



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

# Dödsorsaker och nedärvningsmönster av dilaterad kardiomyopati hos grand danois

Karin Kriström

*Uppsala*

2012

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

ISSN 1652-8697  
*Examensarbete 2013:34*

Dödsorsaker och nedärvningsmönster av dilaterad  
kardiomyopati hos grand danois

Causes of death and mode of inheritance of dilated  
cardiomyopathy in Great Danes

Karin Kriström

*Handledare: Jens Häggström Institutionen för kliniska vetenskaper  
Biträdande handledare: Ingrid Ljungvall Institutionen för kliniska vetenskaper och  
Katja Höglund Institutionen för Anatomi, fysiologi och biokemi*

*Examinator: Helene Hamlin Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2012  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för x  
Kurskod: EX3607, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: DCM, grand danois, dödsorsaker, arvbarhet  
Key words: DCM, Great Danes, causes of death, inheritance*

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

*Examensarbete 2013:34*



Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning.....	3
Kardiomyopati.....	3
Dilaterad kardiomyopati .....	3
Dilaterad kardiomyopati hos grand danois .....	4
Kliniska fynd .....	4
Diagnos .....	4
Prognos .....	5
Patologi.....	5
Neuroendokrina faktorer .....	5
Behandling.....	6
Genetik .....	6
Arvbarhet.....	7
LUPA .....	8
Syfte .....	8
Material och metoder .....	8
Uppföljning kliniskt status hos provtagna hundar .....	8
Sammanställning av information.....	9
Statistiska metoder.....	9
Sibling Risk Ratio.....	10
Nedärvmönster .....	10
Resultat .....	10
Urval studiepopulation .....	10
Dödsorsaker .....	10
Medeldödsålder .....	11
Medeldödsålder DCM .....	12
Sjuka respektive friska hundar avseende DCM.....	12
Könsfördelning .....	13
Sibling Risk Ratio.....	13
Nedärvmönster .....	14
Diskussion .....	14

Konklusion .....	17
Tack .....	18
Litteraturförteckning .....	19

## SAMMANFATTNING

Dilaterad kardiomyopati (DCM) är en allvarlig hjärtsjukdom som drabbar flera hundraser, men är vanligast bland de stora raserna. Sjukdomen drabbar hjärtmuskulaturen varpå hjärtats kontraktionsförmåga försämras. Detta leder på sikt till volymsöverbelastning, dilatation av hjärtats hålrum och kliniska tecken på hjärtsvikt. DCM är en viktig dödsorsak hos grand danois och den höga prevalensen tyder på att det finns en genetisk faktor bakom utvecklandet av sjukdom. Resultat från flera studier där ärftligheten studerats, tyder på en autosomal dominant nedärvning, men även x-bunden recessiv nedärvning har föreslagits.

Syftet med denna studie var att, utifrån en studiepopulation bestående av renrasiga grand danois hemmahörande i Sverige och Norge, undersöka de vanligaste dödsorsakerna, och om det fanns någon signifikant skillnad i medeldödsålder mellan hundar som dött i DCM och hundar som dött av övriga orsaker. Vidare undersöktes om någon signifikant överrepresentation kunde fastställas i prevalens av sjukdomen hos något av könen, samt om medeldödsåldern mellan tikar och hanhundar som drabbats av DCM skiljde sig signifikant. Information om studiepopulationens hälsoläge avseende DCM registrerades i syfte att användas inom ett EU-finansierat molekylärgenetiskt forskningsprojekt (LUPA) som arbetar med att fastställa den genetiska bakgrunden till ett antal sjukdomar hos hund och däribland DCM. Då arvbarheten är av stor betydelse för denna forskning undersöktes studiepopulationen även avseende nedärvningsmönster.

Studiepopulationen bestod av 185 grand danois vars kliniska status följdes upp genom telefonintervjuer med ägare eller uppfödare. Hundarna delades sedan in enligt eventuell dödsorsak, kön och medeldödsålder.

Resultatet av studien visade att de vanligaste dödsorsakerna var DCM, avlivad av annan orsak, tumörsjukdomar och neurologiska störningar. Ingen signifikant skillnad kunde påvisas i medellivslängd mellan hundar som dött i DCM och hundar som dött av övriga orsaker. Hanhundar visade sig vara signifikant överrepresenterade avseende förekomst av DCM, men ingen signifikant skillnad i dödsålder mellan tikar och hanhundar som drabbats av DCM kunde påvisas. Analyser av sjukdomsfördelningen inom familjer tyder på en stark genetisk faktor bakom utvecklande av DCM, och det mest sannolika nedärvningsmönstret i denna studie var autosomal dominant nedärvning med ofullständig penetrans.

## **SUMMARY**

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a serious heart disease with the highest prevalence found in large to giant sized breeds. The disease affects the myocardium, which leads to reduced myocardial contractility. In turn this leads to volume overload, dilatation of cardiac chambers and clinical signs of congestive heart failure (CHF).

DCM is an important cause of death in Great Danes, and the high prevalence indicates a genetic background. The inheritance of DCM has been investigated in both Great Danes and several other breeds, and most studies indicate that the disease is inherited as an autosomal dominant trait, although an x-linked recessive pattern has also been suggested.

This study was undertaken to investigate the most common causes of death of a study population consisting of pure-bred Great Danes living in Sweden and Norway, and to evaluate if there was any significant difference in mean age of death between dogs that died from DCM and dogs that died from other causes. We also aimed to investigate if there was any significant overrepresentation in prevalence in male compared to female dogs affected by DCM, and if there was any significant difference in mean age of death between female and male dogs that had died from DCM.

The information of the study population was obtained through telephone interviews with owners and breeders. The dogs were then classified based on cause of death, gender and mean age of death.

The information concerning the health status of the study population will be used in a European molecular genetic research project (LUPA). This project aims to unravel the genetic background of a number of diseases in the dog, including DCM. Because the mode of inheritance is of great importance for this type of research, the study population was also investigated with regards to inheritance pattern.

The results showed that the most common causes of death were DCM, euthanized for other reasons, neoplastic diseases and neurological disturbances. No significant difference in mean age of death could be found between dogs that had died from DCM and dogs that died from other causes. Males were significantly overrepresented regarding prevalence of DCM but there was no significant gender difference in mean age of death in dogs affected by DCM. Pedigree analyses showed that the development of the disease had a strong genetic influence and that the inheritance pattern was consistent with an autosomal dominant trait with incomplete penetration.

