som inledning i valet av assay utfördes tester på en inhibitionsassay. Denna resulterade dock i att det inte gick att komma ner i låga koncentrationer av Can f 5 varpå en sandwich assay istället optimerades för att användas till urinprovsanalyserna.

Vid optimeringen av sandwich assayen kunde en parallellförskjutning av standardkurvan ses vid användning av nativt Can f 5 istället för rekombinant. I denna studie har dock ingen hänsyn tagits till detta eftersom det främsta syftet var att jämföra koncentrationen mellan olika djur och inte att fastställa absolutvärden. Skulle en beräkning av den absoluta koncentrationen i varje urinprov göras bör dock en korrigeringsfaktor användas för att skillnaden mellan nativt Can f 5 i urinproverna ska kunna korreleras till rekombinant Can f 5 i standardkurvan. Parallellförskjutningen skulle eventuellt kunna bero på en felaktig koncentrationsbestämning hos stamlösningen för nativt alternativt rekombinant Can f 5, och en kontroll av stamlösningarnas koncentration är att rekommendera om fler studier utförs.

Genom optimering av sandwich assayen kunde en väl fungerade assay tas fram för användning vid urinprovsanalyserna. Standardkurvan hade ett brett dynamiskt område på cirka 0,001-0,5 µg/ml och uppreparheten hos standardpunkterna var hög. Genom tester avseende avsättning och spetsning kunde det säkerställas att urinproverna inte innehöll något som störde analysen och gav falskt höga/låga responser. Spädning av urinprover med en förväntat hög koncentration av Can f 5 medförde att de hamnade inom standardkurvans intervall och vid beräkning av ursprungskoncentrationen av Can f 5 från olika spädningar observerades endast en

liten variation i koncentrationen (cirka 5%). Spädning kunde därför anses tillförlitligt.

Detektionsgränsen (LoD) för Can f 5 i denna studie var responsen (RU) 297 vilket motsvarar en koncentration på cirka 0,001 µg/ml. Alla tikar utom en (providentitet P38) hade liksom den enda kastrerade hanhunden (providentitet P8) responser som låg under analysens detektionsgräns (se tabell 16, 17 och 18). För dessa urinprover kan alltså denna studie endast fastställa att koncentrationen av Can f 5 antingen var lika stor som detektionsgränsen eller lägre. Detta motsvarar en urinkoncentration av Can f 5 på $\leq 0,001$ µg/ml. Tiken med providentitet P38 hade en respons på 310 vilket var strax över detektionsgränsen och motsvarade en beräknad koncentration på 0,0011 µg/ml. Eftersom koncentrationen för detta urinprov låg så pass nära detektionsgränsen så har den avrundats till 0,001 µg/ml.

En av pudeltikarna (P48) fick ett avvikande värde på responsen i det ospädda provet vid en andra analysomgång (se tabell 17). Eftersom ingen respons erhöles vid den första analysen av samma urinprov fanns en stark misstanke om att provröret inför den andra analysen blivit kontaminerat. Vid ytterligare en analys av samma urinprov men från ett annat provrör som inte använts tidigare erhöles en respons som motsvarade den hos de andra tikarna. Det avvikande värdet avskrevs därför som kontamination.

Huvudsyftet med denna studie var att fastställa huruvida det fanns skillnader i urinkoncentrationen av Can f 5 beroende på kön. Alla okastrerade hanhundar hade en koncentration av Can f 5 som kraftigt översteg den beräknade koncentrationen på $\leq 0,001$ µg/ml hos tikarna och den kastrerade hanen (se tabell 19). Vid jämförelse med det beräknade medelvärdet för alla okastrerade hanar som låg på 69 µg/ml så låg tikarna på en hela 69 000 gånger lägre koncentration. Det fanns därmed en signifikant skillnad i koncentrationen av Can f 5 beroende på kön vid jämförelse mellan tikar och okastrerade hanhundar ($P < 0,0001$ vid Mann-Whitney U-test).

