



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Primär immunmedierad hemolytisk anemi – möjliga autoantigen och predisponerande faktorer

Elisabeth Genfors



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013: 34

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Primär immunmedierad hemolytisk anemi – möjliga autoantigen och predisponerande faktorer

Primary immune-mediated hemolytic anemia - possible autoantigens and predisposing factors

Elisabeth Genfors

Handledare:

Magnus Åbrink, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Caroline Fossum, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2013

Omslagsbild: Elisabeth Genfors

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013: 34
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: IMHA, immunmedierad hemolytisk anemi, autoantigen, predisponering, hund, katt

Key words: IMHA, immune-mediated hemolytic anemia, autoantigen, predisposition, dog, cat

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteratursökning	3
Litteraturoversikt.....	4
Antikroppar och diagnostik.....	4
Antigen	4
Glykoforiner	5
Band 3	5
Spektrin	5
Determinant spridning.....	6
Oxidativ stress.....	6
Predisponerande faktorer.....	7
Predisponerade raser	7
Säsong, ålder och kön.....	7
Genetik	8
IMHA hos katt.....	9
Diskussion	9
Litteraturförteckning	13

SAMMANFATTNING

Immunmedierad hemolytisk anemi (IMHA) är en sjukdom där immunförsvaret skapar antikroppar mot kroppens erythrocyter. Detta aktiverar nedbrytning av erythrocyterna, vilket leder till anemi. Det finns två typer av IMHA: primär och sekundär. Den primära har ännu okänd etiologi medan ett flertal orsaker kan ge upphov till den sekundära. Den primära typen är vanligast hos hund, medan den sekundära är vanligare hos katt. För att förstå hur primär IMHA uppstår har man undersökt vilka strukturer på erythrocyten som immunförsvaret skapar antikroppar mot. Tre sådana strukturer som ofta nämns är glykoforiner, en jonkanal (band 3) samt spektrin. Även en möjlig påverkan av oxidativ stress på sjukdomens utveckling kan finnas. Hundar av vissa raser samt av honkön verkar insjukna oftare än andra i sjukdomen vilket tyder på att dessa faktorer är predisponerande. Etiologin bakom IMHA är då både genetisk och kan påverkas av hormoner. Även en säsongsbunden variation har rapporterats, men dess orsak är ej klarlagd. Primär IMHA hos katt är betydligt ovanligare än hos hund och sjukdomen skiljer sig även i andra avseenden. Katter diagnostiseras ofta i senare sjukdomsstadier men har en bättre överlevnadsstatistik. Vidare drabbas hankatter oftare än honkatter. Skillnaderna beror sannolikt främst på speciesvariationer. IMHA hos katt är svårt att upptäcka och kan ge en hög grad av feldiagnostisering, varför bättre diagnostikmetoder vore önskvärt. Mycket få studier är gjorda på katt och slutsatser är därför svåra att dra. Fler studier borde göras både på katt och på hund för att ytterligare klarlägga sjukdomens uppkomst.

SUMMARY

Immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) is a disease where the immune system creates antibodies against erythrocytes, which are destroyed with subsequent anemia. There are two types of IMHA: secondary, which may have a multitude of causes, and primary whose cause is still unknown. Primary IMHA is the most common type of IMHA in dogs, while secondary is more common in cats. To understand the etiology behind primary IMHA, several studies have examined structures associated with the erythrocyte membrane that might turn into immunological targets. Structures often mentioned are glycophorins, the ion-channel band 3 and spectrin. A possible influence of oxidative stress on IMHA has also been discussed. Female dogs and certain breeds more frequently suffer from IMHA, why it is believed these features predispose to the disease. If so, the etiology of primary IMHA may be both genetical and affected by hormones. An unexplained seasonal variation has also been noted. Primary IMHA in cats is more uncommon than in dogs, one of several differences between the species. Cats are often diagnosed in a later stage of the disease, but the mortality is lower. Further, male cats are more likely to suffer from IMHA than female cats. The differences may primarily be explained by a species variety. Moreover, IMHA in cats are more difficult to identify and better diagnostic methods are therefore desirable. Few and inconclusive studies have been performed regarding this disease, more markedly so in cats, wherefore more studies should be executed in both species to elucidate the origin of primary IMHA.

INLEDNING

Immunmedierad hemolytisk anemi (IMHA) är en sjukdom som karaktäriseras av en typ II överkänslighetsreaktion, det vill säga att kroppens immunförsvar angriper egna celler – i det här fallet erythrocyterna (McAlees, 2010). När immunförsvaret reagerar så binder autoantikroppar (även kallade anti-erythrocytantikroppar, AEA) till cellytan på erythrocyterna vilket leder till att dessa bryts ner (McCullough, 2003). Detta ger så småningom en anemi, då den drabbade individen inte längre kan transportera runt syre i kroppen. Nedbrytningen sker antingen extravaskulärt (i mjälte och lever) då mononukleära fagocyter reagerar på autoantikropparna, eller så sker den intravaskulärt då antikropparna aktiverar komplementsystemet (McAlees, 2010).