## **INLEDNING**

### **Kardiomyopati**

Kardiomyopati hos hund kan delas in enligt hur myokardiet påverkas av sjukdomen. De tre huvudformerna av kardiomyopati hos hund är dilaterad (DCM), hypertrofisk (HCM) och restriktiv (RCM). Hos hund ses huvudsakligen DCM (Franz et al., 2001)

Primär kardiomyopati har per definition okänd etiologi (idiopatisk) och är alltså inte ett resultat av någon övrig systemisk- eller kardiovaskulär sjukdom. Sekundär kardiomyopati anses däremot kunna orsakas av ett flertal olika bakomliggande faktorer som till exempel nutritionella brister, infektioner, nedsatt immunförsvar, läkemedel eller toxiner samt genetisk, infiltrativ, ischemisk, metabolisk, eller inflammatorisk myokardiell sjukdom (Tidholm et al., 2001a, Franz et al., 2001). Dessa är sannolikt långt ifrån de enda orsakerna. De allra flesta fall hos hund anses vara idiopatiska eller orsakade av genetiska faktorer (Herbst., 2007)

### **Dilaterad kardiomyopati**

Dilaterad kardiomyopati är en kronisk och progressiv hjärtmuskelsjukdom som framför allt drabbar vänster förmak och kammare, men även höger sida kan påverkas (Tidholm et al., 2001a). De vanligaste kliniska fynden är kraftig dilatation av vänster kammare, nedsatt kontraktionsförmåga och påföljande försämrad systolisk funktion (Meurs et al., 2001). Etiologin bakom sjukdomen är oftast okänd men primär DCM tros i många fall orsakas av en mutation i någon av de gener som kodar för proteiner som stabiliserar cytoskelettet samt proteiner som ingår i sarcomer. Detta leder till förändrad cellmorfologi, nedsatt funktion och på sikt även till celldöd. (Franz et al., 2001).

DCM kan drabba de flesta raser, men prevalensen är högst hos engelsk cockerspaniel, irländsk varghund, dalmatiner, boxer, dobermann, newfoundland, portugisisk vattenhund och grand danois. (Tidholm and Jönsson, 2005, Meurs et al., 2007). Sjukdomen kan yttra sig olika mellan raser medan det inom en ras ofta rör sig om samma fenotyp, vilket tyder på ett specifikt nedärvningsmönster för varje ras (Stabej et al., 2005). Hos grand danois och newfoundland ses framför allt vänster- eller dubbelsidig hjärtsvikt samt förmaksflimmer, medan dobberman drabbas av vänstersidig hjärtsvikt, kammararytmier och plötslig död. I de flesta fall bryter sjukdomen ut mellan 5 och 7 år men även valpar kan drabbas och då framför allt portugisisk vattenhund (Tidholm et al., 2001a).

Sjukdomen kan delas in i subklinisk och klinisk fas. Subklinisk DCM definieras som den fas då ultraljud kan påvisa vänster kammarförstoring och nedsatt kontraktionsförmåga, men där inga andra kliniska eller radiologiska tecken på hjärtsvikt föreligger (Tidholm et al., 2001a). Tid från upptäckt av subkliniska fynd till kliniska tecken på hjärtsvikt varierar och kan vara mycket kort hos vissa hundar medan andra kan leva i flera år utan att hjärtsvikt utvecklas

Klinisk DCM, den fas då sjukdomen manifesterar sig och de kliniska tecknen blir uppenbara, är då de flesta fallen diagnosticeras. Vid det skedet visar drabbade hundar kliniska tecken på



hjärtsvikt och tillståndet är svårt att behandla på grund av den kraftigt nedsatta hjärtfunktionen (Herbst., 2007)

### **Dilaterad kardiomyopati hos grand danois**

En studie visar att 8 % av den svenska hundpopulationen dör till följd av hjärtsjukdom. Samma studie visar att grand danois är den tredje mest drabbade rasen och att 55 % av dessa lidit av DCM (Egenvall et al., 2006). Ändå finns förhållandevis lite publicerat kring sjukdomen hos rasen både vad gäller kliniska tecken, bakomliggande orsaker samt eventuellt nedärvningsmönster (Meurs et al., 2001). Hos grand danois har både autosomt dominant, autosomt recessivt och x-bundet nedärvningsmönster föreslagits (Meurs et al., 2007, Tidholm and Jonsson, 1997, Stephenson et al., 2012)

### **Kliniska fynd**

De vanligaste kliniska tecknen som gör att djurägare söker veterinärvård vid manifesterad DCM är hosta, dyspné, motionsintolerans och svimningar (Herbst., 2007). Klinisk undersökning visar tachypné, tachykardi, arytmier, svag femoralispuls samt ascites. Ett lågintensivt systoliskt blåsljud med *puncta maxima* över *mitralis* kan höras vid auskultation (Tidholm and Jönsson, 2005). Grand danois som utvecklar sjukdomen uppvisar oftast kammardilatation, vänster- eller dubbelsidig hjärtsvikt samt förmaksflimmer (Stabej et al., 2005). Radiologiska fynd består av kardiomegali, pulmonär venstas samt interstitiell och alveolärt lungödem. EKG-förändringar är mycket vanligt hos hundar med DCM men är inte diagnostiskt. Den vanligaste arytmien hos de flesta raser är förmaksflimmer. Dock ses framför allt ventrikulära extraslag hos dobermann och boxer (Tidholm and Jönsson, 2005, Stephenson et al., 2012).

### **Diagnos**

Dilaterad kardiomyopati hos levande hund diagnosticeras med ultraljudsundersökning, som inkluderar undersökning med doppler där blodflödets hastighet och riktning kan bedömas, för att utesluta andra hjärtsjukdomar. Diagnostiska fynd inkluderar kraftig kammardilatation och myokardiell hypokinesi, i avsaknad av andra avvikelser på hjärtat. Det finns dock flera olika orsaker till myokardiell hypokinesi som kan vara mycket svårt att skilja från varandra kliniskt, varför en ante-mortemdiagnos av DCM inte är en definitiv diagnos utan en sannolikhetsdiagnos (Tidholm et al., 2001a). European Society of Veterinary Cardiology (ESVC) har presenterat riktlinjer för ultraljudsundersökningen för att underlätta diagnostiken. (Dukes-McEwan et al., 2003)

Den subkliniska fasen är svår att diagnostisera och risken är därför hög för falskt positiva och falskt negativa svar vid försök att ställa diagnos hos dessa hundar. Detta i kombination med sent insättande av sjukdomstecken, gör att det är svårt att utesluta bärare av sjukdomen från populationen avelsdjur, eftersom många hundar redan har hunnit reproducera sig när sjukdomen debuterar (Herbst, 2007).

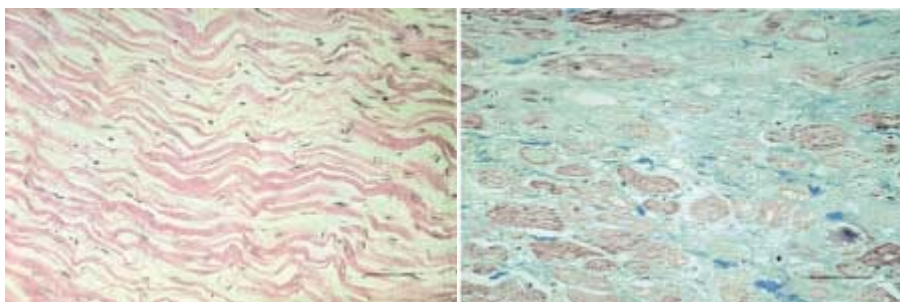
## Prognos

Prognosen för hundar i manifesterad DCM är på sikt mycket avvaktande och överlevnaden varierar mellan några dagar till år. Variationerna i överlevnadstid kan eventuellt förklaras av olika former av hjärtsvikt samt skillnader i medicinering mellan olika studier. Flera undersökningar har gjorts för att hitta ett samband mellan kliniska fynd och överlevnadstid, men bortsett från grad av hjärtsvikt har inga signifikanta samband hittats. (Tidholm and Jönsson, 2005). Det finns dock studier som visar på en reversibel taurinbrist-inducerad form av DCM hos bland annat cocker spaniel (Tidholm et al., 2001a).