Can f 5 (argininesteras) har i ett flertal studier undersökts i prostatan hos hanhundar. I en studie sågs proteinet i stora mängder hos okastrerade hanar medan det ej kunde påvisas hos hanar som kastrerats (Isaacs & Shaper, 1985). I en annan studie kunde ingen skillnad påvisas i halten av Can f 5 i prostatan hos hanhundar som var okastrerade respektive kastrerade men som även behandlats med testosteron (Isaacs & Shaper, 1983). Dessa studier samt ytterligare tester av proteinets reglering genom tillförsel av androgener och/eller antiandrogener har konfirmerat teorin om att Can f 5 (argininesteras) i prostatan hos hanhundar är androgenberoende (Juniewicz et al., 1990).

Prostatavätska kan utsöndras både via ejakulering och urinering men om båda dessa uteblir så dräneras vätskan till urinblåsan (Ettinger & Feldman, 2005). I denna studie har Can f 5 undersökts i urinprover. Vid jämförelse av koncentrationen av Can f 5 beroende på insamlad urinmängd hos de okastrerade hanhundarna så sågs ett linjärt samband (se figur 24, 25 och 26). Genom beräkning av determinationskoefficienten med logaritmerade koncentrationer kunde 13% av variationen i koncentration hos schäfrarna, respektive 60% hos

puvlarna, relateras till urinmängden. Detta samband var dessutom signifikant hos pudlarna.

Att det var en skillnad mellan de två hundraserna kan eventuellt bero på att schäfrarna hade en mycket låg åldersvariation medan åldern hos de okastrerade pudelhanarna uppvisade stor variation med hela sex års skillnad mellan den yngsta och äldsta hunden. Generellt kunde merparten av en den urinvolym en hund kastade vid provtagningen samlas upp. Det bör dock nämnas att det inte gick att veta hur mycket av det totala innehållet i en hunds urinblåsa som verkligen tömdes ut och även detta kan därför ha påverkat resultatet. Att det ändå verkar finnas ett samband (framför allt hos pudlarna) beror troligtvis på en spädningsseffekt vilket medför att koncentrationen blir lägre vid en ökad urinvolym, och skulle flera urinprover av olika volym tas från samma hund så skulle antagligen koncentrationen av Can f 5 variera mellan de olika proverna. Detta medför att det är svårt att fastställa hur mycket Can f 5 en enskild hund producerar genom att analysera just urinprover.

Vid jämförelse av koncentrationen av Can f 5 beroende på ras så användes Mann-Whitney U-test med resultatet att det inte fanns någon signifikant skillnad mellan de båda raserna ($P=0,63$). Den beräknade medelkoncentrationen skiljde sig heller inte särskilt mycket mellan schäfrarna och pudlarna.

Det har tidigare utförts studier på hundpäls avseende halten av hundallergen Can f 1 beroende på ras. I en studie från 2005 av Ramadour et al. var individvariationen mycket stor och påståendet om att det skulle finnas hypoallergena hundraser förkastades därför. Det finns beskrivet att pudeln ska vara en allergivänlig ras eftersom den har speciell päls som inte fälls på samma sätt som hos de flesta andra hundraser (Bower & Bower, 2004; Messent et al., 2005). Studier har dock visat att just denna hundras är en av de som har allra högst halt av hundallergen Can f 1 i pälsen (Ramadour et al., 2005; Heutelbeck et al., 2008). I den här studien undersöktes koncentrationen av allergenet Can f 5 i urin från schäfer och pudel och inte heller här kunde det påvisas någon signifikant skillnad mellan de två hundraserna. Detta, samt det faktum att koncentrationen av Can f 5 på individnivå i denna studie var mycket stor även inom en och samma ras (se figur 20), stödjer tidigare studier där påståendet om att det finns hypoallergena hundraser förkastats.