Det finns två typer av IMHA; en primär och en sekundär. I den sekundära varianten reagerar immunförsvaret på att erythrocyternas cellyta har blivit förändrad av en yttre faktor (McCullough, 2003). Denna faktor kan vara läkemedel, vacciner, toxiner, neoplasier eller infektiösa agens; exempel på sådana hos hund är de vektorburna *Babesia spp.*, *Ehrlichia canis* och *Leishmania major* (Kennedy et al., 2006). Vid primär IMHA riktas istället antikropparna mot tillsynes normala erythrocytmembran (McCullough, 2003). Denna typ kallas även idiopatisk IMHA, då man inte vet varför autoimmuniteten uppkommer (Kennedy et al., 2006).

När hundar med misstänkt IMHA kommer in till kliniker uppvisar de vanligtvis slöhet, inappetens och svaghet, men många fler symptom kan uppvisas – symptom som beror på att flertalet organsystem inte får tillräckligt med syre. Sjukdomen kan både uppstå akut och ha ett långsammare förlopp (McCullough, 2003). Ingen diagnostik som används idag kan skilja de två IMHA-typerna från varandra, varför diagnostisering av den primära sker genom uteslutning av möjliga sekundära etiologier. Cirka 60 – 75 % av fallen hos hund är primära (Piek et al., 2008). Mortaliteten hos hundar med primär IMHA ligger mellan 26 och 70 % (Ishihara et al., 2010).

Idag är IMHA den vanligaste hemolytiska sjukdomen hos våra hundar och även hos våra katter (McCullough, 2003). I jakten på botemedel mot den idiopatiska typen av sjukdomen måste man ha en djupare förståelse om dess uppkomst och verkningsmekanism. Denna litteraturstudie kommer fokusera på vilka strukturer på erythrocyterna som antas bli immunogena, och om det finns några predisponerande faktorer för att sjukdomen ska uppstå. Den kommer även att ta upp skillnader som finns mellan katt och hund gällande IMHA.

MATERIAL OCH METODER

Litteratursökning

Från början önskade jag att skriva om IMHA hos katt. Jag sökte på ”((IMHA) OR (immune-mediated haemolytic anaemia) OR (AIHA) OR (autoimmune haemolytic anaemia)) AND (cat* OR felin*)” med olika stavningar, med/utan bindestreck samt på flertalet databaser (bland annat Pubmed, Web of Knowledge, Scopus) men insåg att forskningen inom detta område, och därmed antalet artiklar, var mycket begränsad. Fortfarande intresserad av sjukdomens mekanism så sökte jag mindre djurslagsspecifikt och använde istället för (cat*

OR felin*) ord som IgG, IgM, hered*, genet* i sökfältet. De databaser där jag främst har hittat artiklar är Pubmed och Web of Knowledge.

Jag har ofta letat mig bakåt via citerade källor i relevanta artiklar och följt så långt bak som möjligt för att hitta ursprungskällan. Jag har även använt mig av ”föreslagna relaterade artiklar” hos de databaserna jag använt och på hemsidorna där artikeln publicerats. Många av mina källor är originalartiklar, även om jag läst reviewartiklar för att få en bra överblick av ämnet.

LITTERATURÖVERSIKT

Antikroppar och diagnostik

Antierythrocyt-antikroppar (AEA) är de antikroppar som angriper erythrocyterna. Det är oftast immunoglobulinklasserna IgG och IgM som identifieras bundna till membranet – vanligast är ett IgG-svar, alternativt IgG i kombination med IgM (Morley et al., 2008). Det förekommer i vissa fall även IgA-svar samt aktivering av komplementkaskaden (McAlees, 2010). Man har i ett försök dessutom undersökt vilka subklasser av antikroppar som ger det främsta svaret vid IMHA. IgG, IgM och IgA-antikroppar återfanns i proven också från denna studie (även om man ifrågasatte IgA:s relevans gällande IMHA) och de subklasser av antikroppar man fann var IgG1, IgG2, IgG3 och IgG4. Man är dock ännu osäker på subklassernas individuella betydelse (Day, 1999).

I studien av Day (1999) samt i studien av Morley et al. (2008) fann man att även hundar utan IMHA kunde ha antikroppar bundna till erythrocytmembranen. IMHA-individer hade dock ett signifikant högre antal membranbundna antikroppar. Dessa antikroppar är ett typiskt tecken på immun-medierade anemier, att jämföra med andra typer av anemier.

Antikropparna binder till autoantigen på erythrocytens membran och kan upptäckas med olika metoder. DAT-testet (även kallat Coomb's test) är den vanligaste och mest vedertagna diagnostikmetoden som används för att upptäcka antigen-antikroppsbindingar idag (McAlees, 2010). Flödescytometri är en nyare metod som inte används lika ofta, men den anses av vissa vara en känsligare och bättre metod (Morley et al., 2008). Som alternativ diagnostik kan man i mikroskop upptäcka bland annat sfärocyter i blodutstryk. Sfärocytos är en stark indikator för IMHA hos hund och innebär att erythrocyterna har angripits av makrofager eller komplement, vilka har förstört en bit av erythrocytmembranet. Erythrocyten förlorar då sin elliptiska, bikonkava form och blir rundare (Piek et al., 2008).