## Patologi

Makroskopisk undersökning av hjärtan från hundar som drabbats av DCM visar att det snarare rör sig om en eccentric hypertrofi än ren dilatation. Detta baseras på det faktum att hjärtats vikt i förhållande till kroppsvikten ökar samtidigt som kammarväggen förtunnas. Eccentric hypertrofi orsakas av den volymsöverbelastning som ses vid DCM då hjärtat inte förmår pumpa vidare blodet till kroppens vävnader i och med att myokardiets kontraktionskraft försämras (Tidholm and Jönsson, 2005).

Det finns två vanligt förekommande histopatologiska typer av DCM: attenuated wavy fibres och degenerativ fettinfiltrativ typ. Attenuated wavy fibres karaktäriseras av tunna, vågformade myocyter som separeras av vätskefyllda områden. Denna variant ses oftast hos jättesaser och tyder på att förändringar i cytoskelettet är inblandat i utvecklandet av DCM. Fettinfiltrationstypen ses framför allt hos boxer, men även hos dobermann. Denna form karaktäriseras av myocytolys, degeneration och atrofi av myofibrer där myocyter ersätts av kollagen och adipocyter. Indelningen av DCM enligt de histopatologiska fynden är mer rättvisande än indelning enligt ras då vissa raser kan uppvisa båda formerna. (Tidholm and Jönsson, 2005). De histopatologiska fynden anses föregå de kliniska tecknen och reflekterar sannolikt tidiga tecken på DCM (Herbst., 2007).



*Bild 1. Histopatologisk bild av attenuated wavy fibres respektive degenerativ fettinfiltration. Courtesy of L. Jönsson*

## Neuroendokrina faktorer

När hjärtat börjar få svårt att tillfredsställa kroppens behov av blod- och syreförsörjning och blodtrycket sjunker, agerar ett stort antal endokrina kompensatoriska mekanismer tillsammans

för att upprätthålla den homeostatiska balansen. Dessa mekanismer initieras av neuroendokrina faktorer som renin-aldosteron-angiotensin-systemet (RAAS) med en samtidig aktivering av det sympatiska nervsystemet. Renin-aldosteron-angiotensin-systemet bibehåller normalt arteriellt blodtryck genom att öka plasmavolymen via natrium- och vattenretention i njuren, genom arteriell vasokonstriktion och genom att öka törsten. Sympatikuspåslaget ger ökad inotrop samt kronotrop effekt på hjärtat, i kombination med systemisk vasokonstriktion. De positiva effekterna av perifer vasokonstriktion och plasmaexpansion avtar dock snart och istället ses en ökad belastning på det redan sviktande hjärtat. (Tidholm et al., 2005, Tidholm et al., 2001b).

Effekterna av RAAS- och sympatikuspåslaget motverkas av natriuretiska peptider genom natriures, diures och vasodilatation. Hos friska individer upprätthålls den hemostatiska balansen genom en jämvikt mellan de båda systemen, medan det hos individer med icke-kompenserad hjärtsvikt ofta ses en obalans. (Tidholm et al., 2005, Tidholm et al., 2001b).

Vid hjärtsvikt sker även en kraftig ökning av katekolaminer i blodet. Detta leder på sikt till en nedreglering av  $\beta$ -adrenoreceptorer i myocyterna och desensibilisering av kvarvarande receptorer, vilket i sin tur ger försämrad systolisk och diastolisk funktion. Det kraftiga adrenerga stimuli på myokardiet kan även ge arytmier och myocytdöd (Borgarelli et al., 2001). Det är dock inte känt om ökningen av cirkulerande katekolaminer orsakar skador på hjärtcellerna eller om ökningen orsakas av att hjärtat sviktar. (Tidholm et al., 2001b)

## **Behandling**

Det går inte att bota DCM, men en studie på dobermann har visat att behandling med Pimobendan vid preklinisk DCM signifikant förlänger tiden till insättande av kliniska sjukdomstecken samt ger en ökad överlevnadstid. Pimobendan är en fosfodiesterashämmare som även ökar hjärtcellens känslighet för calcium. Detta ger ökad kontraktionskraft och en samtidig vasodilaterande effekt vilket leder till ökad cardiac output utan att öka hjärtats belastning och syreförbrukning (Fuentes, 2004). Hundarna i studien uppvisade även en signifikant minskning av hjärtstorlek efter 30 dagars behandling med Pimobendan, vilket kunde associeras till den förlängda tiden till utvecklandet av hjärtsvikt. Det finns dock ännu inga studier på effekten av Pimobendanbehandling av grand danois med DCM. (Summerfield et al., 2012).

Aktivering av RAAS har en central roll i patofysiologin av hjärtsvikt och behandling av symptomatisk DCM består därför även av ACE-hämmare och, om indikerat, diuretika. Vid hjärtsvikt, oavsett orsak, är behandling med diuretika ett livräddande förstahandsval. (Borgarelli et al., 2001, Franz et al., 2001).

## **Genetik**

Hundens form av DCM och den form som ses hos människa har såväl kliniska som patologiska likheter. Studier rörande DCM hos människa har påvisat en genetisk bakgrund i upp till 35 % av fallen och den höga prevalens som ses hos vissa hundraser tyder på en genetisk bakgrund även hos hund. Hos människa, men även hos ett antal hundraser, har ett

flertal mutationer i gener som kodar för proteiner som ingår i cytoskelettet och delar av sarcomeren kunnat fastställas. Dessa mutationer leder till sämre stabilitet av myocyten samt försämrade kontraktionsförmåga. Sannolikt orsakas sjukdomen av mutationer i flera olika loci (Franz et al., 2001, Stabej et al., 2005)

Hos dobermann har en studie kunnat visa förändringar i ett locus i kromosom 5 (Mausberg et al., 2011). En annan studie på dobermann visade förändringar i PDK4, ett mitokondriellt protein som reglerar energimetabolismen i hjärtat (Meurs et al., 2012). Portugisisk vattenhund har vistas ha en mutation i ett locus i kromosom 8 (Werner et al., 2008). Hos irländsk varghund har mutationer i TCAP-genen påvisats. TCAP kodar för proteiner i z-disken som binder samman sarcomererna. Mutationer i denna gen ger därmed instabilitet och nedsatt funktion (Philipp et al., 2008).