BPH (benign prostatahyperplasi) är mycket vanligt hos äldre hanhundar (framför allt hundar över fem års ålder) och för att tillståndet ska kunna utvecklas och upprätthållas krävs närvaro av androgener. Hundar med BPH har i studier visat sig ha en signifikant högre koncentration av Can f 5 (argininesteras) i prostatavätskan än friska hundar (Ettinger & Feldman, 2005). I denna studie kunde ett svagt linjärt samband utläsas vid jämförelse av skillnaden i koncentration av Can f 5 beroende på ålder hos de okastrerade hanhundarna (se figur 22). Dock var det (vid användning av logaritmerade koncentrationer) endast 5% av variationen i koncentration som kunde relateras hundarnas ålder och det gick därför inte att fastställa ett tydligt samband.

De flesta hundar i studien var relativt unga och 11 av totalt 18 okastrerade hanhundar var yngre än 2,5 år. Endast tre av hundarna var över fem år gamla

vilket troligtvis till stor del kan förklara att det inte gick att påvisa något distinkt samband mellan åldern och koncentrationen av Can f 5 i den här studien. Även skillnaden i den uppsamlade urinmängden hos de olika hundarna kan dock spela en viss roll. Eftersom schäferhanarna alla hade en ålder på under 2,5 år så gjordes ytterligare en jämförelse av skillnaden i koncentration beroende på ålder men nu enbart på okastrerade pudelhanar (vilka hade en större åldersvariation). Genom användning av logaritmerade koncentrationer kunde i detta fall 16% av variationen i koncentration kopplas till hundarnas ålder. Detta samband var därmed något starkare än vid jämförelse på alla okastrerade hanar. Dock var sambandet fortfarande relativt svagt och för att säkerställa att ett samband verkligen finns behövs en större studiepopulation och fler äldre hundar.

För att utveckla respiratorisk allergi krävs att ett allergen finns i en luftburen form, och lipokalinallergen från djur hittas därför ofta i päls, urin och saliv (Mäntyjärvi, Rautiainen & Virtanen, 2000). Medan pälsen är en vanlig orsak till allergi mot hundar (Mattsson et al., 2009) så är den största källan till allergener hos möss och råttor deras urin (Taylor, Longbottom & Pepys, 1977). Hundar och katter har dock också visat sig ha IgE-aktivitet i sin urin (Hoffman, 1980). Nyligen konstaterades att Can f 5 (argininesteras) är ett viktigt hundallergen som kan påvisas i urin från hund. Detta allergen (eller ett protein nära relaterat till allergenet) har även hittats vid analyser av extrakt från hundpäls, men det är oklart hur det hamnar där (Mattsson et al., 2009). I den här studien så har koncentrationen av Can f 5 i urin från okastrerade hanhundar visat sig vara signifikant högre än hos övriga hundar vilka antingen har en mycket låg koncentration eller ingen förekomst av allergenet alls. Eftersom det dock är oklart huruvida det är urinen eller pälsen som ger upphov till allergi mot just detta allergen så behövs ytterligare studier avseende koncentrationen av Can f 5 i hundpäls. Om denna koncentration följer den i urinen så skulle det betyda att en individ som är sensibiliserad mot enbart Can f 5 tolererar tikar och kastrerade hanhundar.