Antigen

I försök har man separerat autoantikroppar från ytan på erythrocyter från IMHA-patienter, och sedan inkuberat dessa med potentiella epitoper från normala erythrocyter. På detta vis har man kunnat undersöka vilka beståndsdelar av erythrocyterna som reagerar med antikropparna och fungerar som antigen. Olika sådana antigen hittades hos olika insjuknade hundar, vilket är ett tecken på att etiologin bakom IMHA kan variera från fall till fall, även om förloppet av sjukdomen ser likadant ut (Barker et al., 1991; Day, 1999).

Glykoforiner

En teori är att det är glykoforiner – sialoglykoproteiner i erythrocytens membran (Fig. 1) – som är det huvudsakliga autoantigenet hos hund. Flera studier stödjer denna teori (Barker & Elson 1995; Day 1999). Barker & Elson (1995) beskriver att man funnit IgG-antikroppar bundna till glykoforiner. De skriver dessutom att ett oidentifierat antigen med precis samma storlek och egenskaper som glykoforiner är det antigen som oftast ger utfällning med autoantikroppar. Likheterna gör att man misstänker att detta oidentifierade antigen är just en glykoforin. Detta sialoglykoprotein har dessutom påvisats vara autoantigen vid IMHA hos både mus och människa.

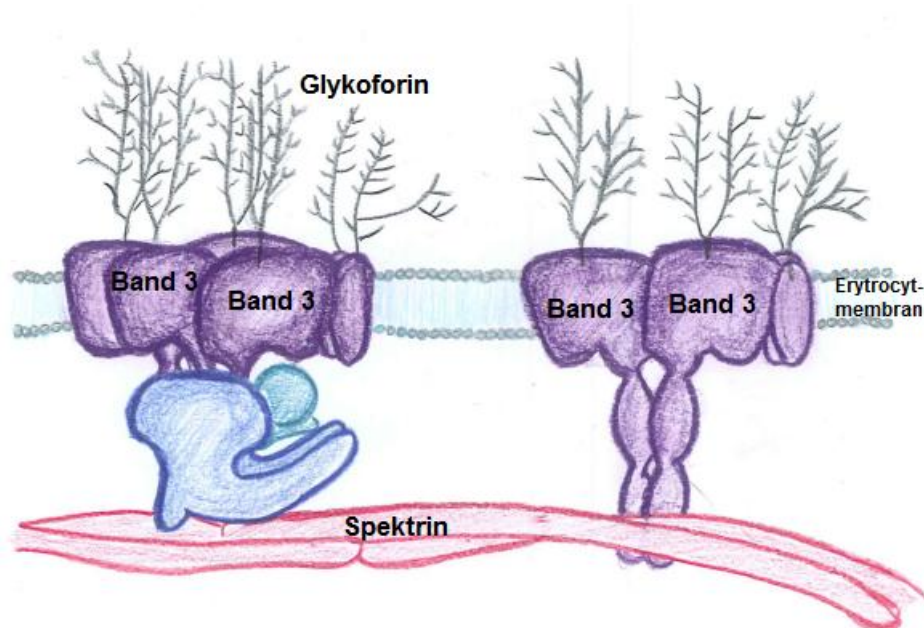
Band 3

Band 3 är en jonkanal och det vanligaste proteinet i erythrocytens membran (Fig. 1). Barker et al. (1991) påvisar i en studie av human IMHA att autoantikroppar hade skapats mot just denna jonkanal hos alla undersökta individer. Day (1999) skriver att ytterligare studier på människa beskriver att jonkanalen är vanligt förekommande, om än inte det vanligaste autoantigenet. Samma författare skriver också att denna jonkanal är det vanligast förekommande autoantigenet hos NZB-möss. Hos hund har glykoforiner ofta definierats som det huvudsakliga antigenet, men det har även registrerats reaktivitet mot jonkanalen band 3.

Det har hos människa dessutom rapporterats om att glykoforiner och jonkanalen band 3 tillsammans kan bilda nya epitoper. En ”högriskepitop” som ofta uppstår är till största delen kodad för i jonkanal-genomet, men kräver aminosyror från glykoforin för att bildas. Vid denna interaktion av membranproteinerna reagerar autoantikroppar med specificitet för just denna nybildade epitop, och inducerar erythrocytnedbrytning (Janvier et al., 2012).

Spektrin

Autoreaktivitet mot den intracellulära erythrocytskelettstrukturen spektrin (Fig. 1) har rapporterats. Detta är dock en företeelse som kan förekomma även hos friska individer, då immunförsvaret ska bryta ner föråldrade och skadade erythrocyter (Day, 1999). Barker & Elson (1995) skriver att både friska och IMHA-sjuka djur av flera olika arter (mus, människa, hund) har haft antikroppar mot spektrin. De skriver också att endast en av tre friska hundar hade antikroppar mot spektrin medan en större andel IMHA-hundar reagerade på samma autoantigen.



Figur 1. Erythrocytmembran med de potentiella autoantigenerna glykoforin, band 3 och spektrin. Bild: Elisabeth Genfors.