### **Arvbarhet**

DCM är av allt att döma ärftligt hos grand danois och det finns ett stort intresse från såväl djurägare som uppfödare och veterinärer att hitta en metod för gentester som skulle kunna påvisa bärare av sjukdomsanlaget för att utesluta dessa ur avel. Ärftligheten har studerats hos grand danois, och i likhet med andra raser har ett autosomalt dominant nedärvningsmönster föreslagits. Dock har även x-bunden recessiv nedärvning rapporterats (Meurs et al., 2001, Stephenson et al., 2012).

Mendelsk nedärvning av sjukdomar kan ske enligt fem olika nedärvningsmönster: autosomal dominant, autosomal recessiv, x-bunden dominant, x-bunden recessiv och mitokondriell nedärvning. Fastställande av arvbarhet försvåras i många fall av att den orsakande genen har ofullständig penetrans och varierande uttryck, samt på grund av modifierande gener som antingen förstärker eller trycker ned den orsakande allelen (Herbst., 2007).

### ***Definition:***

*Autosomal dominant nedärvning* – innebär att sjukdom ses i flera generationer. Lika många hanar som tikar insjuknar. En 50 % risk föreligger för avkomman till en drabbad hund att utveckla sjukdomen oavsett kön. Om en individ får två sjuka anlag är den sällan livsduglig. Utvecklande av sjukdom kan bero på anlagent penetrans och andra geners förmåga att kompensera.

*Autosomal recessiv nedärvning* – innebär att det krävs 2 bärare av anlagent för att avkomman ska utveckla sjukdomen. Varje frisk bärare löper 50 % risk att föra anlagent vidare vilket ger 50 % risk att avkomman blir frisk bärare och 25 % risk att avkomman utvecklar sjukdom. Två sjuka föräldrar ger alltid en sjuk avkomma. Lika många hanar som tikar drabbas.

*X-bunden dominant nedärvning* – innebär att det inte sker någon nedärvning från far till son eftersom sonen får Y-kromosomen från fadern. Hanvalpar som får anlagent av sin mor blir sjuka, liksom tikar som alltid drabbas om de får anlagent av någon av föräldrarna. En sjuk tik

löper 50 % risk att föra sjukdomen vidare till sina avkommor. X-bunden dominant nedärvning drabbar fler tikar än hanar då tikar har två X-kromosomer som båda kan bära på anlaget.

*X-bunden recessiv nedärvning*- innebär att det inte sker någon nedärvning från far till son. En hanvalp som får anlaget från sin mor utvecklar alltid sjukdom pga av avsaknad av annan frisk X-kromosom. Döttrar till en sjuk far blir alltid bärare av anlaget och utvecklar sjukdomen om de nedärver samma mutation från modern. En frisk tik som bär på anlaget löper 50 % risk att föra det vidare till sina avkommor, oavsett kön. X-bunden recessiv nedärvning ger högre andel sjuka hanhundar än sjuka tikar eftersom det endast krävs en sjuk x-kromosom hos hane för att anlaget ska nedärvas.

*Mitokondriell nedärvning* – Enbart maternell nedärvning då fostrets mitokondrier kommer från moderns ägg. Detta innebär att alla sjuka individer har en drabbad mor (Meurs et al., 2001)

## **LUPA**

LUPA är ett stort EU-finansierat forskningsprojekt där ett antal europeiska universitet samarbetar med målet att identifiera den genetiska orsaken bakom ett antal sjukdomar hos hund. Prover från friska och sjuka hundar analyseras och jämförs för att söka efter avvikelser och mutationer som kan kopplas till den aktuella sjukdomen. Detta ska sedan dels användas för att minska prevalensen av dessa sjukdomar i hundpopulationen men även som grund för forskning på samma eller liknande sjukdomar hos människa.

Inom LUPA pågår ett DCM-projekt sedan 2008 och ett mycket stort antal blodprover från 4 olika hundraser (grand danois, newfoundland, dobermann och irländsk varghund) har samlats in under denna period. Blodproverna har frysts ned i väntan på att analys ska bli möjlig. I och med att hundens genom kartlades finns nu goda möjligheter för att forskningen ska kunna fastställa var i genomet som den eller de mutationer som orsakar DCM finns (Lequarré et al., 2011, Lindblad-Toh et al., 2005).

## **SYFTE**

Eftersom kunskap om hur DCM nedärvs är av betydelse för tolkning av molekylärgenetiska resultat, var syftet med denna studie är att undersöka nedärvningsmönstret av DCM hos grand danois. Studien innefattade även en bedömning av könsfördelning av DCM hos grand danois samt medellivslängd hos hanar respektive tikar som drabbats av DCM. Vidare undersöktes medellivslängden hos hundar med och utan DCM samt dödsorsaker hos hundar som inte uppvisat tecken på hjärtsjukdom. Informationen sparades i syfte att användas vid forskningen kring vilken eller vilka gener som orsakar DCM.

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Uppföljning kliniskt status hos provtagna hundar**

256 hundar hade provtagits under åren 2008-2012 i syfte att ingå i LUPA-projektet. Samtliga hundar var renrasiga grand danois hemmahörande framför allt i Sverige men även i Norge. Ett

flertal hundar hade provtagits i samband med att uppfödare eller ägare hade valt att screena sina hundar för hjärtsjukdom. Screening innebar en allmän klinisk undersökning samt ultraljudsundersökning för att identifiera eventuella tecken på DCM eller andra avvikelser på hjärtat. De flesta av de hundar som ingick i studien hade dock provtagits i samband med utställningar eller tävlingar, och merparten av dessa hade varken genomgått allmän klinisk undersökning eller ultraljudsundersökning. Ett antal hundar hade undersökts av veterinär och provtagits på grund av att de uppvisat kliniska tecken på hjärtsjukdom.

De hundar som ingick i studien följdes upp telefonledes i syfte att fastställa deras kliniska status. För att ingå i studien krävdes att hunden var renrasig grand danois och att ägaren eller behandlande veterinär lämnat tillräcklig information om hundens nuvarande hälsoläge för att en bedömning skulle kunna göras. För att kunna klassas som frisk i avseende DCM krävdes dessutom att hunden uppnått 6 års ålder.

Om hunden var vid liv ställdes frågor kring allmäntillstånd, övriga sjukdomar, medicinering samt eventuella tecken på hjärtsjukdom. Om hunden var avliden registrerades dödsorsak, tidpunkt för dödsfall samt om eventuell obduktion utförts. När det bedömdes nödvändigt följdes de upplysningar djurägare och uppfödare delgett upp genom journalkopior från behandlande veterinärer. Ingen journalkopia kontrollerades utan tillstånd från djurägaren.

### **Sammanställning av information**

Materialet från telefonintervjuerna kontrollerades för att göra en bedömning av sannolikheten för att en hund var frisk eller sjuk i DCM. Bedömningen baserades på en sannolikhetskala med tre nivåer där patologianatomisk diagnos (PAD) genom obduktion innebar säker diagnos. Nästa nivå var ultraljudsfynd som tyder på DCM, med eller utan tecken på hjärtsvikt, baserat på de riktlinjer som finns angivna för diagnos av sjukdom (Dukes-McEwan et al., 2003). Lägst på sannolikhetskalan var klinisk misstanke baserat på sjukdomstecken beskrivna av djurägare under intervjun eller av annan veterinär.