SLUTSATSER

Koncentrationen av Can f 5 i urinen från tikarna och den kastrerade hanhunden var mycket låg (eventuellt obefintlig) och det fanns en signifikant skillnad i koncentrationen hos dessa hundar jämfört med de okastrerade hanhundarna. Detta stödjer den tidigare teorin om att Can f 5 är beroende av androgener. Individvariationen i koncentrationen av Can f 5 hos de okastrerade hanhundarna var stor och det fanns ingen signifikant skillnad beroende på ras vid jämförelse mellan schäfer och pudel. Det kunde dock påvisas ett samband gällande koncentrationen beroende på insamlad urinmängd. Detta var signifikant hos de okastrerade pudelhanarna. Ett samband mellan koncentration och ålder kunde även ses. Detta var dock svagt troligtvis på grund av för liten studiepopulation, för få äldre hundar samt det faktum att koncentrationen även påverkades av den mängd urin en hund kastat.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Abbas, AK. & Lichtman, AH. (2006). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. 2nd edition. Philadelphia: Saunders.
- Bona, CA. & Bonilla, FA. (1996). *Textbook of immunology*. 2nd edition. Amsterdam: Harwood Academic Publishers GmbH.
- Bower, J. & Bower, C. (1998/2000). *Goda råd om din hund*. Stockholm: Prisma. [Ursprunglig titel: *The dog owner's problem solver*].
- Chapdelaine, P., Dubé, JY., Frenette, G. & Tremblay, RR. (1984). *Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma*. Journal of Andrology, 1984;5:206-210.
- Chapdelaine, P., Potvin, C., Ho-Kim, M-A., Larouche, L., Bellemare, G., Tremblay, RT. & Dubé, JY. (1988). *Androgen regulation of canine prostatic arginine esterase mRNA using cloned cDNA*. Molecular and Cellular Endocrinology, 1988;56:63-70.
- Chapdelaine, P., Gauthier, E., Ho-Kim, MA., Bissonnette, L., Tremblay, RR. & Dubé, JY. (1991). *Characterization and expression of the prostatic arginine esterase gene, a canine glandular kallikrein*. DNA and cell biology, 1991;10(1):49-59.
- Delves, PJ., Martin, SJ., Burton, DR. & Roitt, IM. (2006). *Roitt's essential immunology*. 11th edition. Oxford: Blackwell Publishing.
- Diamandis, EP. & Christopoulos, TK. (1996). *Immunoassay*. London: Academic Press.
- Dyce, KM., Sack, WO. & Wensing, CJG. (2002). *Textbook of veterinary anatomy*. 3rd edition. Philadelphia: Saunders.
- EMA - European Medicines Agency. *Suprelorin: EPAR - Product Information*. Hemsida. [Online] (2008-01-14). Tillgänglig: http://www.ema.europa.eu/docs/sv_SE/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000109/WC500068835.pdf [2010-06-07].
- Ettinger, SJ. & Feldman, EC. (2005). *Textbook of veterinary internal medicine*. 7th edition. St Louis: Elsevier Saunders.
- Feldman, EC. & Nelson, RW. (2004). *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3rd edition. St Louis: Elsevier Saunders.
- Frenette, G., Dubé, JY. & Tremblay, RR. (1983). *Effect of castration and steroid treatment on the activity of some hydrolytic enzymes in dog prostate*. The Prostate, 1983;4(4):383-390.
- Frenette, G., Dubé, JY., Lacoste, D. & Tremblay, RR. (1987). *Radioimmunoassay in blood plasma of arginine esterase: the major secretory product of dog prostate*. The Prostate, 1987;10(2):145-152.
- Gauthier, ER., Chapdelaine, P., Tremblay, RR. & Dubé, JY. (1993). *Transcriptional regulation of dog prostate arginine esterase gene by androgens*. Molecular and Cellular Endocrinology, 1993;94:155-163.