Determinant spridning

T-cellernas funktion studeras också i studien av Barker & Elson (1995). De påvisar att T-celler från en IMHA-hund kan proliferera vid stimulering av kroppsegna antigen – T-celler från en frisk hund reagerade inte alls på samma stimuli. Vidare undersöktes vilka antigen som T-cellerna kände igen. Det visade sig att glykoforiner var ett av de autoantigen som T-cellerna reagerade på, men i vissa fall gav även spektrin och jonkanalen band 3 en proliferation av T-celler.

Att T-cellerna redan från sjukdomens början skulle vara reaktiva mot flertalet autoantigen är dock inte en nödvändighet, utan skulle kunna vara resultatet av determinant spridning. Detta fenomen innebär att T-cellerna från början endast reagerar på specifika epitoper, men i takt med att sjukdomen utvecklas så börjar de känna igen flera olika strukturer som antigen.

Oxidativ stress

Vissa studier har visat att oxidativ stress är ett inslag i IMHA hos hundar. Man har hittat höga halter av markörer för lipidperoxidering och lägre halter av antioxidanter i blodprov från IMHA-hundar, jämfört med blodprov från friska hundar. Man vet ännu inte säkert om oxidativ stress är själva orsaken bakom IMHA eller om det är sekundära fynd – nya studier pekar på det förstnämnda efter undersökningar på möss. Den oxidativa stressen skulle i sådana fall förändra erythrocytmembranet och på så sätt skapa nya epitoper som kan ge upphov till autoimmunitet (Tan et al., 2012).

- **Prx2:** Prx2 är en typ av antioxidant som är viktig i försvaret mot oxidering av erythrocyternas membran. Normalt finns Prx2 fritt i cytosolen, men vid hög oxidativ stress länkas det ihop med membranproteiner. Denna bindning av Prx2 till membranet

skulle då kunna skapa en ny epitop och på så sätt bli ett mål för immunförsvaret (Tan et al., 2012).

- **Nrf2:** Nrf2 är en transkriptionsfaktor som reglerar antioxidantsvaret. Individer med en brist på Nrf2 hade signifikant förhöjda nivåer av membranbundna immunoglobuliner vilket berodde på att erytrocyterna utsattes för högre oxidativ stress (Tan et al., 2012).
- **Calpain 1:** Calpainer är proteaser vars funktion är att hjälpa till att inducera apoptos. Detta sker via aktivering av pro-apoptotiska faktorer samt underlättande av nedbrytning av cellskelettet hos kärnförande celler. Erytrocyter är som bekant inte kärnförande celler, men de genomgår en liknande nedbrytningsprocess, en så kallad eryptos. I studien fann man att Calpain 1 var bundet till erytrocytmembran på IMHA-hundar, men inte på friska hundar. Detta misstänker man inducerar eryptos – möjligtvis som svar på oxidativ stress eller bindning av autoreaktiva antikroppar (Tan et al., 2012).

Studien av Tan et al. (2012) fann till skillnad från tidigare artiklar inte att glykoforiner skulle vara potentiella antigen som inducerar IMHA, vilket författarna skriver eventuellt beror på att olika tekniker användes vid undersökningen.

Predisponerande faktorer

Predisponerade raser

Flertalet olika studier har visat att vissa raser är mer utsatta än andra för IMHA. Detta gäller framförallt cocker spaniel, springer spaniel, pudel, dvärgschnauzer och collies (Day, 1999; Reimer et al., 1999; Miller et al., 2004; Weinkle et al., 2005). Reimer et al. (1999) fann dessutom att golden retriever i mindre utsträckning verkar drabbas av IMHA då ingen hund av denna ras var sjuk, samtidigt som en ansevärd del av kontrollgruppen var av denna ras. I en annan studie gjord i Australien fann man en något annorlunda bild vad gäller rasprevalens; malteser drabbades oftare om man jämförde med kontrollgruppen, liksom springer spaniel, ungersk vizsla och airedale terrier. Cocker spaniel var enligt dessa resultat inte mer utsatta än andra raser (McAlees, 2010).

Säsong, ålder och kön

Det finns tecken på viss säsongsvariation av sjukdomen IMHA. Det är dock inte klarlagt om variationen har en direkt koppling till sjukdomen utan skulle lika gärna kunna bero på säsongsvariationer av andra predisponerande faktorer (Day, 1999; Ishihara et al., 2010). I studien från Australien visade resultaten att fler IMHA-hundar kom in till kliniken under höst och vinter än under vår- och sommarmånaderna (McAlees, 2010). I andra studier har det tvärtom presenterats fler fall under vår- och sommarmånaderna (McCullough, 2003; Weinkle et al., 2005)

I många studier är medelålders hundar (5-8 år) och tikar, framförallt kastrerade sådana, överrepresenterade (Reimer et al., 1999; McCullough, 2003; Weinkle et al., 2005). Teorier att hormoner kan ha en eventuell inverkan på patogenesen av denna sjukdom har diskuterats (Reimer et al., 1999). McCullough (2003) skriver att förhöjda nivåer av östrogen har varit en

riskfaktor för immunmedierade sjukdomar. För just IMHA har man sett viss predisponering för sjukdom hos honor med oregelbunden reproduktionscykel, även om de kastrerade tikarna fortfarande var överrepresenterade.