Enbart hundar över 6 år bedömdes som friska. Information rörande levande hundar under 6 år sparades för framtida projekt, medan avlidna hundar under 6 år utan kliniska tecken på DCM ingick i den del av studien som behandlar dödsorsaker och medellivslängd hos övriga hundar.

Uppgifter om avlidna hundars dödsorsaker registrerades under ett antal diagnosklasser som upprättades under försökets gång.

### **Statistiska metoder**

Samtliga statistiska analyser utfördes med hjälp av statistikprogram JMP v9.0 (SAS Inc., Cary, NC, USA). Avlidna hundars födelsedatum, dödsdatum och dödsorsak sammanställdes för att beräkna medellivslängd och standardavvikelser för de olika diagnosklasserna. Tukey Kramer testet användes för att undersöka om det fanns någon signifikant skillnad i medellivslängd hos hundar som avlidit till följd av DCM och övriga dödsorsaker. För att undersöka en eventuell signifikant skillnad i medeldödsålder hos tik och hanhund som avlidit

till följd av DCM användes Students' t-test. Proportionerna av tikar respektive hanar drabbade av DCM undersöktes med hjälp av Fisher's exact test för att se om skillnaden var signifikant.

### **Sibling Risk Ratio**

Sibling risk ratio användes för att bedöma hur mycket högre risk ett kullsyskon till en DCM-sjuk individ hade att utveckla sjukdom jämfört med resten av populationen. Resultatet skildrar det genetiska bidraget till sjukdomen. Ett värde på över 5 anses som signifikant (Villanueva et al. 2003, Hagman., 2009)

$$\frac{\left(\frac{\text{Antal individer med } > 2 \text{ individer som drabbats av DCM}}{\text{Antal individer med } < 2 \text{ individer som drabbats av DCM}}\right)}{\text{Prevalensen för sjukdomen hos rasen}} = \lambda_S$$

### **Nedärvmönster**

För att studera arvbarheten av DCM hos grand danois upprättades ett familjetråd över 5 generationer. En linje med ett flertal kända fall av DCM följdes upp retrospektivt avseende diagnosticerad DCM eller kliniska tecken på hjärtsjukdom. Observationerna sammanställdes sedan för att undersöka ett eventuellt enkelt mendelskt nedärvmönster.

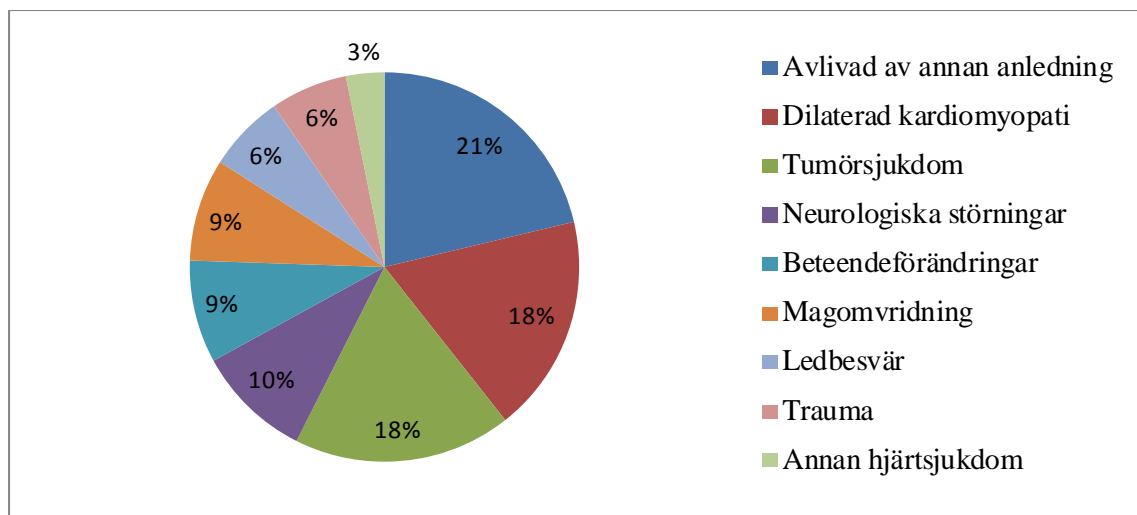
## **RESULTAT**

### **Urval studiepopulation**

Av de totalt 256 provtagna hundarna utgick 72 ur studien på grund av att ägarna inte kunde lokaliseras eller valde att inte längre delta i studien. 184 hundar, varav 106 tikar och 78 hanhundar, följdes därmed upp och bedömdes avseende hälsostatus och eventuell dödsorsak. Ytterligare 75 hundar under 6 år och utan kliniska tecken på DCM och hundar som avlidit eller avlivats av annan orsak innan 6-års ålder, utgick ur den del av studien som behandlar könsfördelning och medeldödsålder av DCM. Detta gav totalt 110 hundar, fördelat på 65 tikar och 45 hanhundar, som kunde bedömas rörande förekomst av DCM.

### **Dödsorsaker**

Av samtliga 185 hundar som ingick i studiepopulationen hade 92 avlidit. Dödsorsaker samt fördelningen av hundar som avlidit i dessa redovisas i figur 1.



Figur 1. Registrerade dödsorsaker samt fördelningen av antalet hundar som avlidit i de olika diagnosgrupperna. Gruppen "Avlivad av annan orsak" inkluderar: leversvikt, magtarmproblem, djurägares tidsbrist, förlossningskomplikationer, pyometra, prostatit samt infektion

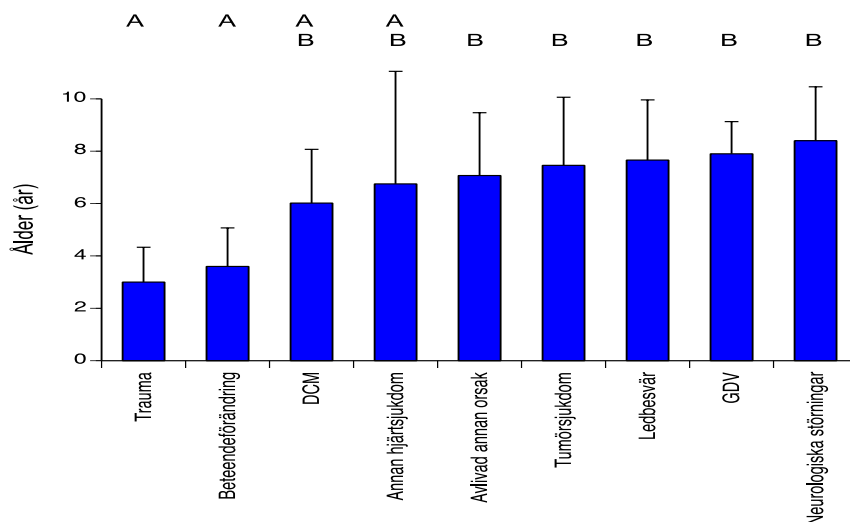
### Medeldödsålder

Testet visade att hundar som avlidit till följd av trauma och beteendeförändringar hade dött vid en signifikant lägre ålder än hundar som dött av andra orsaker. Ingen signifikant skillnad i dödsålder mellan hundar som dött till följd av DCM och hundar som dött av andra orsaker kunde fastställas ( $p > 0.05$ ). Resultaten redovisas nedan i tabell 1 och figur 2.