- de Groot, H., Goei, KGH., van Swieten, P. & Aalberse, RC. (1991). *Affinity purification of a major and minor allergen from dog extract: serologic activity of affinity-purified Can f 1 of Can f 1-depleted extract*. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1991;87:1056-1065.
- Heutelbeck, A., Schulz, T., Bergmann, K-C. & Hallier, E (2008). *Environmental exposure to allergens of different dog breeds and relevance in allergological diagnostics*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2008;71:751-758.
- Hoffman, DR. (1980). *Dog and cat allergens: urinary proteins of dander proteins?* Annals of Allergy, 1980;45(4):205-206.
- Isaacs, WB. & Shaper, JH. (1983). *Isolation and characterization of the major androgen-dependent glycoprotein of canine prostatic fluid*. The Journal of Biological Chemistry, 1983;258(10):6610-6615.
- Isaacs, WB. & Coffey, DS. (1984). *The predominant protein of canine seminal plasma is an enzyme*. The Journal of Biological Chemistry, 1984;259(18):11520-11526.
- Isaacs, WB. & Shaper JH. (1985). *Immunological localization and quantitation of the androgen-dependent secretory protease of the canine prostate*. Endocrinology, 1985;117(4):1512-1520.
- Juniewicz, PE., Barbolt, TA., Egy, MA., Frenette, G., Dubé, JY. & Tremblay, RR. (1990). *Effects of androgen and antiandrogen treatment on canine prostatic arginine esterase*. The Prostate, 1990;17(2):101-111.
- Konieczny, A., Morgenstern, JP., Bizinkauskas, CB., Lilley, CH., Brauer, AW., Bond JF., Aalberse, RC., Wallner, BP. & Kasaian, MT. (1997). *The major allergens, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins: cloning and immunological characterization of the recombinant forms*. Immunology, 1997;92(4):577-586.
- Lazure, C., Leduc, R., Seidah, NG., Chrétien, M., Dubé, JY., Chapdelaine, P., Frenette, G., Paquin, R. & Tremblay, RR. (1984). *The major androgen-dependent protease in dog prostate belongs to the kallikrein family: confirmation by partial amino acid sequencing*. FEBS Letters, 1984;175(1):1-7.
- Lindskog, BI. (2004). *Medicinsk terminologi*. 4^e upplagan. Stockholm: Nordiska Bokhandeln förlag.
- Mattsson, L., Lundgren, T., Everberg, H., Larsson, H. & Lidholm, J. (2009). *Prostatic kallikrein: a new major dog allergen*. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009;123(2):362-368.
- Mattsson, L., Lundgren, T., Olsson, P., Sundberg, M. och Lidholm, J. (2010). *Molecular and immunological characterization of Can f 4: a dog dander allergen cross-reactive with a 23 kDa odorant-binding protein in cow dander*. Clinical & Experimental Allergy, 2010;40(8):1276-1287.
- Messent, P., Palmer, J., Schneck, M., Caravan, J. & Alderton, D. (1998/2005). *Hundar – illustrerat uppslagsverk*. Globe Förlaget. [Ursprunglig titel: *Giant book of the dog*].

- Morris, DO. (2010). *Human allergy to environmental pet danders: a public health perspective*. *Veterinary Dermatology*, 2010;21(5):441-449.
- Mäntyjärvi, R., Rautiainen, J. & Virtanen, T. (2000). *Lipocalins as allergens*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000;1482(1-2):308-317.
- Ramadour, M., Guetat, M., Guetat, J., El Biaze, M., Magnan, A. & Vervloet, D. (2005). *Dog factor differences in can f 1 allergen production*. *Allergy*, 2005;60(8):1060-1064.
- Saarelainen, S., Taivainen, A., Rytönen-Nissinen, M., Auriola, S., Immonen, A., Mäntyjärvi, R., Rautiainen, J., Kinnunen, T. & Virtanen, T. (2004). *Assessment of recombinant dog allergens Can f 1 and Can f 2 for the diagnosis of dog allergy*. *Clin Exp Allergy*, 1997;34(10):1576-1582.
- Sjaastad, ØV., Hove, K. & Sand, O. (2003). *Physiology of domestic animals*. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Taylor, N., Longbottom, JL. & Pepys, J. (1977). *Respiratory allergy to urine proteins of rats and mice*. *Lancet*, 1977;310(8043):847-849.
- Tizard, IR. (2004). *Veterinary immunology: an introduction*. 7th edition. Philadelphia: Saunders.
- Whitehead, S. (1999/2000). *Hund: allt du behöver veta*. Stockholm: Natur & Kultur. [Ursprunglig titel: *The complete guide to the dog*].