Genetik

Dog Leukocyte Antigen - DLA

Resultat från en studie stödjer det man länge har misstänkt – att det finns en genetisk bakgrund till primär IMHA. I studien fann man en koppling mellan vissa MHC-haplotyper och IMHA (Kennedy et al., 2006). MHC är ett genkomplex som kodar för MHC-molekyler, det vill säga molekyler som presenterar antigen för kroppens immunförsvar. Delen av MHC som verkar vara en faktor i etiologin bakom IMHA kallas hos hund för dog leukocyte antigen (DLA). Man har hittat två potentiella risk-haplotyper av DLA och en ”skyddande” haplotyp, varav framförallt en av riskhaplotyperna, DLA-DRB*00601/DQA1*005011/DQB1*00701, verkar ha stor betydelse för sjukdomens utveckling (Kennedy et al., 2006).

Resultaten visar att vissa raser kan ha en stark association mellan MHC-haplotyp och IMHA medan andra raser helt saknar associationen. Detta har förmodligen sin bakgrund i att man selekterat och inavlat för att få fram eftertraktade fenotyper. Exakt var sambandet mellan IMHA och dessa MHC-haplotyper finns är dock inte helt klart. Det finns en risk för att själva sjukdomsgenen är dold mellan diverse DLA-lokus, och på så sätt bara tycks vara kopplat till DLA-haplotypen. En annan teori är att endast vissa kombinationer av alleler ger en ökad mottaglighet för IMHA, och att det skulle vara just dessa kombinationer som oavsiktligt avlats fram inom vissa raser (Kennedy et al., 2006).

I studien skriver författarna att väldigt små skillnader i aminosyrasekvensen kan leda till stora skillnader i uttrycket av MHC-molekylerna. Detta har observerats i bland annat typ 1 diabetes och man misstänker att samma sak gäller vid IMHA. Man tror även att sjukdomen har en komplex etiologi med både flertalet externa och genetiska faktorer (Kennedy et al., 2006).

Gener som kodar för AEA

NZB-möss är inavlade möss som spontant kan utveckla IMHA. Försök har visat att sjukdomen hos dessa möss dels styrs av gener som predisponerar för AEA (Scatizzi et al., 2012), men även av gener som förhindrar uttrycket av dessa predisponerande gener (Ochiai et al., 2000). NZB-möss har en dominant predisponerande gen som gör dem mer mottagliga för IMHA, medan möss av vildtyp nedreglerar detta uttryck med modifierande alleler och hämmar därmed uttrycket av AEA. Det finns minst två lokus, Aem-2 och Aem-3, som förmodas koda för hämmande av AEA och därmed förhindrar att sådana antikroppar uppstår. Effekten av denna nedreglering verkade vara störst ifall man bar på båda allelerna. I tidigare studier har det även visats att ytterligare ett lokus, Aem-1, är involverat i regleringen av AEA, även det med en hämmande verkan (Ochiai et al., 2000).

Att det skulle finnas flera loci som additivt påverkar AEA-produktion beskrivs även i undersökningen av Scatizi et al. (2012). De har även beskrivit ett annat lokus, Lbw2, och dess funktion. Lbw2 inkluderar minst tre subloci som gynnar produktionen av AEA och antas ge

förlorad immunologisk tolerans och skapa AEA mot normala strukturer som är specifika för erythrocyter. Det verkar alltså inte vara en generell autoimmunitet som uppstår.

IMHA hos katt

IMHA är betydligt mindre vanligt hos katt än hos hund (McCullough, 2003). Även hos katter kan IMHA uppstå både primärt och sekundärt. Den sekundära typen kan precis som hos hundar uppstå på grund av neoplasier, toxiner, läkemedel och vacciner samt infektiösa agens. Aktuella agens skiljer sig dock mellan species; felint leukemivirus (FeLV), feline infektiös peritonit (FIP) och *Mycoplasma haemofelis* är vanliga etiologier bakom sekundär IMHA hos katt (Kohn et al., 2006). Hos katt är den vanligaste typen av IMHA den sekundära (McCullough, 2003).

Generellt används samma diagnostik hos både katt och hund, men det finns vissa svårigheter att upptäcka sfärocyter hos katt. Detta beror på att kattens erythrocyter är mindre, rundare och saknar den centrala blekheten som t ex hund- och människoerythrocyterna har. Det gör att erythrocyterna redan från början ser ut som sfärocyter och på grund av detta kan de vara svåra att skilja från riktiga sfärocyter. Istället har man i vissa studier mätt erythrocyternas osmotiska fragilitet (OF) för att påvisa om de är känsligare än vanligt. Detta skulle i så fall vara ett tecken på IMHA, även om ökad OF inte är specifikt för sjukdomen. Ökad OF ses även hos hundar med IMHA (Kohn et al., 2006).