Tabell 1. Registrerade dödsorsaker samt antal och medeldödsålder för de hundar som avlidit i de olika diagnosklasserna

Dödsorsak	Antal	Medeldödsålder (år)
Avlivad annan orsak	18	7,1
Dilaterad kardiomyopati	17	6,0
Tumörsjukdom	17	7,5
Neurologiska störningar	9	8,4
Beteendeförändring	8	3,6
Magomvridning	8	7,9
Ledbesvär	6	7,7
Trauma	6	3,0
Annan hjärtsjukdom	3	6,8
<b>Total</b>	<b>92</b>	<b>6,44</b>





Figur 2. Medeldödsålder samt standardavvikelse för de olika dödsorsakerna hos 92 avlidna grand danois. Resultat från gruppvisa jämförelser visas överst i bilden. Dödsorsaker som delar samma bokstav skiljer sig inte åt i den statistiska analysen.

### Medeldödsålder DCM

Medelålder för samtliga hundar som avlidit eller avlivats till följd av DCM var 6,1 år. Fördelningen mellan kön visade en medelålder på 6,0 år hos tik och 6,2 år hos hanhund. Denna skillnad var inte statistiskt signifikant ( $P = 0.94$ )

### Sjuka respektive friska hundar avseende DCM

Klassificering av hundar gjordes enligt sannolikhetsnivåerna: PAD, ultraljudsundersökning och anamnestiska uppgifter. Resultaten presenteras nedan i Tabell 2.

Tabell 2. Fördelning av sjuka och friska hundar enligt bedömningsnivåerna.

	PAD	Ultraljud	Anamnes	Total
DCM	4	9	8	21
Ej DCM	2	7	80	89
Totalt	6	16	88	110

## Könsfördelning

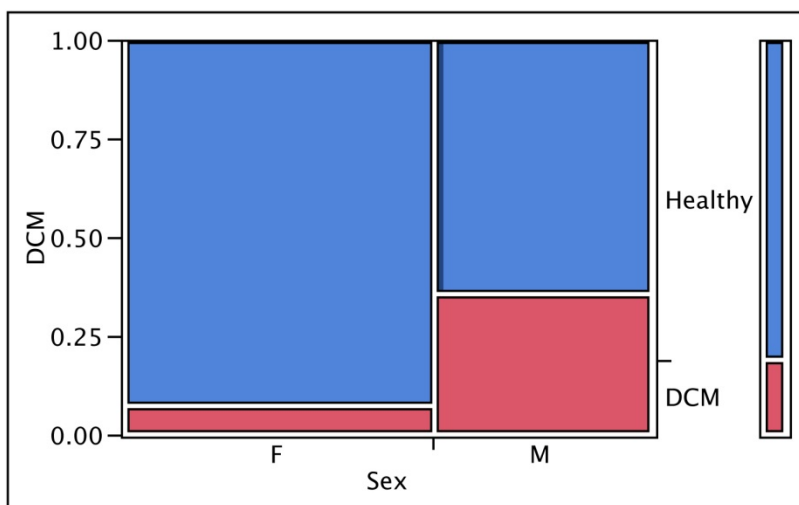
Den totala studiepopulationen av 110 hundar omfattade 65 tikar och 45 hanhundar. Av dessa klassades 5 tikar och 16 hanhundar som drabbade av DCM.

Prevalens DCM hos tik: 5 av 65 = 7,7 %

Prevalens DCM hos hanhund: 16 av 45 = 35,6 %

Total av studiepopulation: 21 av 110 = 19,1 %

Skillnaden i prevalens mellan könen var enligt Fisher's exact test signifikant. Resultatet ( $P < 0.0004$ ) presenteras i diagrammet nedan.



Figur 3. Könsfördelning av 21 grand danois klassade som drabbade av DCM.

## Sibling Risk Ratio

Antal kullar med  $\geq 2$  sjuka individer: 5 st

Antal kullar med  $< 2$  sjuk individ: 16 st

Prevalens för DCM hos Grand Danois: 0,039 (Sisson & Thomas 1995)

$$\frac{\left(\frac{5}{16}\right)}{0,039} = 8,01$$

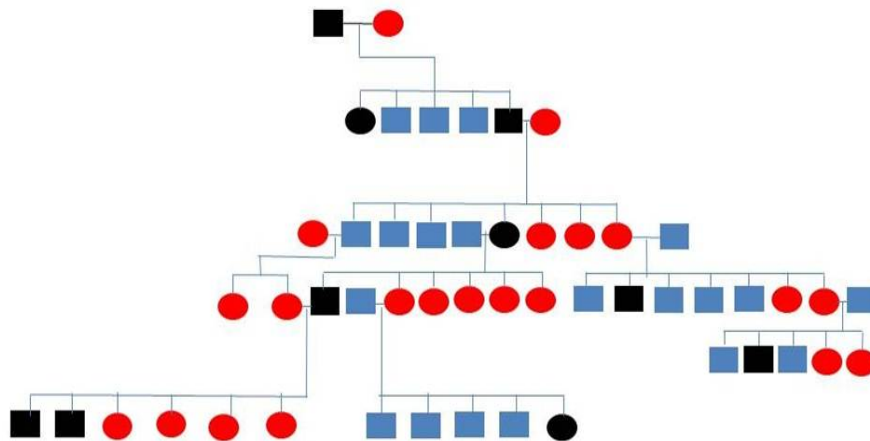
Resultatet visar att en individ med minst ett sjukt kullsyskon hade en signifikant ökad risk att utveckla sjukdomen. I detta fall beräknades risken att vara 8 gånger högre än hos en individ med friska kullsyskon.

## Nedärvningsmönster

Analys av det familjetråd (figur 4) som användes i studien visar:

- DCM ses i varje generation
- Både tikar och hanar drabbas
- En sjuk far och en till synes frisk mor kan få sjuka avkommor av båda könen.
- En sjuk far och en till synes frisk mor kan få sjuka avkommor av båda könen.
- Två till synes friska föräldrar kan få sjuka avkommor av båda könen.

Ovanstående observationer tyder på att nedärvningsmönstret kan vara autosomal dominant med ofullständig penetrans.



Figur 4. Familjetråd av en linje grand danois med ett flertal fastställda fall av DCM.  
Röd cirkel = tik, blå rektangel = hanhund, svart figur = DCM-drabbad hund

## DISKUSSION

De vanligaste dödsorsakerna i studiepopulationen visade sig vara DCM, tumörsjukdom och "avlivad av annan anledning". Gruppen "avlivad av annan anledning" var en sammanslagning av diagnoserna: leversjukdom, pyometra, prostatit, magtarmproblem, ägares tidsbrist samt infektioner. De tre därefter vanligaste dödsorsakerna var neurologiska störningar, beteendeförändringar och magomvridning. Dessa resultat är väl överensstämmande med tidigare undersökningar av den svenska grand danoispopulationen (Bonnett et al., 2005).