IMHA hos katt skiljer sig från hos hund även på flertalet andra punkter:

- Katter med IMHA presenteras ofta i ett senare stadium; dels för att symptomen inte är specifika, och dels för att de verkar klara av att ha lägre halter av erythrocyter (Kohn et al., 2006)
- Dödligheten ligger på runt 25 % hos katt att jämföra med 26 – 70 % hos hund, och dessutom är risken för eventuella komplikationer lägre (Kohn et al., 2006)
- Det är betydligt vanligare med ett IgM-antikroppssvar hos katt än hos hund (Kohn et al., 2006)
- I en studie var huskatter de vanligast förekommande katterna med IMHA och utgjorde ca 68 % av försöksgruppen. Näst vanligast var katter av raserna perser och siames som vardera utgjorde 5,6 % av försöksgruppen (Kohn et al., 2006)
- Hankatter har i flera försök utgjort störst del av den insjuknade gruppen, och de kastrerade hankatterna var något fler än de fertila (McCullough 2003, Kohn et al., 2006)
- Katters hemoglobin är känsligare för oxidation och denaturering än hundars hemoglobin. Detta beror på skillnader i hemoglobinet uppbyggnad (Kohn et al., 2000)

DISKUSSION

Primär IMHA är en sjukdom där en hel del studier har gjorts vad gäller patogenes, symptom och överlevnadsstatistik hos hund – samtidigt är sjukdomen knappt undersökt hos katt. Oavsett djurslag är det fortfarande inte klarlagt exakt vad som händer i sjuka individer. Att

autoantigen uppstår vet man, även om anledningen till detta ännu är oklar. På senare år har man dock börjat undersöka vilka strukturer hos erythrocyterna som utgör dessa antigen. De tre strukturer som huvudsakligen diskuteras – glykoforiner, jonkanalen band 3 och spektrin – är alla mycket vanliga proteiner. Deras höga förekomst i kroppen skulle kanske kunna vara en orsak till sjukdomens ibland mycket snabba förlopp. Om fallet skulle vara så att determinant spridning har skett lär förloppet gå än fortare. Determinant spridning skulle dessutom kunna förklara varför ett huvudantigen har varit svårt att fastställa då det kan ge sken av att huvudantigenet skiftar.

Att antikroppar skulle reagera på den intracellulära molekylen spektrin innebär att den på något sätt måste ha blottats för immunförsvaret. Eftersom förekomsten av antikroppar mot spektrin rapporteras i många fall hos IMHA-hundar så kanske fler erythrocyter är skadade hos dessa individer. Då man hittat tecken på att oxidativ stress skulle ha ett samband med IMHA (Tan et al., 2012), är en möjlig hypotes att den oxidativa stressen är orsak till erythrocytskadan. I så fall skulle denna stress vara en primär orsak till IMHA; något som inte har kunnat klarläggas men som misstänks i samma studie. Eventuellt kan spektrin även påverkas av den oxidativa stressen genom Calpain 1, då denna proteas underlättar nedbrytningen av cytoskelettet (i vilket spektrin är en huvudsaklig komponent) och inducerar eryptos. Samband mellan oxidativ stress och blottande av spektrin, samt interaktion med spektrin via calpainer är dock inte undersökt i någon studie.

När det kommer till de predisponerande faktorerna ser man att flera attribut är återkommande. Ras, främst cocker spaniel, och kön är de två faktorer som oftast påverkar individens benägenhet att utveckla IMHA. De genomförda studierna innefattar enbart mindre försöksgrupper och resultaten enskilt hade kunnat bero på slumpen, men då liknande resultat är återkommande i flera studier kan de ändå anses trovärdiga. I många fall har man kommit fram till att faktorerna är just predisponerande, men inte vilken den bakomliggande orsaken till detta är, även om spekulationer finns (Day, 1999; Reimer et al., 1999; Miller et al., 2004; Weinkle et al., 2005).

Vad gäller raspre-disponeringen är det sannolikt att den stora selektion och viss inavel som använts för att få fram speciella fenotyper ligger till grund för att IMHA utvecklas oftare hos vissa raser. Predispositionen av sjukdomen hos vissa raser verkade skilja mellan kontinenterna, vilket kan bero på att raser är olika populära på olika platser. I Australien till exempel, verkar malteser insjukna oftare i IMHA, vilket kan bero på att de avlats hårdare på grund av rasens höga popularitet i just Australien (McAlees, 2010). Baserat på studierna av Oichai et al. (2000) och Scatizzi et al. (2012) skulle man till exempel kunna misstänka att den gen som uttrycker AEA har selekterats fram, eller de gener som hämmar uttryck av AEA selekterats bort i och med strikta avelsprogram. Andra exempel på muterade eller selekterade gener som skulle kunna ge upphov till IMHA är gener för/mot antioxidanter, antikroppar och antigen. Naturligtvis kan även haplotyper för många andra faktorer vara fram- eller bortselektade, då man inte exakt vet vad som ligger bakom sjukdomen. Dessutom behöver det inte bara vara genuppsättningen som styr uppkomsten av sjukdomen då den ofta beskrivs

som multifaktoriell. Den slutsats man kan dra är dock att det finns en genetisk faktor i etiologin bakom IMHA, även om den inte är uppenbar i samtliga sjukdomsfall.