En begränsning var att dödsorsakerna fastställdes genom telefonintervjuer med djurägare, vilket innebär att uppgifterna var direkt beroende av att kommunikationen fungerat väl mellan djurägare och behandlande veterinär samt den person som utfört intervjuerna. Merparten av

de sjukdomar som hundarna drabbats av har dock kliniska tecken som är svåra att missta för annan sjukdom, varför diagnoserna kan anses förhållandevis säkra.

De två dödsorsaker som signifikant skiljde sig avseende dödsålder var trauma (3,0 år) och beteendeförändringar (3,6 år). De fall av trauma som registrerades omfattade till stor del trafikolyckor eller hundslagsmål. Beteendeförändringar rörde främst aggressiva tendenser hos hundarna. Det faktum att hundarna i dessa fall avlidit på grund av yttre våld eller avlivning utan kliniska tecken på fysisk sjukdom bidrog sannolikt till den låga dödsåldern. Ingen signifikant skillnad i dödsålder mellan hundar som dött i DCM (6,1 år) respektive andra dödsorsaker (7,3 år) kunde påvisas, men en trend som tydde på kortare livslängd kunde anas för såväl DCM som gruppen ”annan hjärtsjukdom”.

Tidigare undersökningar av grand danois-populationer visar att hanhundar löper upp till 5 gånger högre risk än tikar att insjukna i DCM (Egenvall et al., 2006, Tidholm and Jonsson, 1997, Stephenson et al., 2012, Meurs et al., 2001). Även denna studie visade en statistiskt signifikant överrepresentation av hanhundar. Det har föreslagits att tikar skulle ha en senare sjukdomsdebut men ett snabbare förlopp av sjukdomen och att detta delvis skulle kunna förklara den överrepresentation av hanhundar som rapporterats.(Stephenson et al., 2012). Ingen signifikant skillnad i medeldödsålder mellan tikar (6,0 år) och hanhundar (6,2 år) kunde dock påvisas i vår studiepopulation. För att kunna fastställa ett sådant mönster krävs att det finns registrerade uppgifter om när de första tecknen på sjukdom upptäckts samt regelbundna uppföljningar med ultraljud för att följa sjukdomsutvecklingen. Dessutom bör ultraljudsundersökningarna utföras enligt samma riktlinjer för att få en så likartad bedömning som möjligt. Hundarna i denna studie följdes upp retrospektivt och, i de flesta fall, utan regelbundna ultraljudsundersökningar, vilket gjorde att en sådan bedömning inte var möjlig. En studie som gjorts på dobermann visar att tikar verkar ha ett långsammare sjukdomsförlopp än hanhundar. De tikar som undersöktes uppvisade, även i hög ålder, oftast enbart ventrikulära extraslag, medan det hos hanhundar kunde ses ultraljudsförändringar redan i ett tidigt stadie. För att påvisa ventrikulära extraslag krävs oftast en 24-timmars Holterundersökning som sällan ingår i en vanlig hjärtundersökning, vilket sannolikt också bidrar till att färre fall hos tik diagnosticeras (Wess et al., 2010)

Av de 110 hundar som utgjorde den totala studiepopulationen avseende DCM klassades 21 hundar som drabbade av DCM och 89 hundar kunde klassas som friska. Sjukdomsprevalensen avseende DCM beräknades till 19,1 % vilket är högre än vad som angetts i flera tidigare studier (Egenvall et al., 2006, Bonnett et al., 2005, Sisson & Tomas., 1995). Detta kan förklaras av att det skett en viss selektion av hundar med kliniska tecken på hjärtsvikt samt hundar som ansetts befinna sig i en riskgrupp för att utveckla DCM. Prevalensen av DCM kan därför sannolikt inte appliceras till den allmänna grand danois-populationen. Vad gäller de övriga dödsorsakerna skedde ingen selektion, varför det bör anses förhållandevis säkert att tro att det resultatet även gäller för hundar utanför studien.

En begränsning i bedömningen är att antalet hundar som genomgått en ultraljudsundersökning var lågt och endast ett fåtal avlidna hundar obducerades. Patologanatomisk diagnos har

mycket hög sensitivitet och specificitet och ett rätt utfört ultraljud som baseras på de riktlinjer som finns angivna kan diagnosticera upp till 93 % av fall som diagnosticerats via PAD (Tidholm et al., 1998).

Merparten av bedömningarna av framför allt friska djur gjordes utifrån uppgifter från djurägare och i vissa fall genom journalkopior från behandlande veterinär. Detta gjorde att bedömningarna måste anses vara mindre säkra ur det avseendet och att det kan finnas ett mörkertal av prekliniska DCM-fall bland de hundar som klassats som friska.

Ett annat problem med att klassa hundar som friska var att ett antal av hundarna i studiepopulationen utvecklade eller åtminstone avlidit till följd av sjukdomen vid en betydligt högre ålder än 6 år som angavs som undre gräns för att kunna friförklaras från DCM. Åldersspannet hos de hundar som avlidit till följd av DCM sträcker sig från 4 till 11 år. Samtliga av de fyra hundar med diagnosen DCM som fortfarande var i livet var mellan 6 och 7 år. Detta innebär att det finns risk att någon eller några av de friska kontrollhundarna insjuknar i DCM i högre ålder.

Utifrån den studerade populationen och tidigare angiven prevalens (Sisson&Tomas., 1995), beräknades risken att nedärva det sjukdomsalstrande anlaget som 8 gånger högre hos en hund med ett eller flera kullsyskon som drabbats av DCM jämfört med en hund med friska kullsyskon. Detta indikerar, i enlighet med tidigare studier, att sjukdomen har en stark genetisk faktor hos grand danois (Stabej et al., 2005, Stephenson et al., 2012).

Resultatet av analysen av släktrådet kan tyda på ett autosomt nedärvningsmönster med ofullständig penetrans, vilket även har rapporterats i andra studier (Tidholm and Jonsson, 1997, Stephenson et al., 2012). Detta baserades huvudsakligen på att sjukdomen sågs i flera generationer samt hos både tikar och hanar i varje generation. Det som talade emot ett autosomt nedärvningsmönster var den signifikanta överrepresentationen av hanhundar. Vid autosomal nedärvning löper avkomman 50 % risk att ärva anlaget oavsett kön och prevalensen borde därmed inte skilja sig signifikant. Skillnaden i prevalens mellan könen skulle i detta fall kunna bero på att tikar, som tidigare nämnts, av någon anledning utvecklar sjukdomen senare i livet.