Studierna av Oichiai et al. (2000) och Scatizzi et al. (2012) är gjorda på NZB-möss och relevansen i att jämföra hundar med NZB-möss kan diskuteras. De inavlade NZB-mössen utvecklar spontant IMHA efter en viss tid. Nog för att hundar kan vara ofördelaktigt avlade, men uppfödarnas syfte har aldrig varit att få fram en sjuk hund och de har inte heller inavlats i samma utsträckning som mössen. Det positiva med att använda NZB-möss är att hela musens genom är känt och på grund av detta kan man lättare analysera och hitta avvikande sekvenser. På grund av mössens korta generationsintervall blir de dessutom ett bra modelldjur. De sekvenser man har hittat som kodar för och emot AEA ger en god bild av hur sjukdomen kan uppstå hos olika djur, men man bör vara försiktig med att translatera detta till bland annat hund. Det ger dock en god utgångspunkt för vidare studier av sjukdomen hos andra djurslag. NZB-möss är dessutom ett ypperligt bevis på att inavel kan leda till ökad tendens att utveckla IMHA.

De olika genetiska skillnader som tagits upp i litteraturöversikten är dels de gällande AEA, men även olika haplotyper av antigenpresenterande molekyler är nämnda. Förändringar i MHC-komplexen som kodar för dessa MHC-molekyler är en faktor som dokumenterats i flera sjukdomar - som exempel nämns diabetes typ 1 - och studien av Kennedy et al. (2006) visar att IMHA inte är ett undantag. Vad som inte har diskuterats i någon studie är om det finns någon koppling mellan genetik och uppkomsten av autoantigen. Då antigen är den struktur som immunförsvaret aktiveras av bör man kanske ställa sig frågan hur den kan uppstå, och om det kanske finns någon predisponerande och/eller genetisk bakgrund till det.

Det samband man funnit mellan IMHA och säsong är ännu inte förstått. Flertalet Nordamerikanska studier visar att under sommarmånaderna, april till september, ökar antalet insjuknade hundar i IMHA. Då det inte är specificerat vilken typ av IMHA det gäller kan man gissa att ökningen beror på ett ökat antal aktiva vektorer som sprider sjukdomar och att etiologin bakom IMHA i dessa fall är sekundär. Detta förklarar dock inte varför samma period, april till september, skulle ge det förhöjda antalet insjuknade hundar i Australien, då det är vinter vid den tiden på året på södra halvklotet. Ytterligare saker som talar mot vektorerna, vilket också nämns i studien av McAlees (2010), är att det inte finns några upptäckta fästingburna sjukdomar som ger IMHA i Australien, och två av de tre möjliga etiologierna är just fästingburna.

Tikar, framförallt kastrerade sådana, har i många studier varit mer utsatta för IMHA. Att hormoner i sådana fall skulle påverka sjukdomsutvecklingen är troligt. Det intressanta är att olika typer av hormonstörningar också verkar ge högre mottaglighet för IMHA. Kastrering bör kanske inte klassificeras som en störning, men det är trots allt inte normala tillståndet av reproduktionshormoner hos en hund. Likaså är förhöjda östrogennivåer och oregelbundna reproduktionscykler en avvikelse från normaltillståndet. Kastrering är dock generellt sett mer vanligt förekommande och därför mer framträdande i de studier som gjorts. Att kastrerade hankatter verkar vara mer utsatta skulle stödja teorin om att onormala/förändrade

hormonnivåer kan påverka, men å andra sidan talar det emot att just de honliga reproduktionshormonerna skulle ha en predisponerande effekt på IMHA.

Katter i allmänhet ska enligt Kohn et al. (2006) drabbas betydligt mer sällan än hundar av primär IMHA. Samma studie visar också att katter ofta presenteras i ett senare stadium. Detta kan bero på att de dels verkar tolerera lägre halter av syreförande erythrocyter och symptomen därmed uppkommer senare, och dels för att symptomen är såpass ospecifika. En reflektion kring detta är att många personer ofta har en annan relation med sin hund än sin katt. Katter är självständiga och i många hushåll får de komma och gå lite som de vill medan hundar ofta är mer beroende av människan och lever sida vid sida med henne. På grund av det mer distanserade förhållandet till människan upptäcks kanske inte symptomen hos katter lika tidigt, varför de kommer till veterinären senare – eller i värsta fall kanske de inte kommer in alls om sjukdomen har ett mycket snabbt förlopp och katten är bortom räddning. Risken finns också att ägare inte lägger ner samma energi på sin katt och inte tar den till veterinären över huvud taget. Detta skulle kunna ge en falsk bild av att katter inte drabbas av primär IMHA i samma utsträckning som hund.

En annan möjlig förklaring är att katter oftare än hundar blir feldiagnostiserade. Det vanligaste testet, Coomb's test, ger inte alltid optimala resultat. Hos hund kan man komplettera testet med undersökningar, vanligen undersökning för sfärocytos. Hos katt, som har en annan erythrocytstruktur, ger testet dock sällan en bättre diagnostisk bild och detta gör eventuellt att flera fall av IMHA hos katt missas. Önskvärt vore med andra ord att utveckla andra diagnostikmetoder på katt. Ett exempel är att till exempel oftare använda mätning av OF, en metod som också kan appliceras på hund.

Andra skillnader som upptäckts mellan djurslagen är bland annat att katters erythrocyter är känsligare för oxidativ stress. Som tidigare nämnts så finns det tecken på att oxidativ stress kan påverka utvecklingen av IMHA, och om så är fallet bör katter snarare vara mer utsatta än hundar. Detta skulle i sådana fall ytterligare understryka att mörkertalet förmodligen är stort gällande antalet katter insjuknade i primär IMHA. Alternativt är det deras förmåga att klara sig med låga halter syreförande celler i kroppen som gör att de kan hantera den oxidativa stressen. Deras tålighet mot låga syrehalter i blodet skulle också kunna förklara varför katter som väl presenteras med IMHA och behandlas för det har en bättre överlevnadsstatistik än hundar – trots att katterna presenteras senare.

Slutsatser om IMHA hos katt är svåra att dra då det finns ett mycket begränsat diskussionsunderlag; studierna är dels väldigt få, och antalet deltagande katter är lågt. Vad gäller hund är antalet studier betydligt fler, men de har ofta haft samma ändamål, nämligen att förklara hur sjukdomen ter sig i individen. Detta har förvisso givit en bra beskrivning av hur sjukdomen kan upptäckas och en bild av chansen för överlevnad, men fler studier med fokus på uppkomsten av primär IMHA behöver göras för att man ska kunna dra slutsatser om sjukdomens etiologi. Fördelaktigt vore även studier från flera olika håll i världen. På grund av IMHA:s förmodade multifaktoriella etiologi lär full förståelse om dess uppkomst dröja och kanske aldrig helt begripas.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Barker, R. N. & Elson, C. J. 1995. Red-blood-cell glycoporphins as B-cell and T-cell antigens in canine autoimmune hemolytic-anemia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 47, 225-238.
- Barker, R. N., Gruffyddjones, T. J., Stokes, C. R. & Elson, C. J. 1991. Identification of autoantigens in canine autoimmune hemolytic-anemia. *Clinical and Experimental Immunology*, 85, 33-40.
- Day, M. J. 1999. Antigen specificity in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69, 215-224.
- Ishihara, M., Fujino, Y., Setoguchi, A., Takahashi, M., Nakashima, K., Ohno, K. & Tsujimoto, H. 2010. Evaluation of Prognostic Factors and Establishment of a Prognostic Scoring System for Canine Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72, 465-470.
- Janvier, D., Lam, Y., Lopez, I., Elakredar, L. & Bierling, P. 2012. A major target for warm immunoglobulin G autoantibodies: the third external loop of Band 3. *Transfusion*.
- Kennedy, L.J., Barnes, A., Ollier, W. E. R. & Day, M. J. 2006. Association of a common dog leucocyte antigen class II haplotype with canine primary immune-mediated haemolytic anaemia. *Tissue Antigens*, 68, 502-508.
- Kohn, B., Goldschmidt, M. H., Hohenhaus, A. E. & Giger, U. 2000. Anemia, splenomegaly, and increased osmotic fragility of erythrocytes in Abyssinian and Somali cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217, 1483-1491.
- Kohn, B., Weingart, C., Eckmann, V., Ottenjann, M. & Leibold, W. 2006. Primary immune-mediated hemolytic anemia in 19 cats: Diagnosis, therapy, and outcome (1998-2004). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, 159-166.
- Mcalees, T. J. 2010. Immune-mediated haemolytic anaemia in 110 dogs in Victoria, Australia. *Australian Veterinary Journal*, 88, 25-28.
- Mccullough, S. 2003. Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*, 33, 1295-+.
- Miller, S. A., Hohenhaus, A. E. & Hale, A. S. 2004. Case-control study of blood type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224, 232-235.
- Morley, P., Mathes, M., Guth, A. & Dow, S. 2008. Anti-erythrocyte antibodies and disease associations in anemic and nonanemic dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 886-892.
- Ochiai, K., Ozaki, S., Tanino, A., Watanabe, S., Ueno, T., Mitsui, K., Toei, J., Inada, Y., Hirose, S., Shirai, T. & Nishimura, H. 2000. Genetic regulation of anti-erythrocyte autoantibodies and splenomegaly in autoimmune hemolytic anemia-prone new zealand black mice. *Int Immunol*, 12, 1-8.
- Piek, C.J., Junius, G., Dekker, A., Schrauwen, E., Slappendel, R. J. & Teske, E. 2008. Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia: Treatment outcome and prognostic factors in 149 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 366-373.
- Scatizzi, J. C., Haraldsson, M. K., Pollard, K. M., Theofilopoulos, A. N. & Kono, D. H. 2012. The Lbw2 Locus Promotes Autoimmune Hemolytic Anemia. *Journal of Immunology*, 188, 3307-3314.
- Tan, E., Bienzle, D., Shewen, P., Kruth, S. & Wood, D. 2012. Potentially antigenic RBC membrane proteins in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Veterinary Clinical Pathology*, 41, 45-55.
- Weinkle, T.K., Center, S.A., Randolph, J.F., Warner, K.L., Barr, S.C. & Erb, H.N. 2005. Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). *Javma-Journal of the*

American Veterinary Medical Association, 226, 1869-1880.