Det faktum att två till synes friska föräldrar kan få sjuka avkommor kan förklaras av att någon av föräldrarna bär på anlaget men inte ännu utvecklat sjukdomen, alternativt att den sjukdomsalstrande genen har ofullständig penetrans. Autosomal recessiv nedärvning ansågs mindre sannolik på grund av det höga antalet sjuka avkommor med en eller två till synes friska föräldrar. Även X-bunden recessiv nedärvning har föreslagits hos grand danois. (Meurs et al., 2007). Vid X-bunden recessiv nedärvning ses en generell överrepresentation av hanhundar då dessa bara har en X-kromosom och alltså alltid utvecklar sjukdom om de får anlaget. Dock kan anlaget bara nedärvas från modern då fadern ger sin Y-kromosom till sonen. Familjetrådet i vår undersökning visade ett flertal nedärvingar från far till son, vilket alltså talade emot att det skulle röra sig om X-bunden recessiv nedärvning. X-bunden dominant nedärvning bedömdes vara mindre trolig eftersom prevalensen då är högst hos tik,

samt att flera fall av nedärvning från far till son kunde ses i vår undersökning. Även mitokondriell nedärvning kan endast ske från modern och kan därför anses osannolik.

Viktiga begränsningar i denna studie av arvbarhet är att den undersökta populationen var förhållandevis liten samt att brist på information om hundar gjorde att släkträdet som upprättades endast täckte en linje hundar. Det saknades även information om ett flertal hundar i det släkträd som analyserats. Detta innebär att det, som tidigare nämnts, finns en stor sannolikhet att flera av de hundar som klassats som friska kontroller kommer att utveckla sjukdomen senare i livet.

## **KONKLUSION**

Studien visade att DCM är en vanlig dödsorsak hos grand danois och att sjukdomen av allt att döma har en genetisk faktor i de flesta fall. De tre vanligaste dödsorsakerna utöver DCM i denna studiepopulation var avlivad av annan orsak, tumörsjukdomar och neurologiska störningar. Ingen signifikant skillnad i medellivslängd mellan hundar som dött av DCM eller andra dödsorsaker kunde påvisas, men en trend som tydde på kortare medellivslängd hos hundar med DCM kunde anas. Det sågs en signifikant överrepresentation av hanhundar bland de hundar som drabbats av DCM, men ingen signifikant skillnad i medellivslängd mellan tikar och hanhundar som drabbats av DCM kunde påvisas. Nedärvningsmönstret i denna studiepopulation tydde på en autosomal dominant nedärvning.

## **TACK**

Ett stort tack till mina fantastiska handledare Jens Haggström, Ingrid Ljungvall, Katja Höglund. Ni är alltid lika glada, hjälpsamma och välkomnande. Hoppas att vi ses även i framtiden!

Tack till Monica Stavenborn, en outtröttlig källa av information och kunskap om grand danoishundar och deras uppfödning.

Tack till Johan Karlsson för all hjälp.

Tack till alla djurägare och uppfödare som delat med er av era hundars liv.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Bonnett, B., Egenvall, A., Hedhammar, A. & Olson, P. 2005. Mortality in over 350,000 Insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, Gender-, Age- and Cause-specific Rates. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 46, 105 - 120.
- Borgarelli, M., Tarducci, A., Tidholm, A. & Häggström, J. 2001. Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Part II: Pathophysiology and therapy. *The Veterinary Journal*, 162, 182-195.
- Dukes-McEwan, J., Borgarelli, M., Tidholm, A., Vollmar, A. C. & Häggström, J. 2003. Proposed Guidelines for the Diagnosis of Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Cardiology*, 5, 7-19.
- Egenvall, A., Bonnett, B. N. & Häggström, J. 2006. Heart Disease as a Cause of Death in Insured Swedish Dogs Younger Than 10 Years of Age. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, 894-903.
- Franz, W.-M., Müller, O. J. & Katus, H. A. 2001. Cardiomyopathies: from genetics to the prospect of treatment. *The Lancet*, 358, 1627-1637.
- Fuentes, V. L. 2004. Use of pimobendan in the management of heart failure. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 34, 1145-1155.
- Lequarré, A.-S., Andersson, L., André, C., Fredholm, M., Hitte, C., Leeb, T., Lohi, H., Lindblad-Toh, K. & Georges, M. 2011. LUPA: A European initiative taking advantage of the canine genome architecture for unravelling complex disorders in both human and dogs. *The Veterinary Journal*, 189, 155-159.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J., Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, C. P., Galibert, F., Smith, D. R., DeJong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C.-W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., Decaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K.-P., Parker, H. G., Pollinger, J. P., Searle, S. M. J., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C. & Lander, E. S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438, 803-819.
- Mausberg, T.-B., Wess, G., Simak, J., Keller, L., Drögemüller, M., Drögemüller, C., Webster, M. T., Stephenson, H., Dukes-McEwan, J. & Leeb, T. 2011. A Locus on Chromosome 5 Is Associated with Dilated Cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *PLoS ONE*, 6, e20042.
- Meurs, K., Lahmers, S., Keene, B., White, S., Oyama, M., Mauceli, E. & Lindblad-Toh, K. 2012. A splice site mutation in a gene encoding for PDK4, a mitochondrial protein, is associated with the development of dilated cardiomyopathy in the Doberman pinscher. *Human Genetics*, 131, 1319-1325.
- Meurs, K. M., Fox, P. R., Norgard, M., Spier, A. W., Lamb, A., Koplitz, S. L. & Baumwart, R. D. 2007. A Prospective Genetic Evaluation of Familial Dilated Cardiomyopathy in the Doberman Pinscher. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 1016-1020.
- Meurs, K. M., Miller, M. W. & Wright, N. A. 2001. Clinical features of dilated cardiomyopathy in Great Danes and results of a pedigree analysis: 17 cases (1990–2000). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218, 729-732.
- Philipp, U., Vollmar, A. & Distl, O. 2008. Evaluation of the Titin-Cap Gene (TCAP) as Candidate for Dilated Cardiomyopathy in Irish Wolfhounds. *Animal Biotechnology*, 19, 231-236.



- Stabej, P., Leegwater, P. A., Stokhof, A. A., Domanjko-Petrič, A. & Van Oost, B. A. 2005. Evaluation of the phospholamban gene in purebred large-breed dogs with dilated cardiomyopathy. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 432-436.
- Stephenson, H. M., Fonfara, S., López-Alvarez, J., Cripps, P. & Dukes-McEwan, J. 2012. Screening for Dilated Cardiomyopathy in Great Danes in the United Kingdom. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26, 1140-1147.
- Summerfield, N. J., Boswood, A., O'grady, M. R., Gordon, S. G., Dukes-McEwan, J., Oyama, M. A., Smith, S., Patteson, M., French, A. T., Culshaw, G. J., Braz-Ruivo, L., Estrada, A., O'sullivan, M. L., Loureiro, J., Willis, R. & Watson, P. 2012. Efficacy of Pimobendan in the Prevention of Congestive Heart Failure or Sudden Death in Doberman Pinschers with Preclinical Dilated Cardiomyopathy (The PROTECT Study). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26, 1337-1349.
- Tidholm, A., Häggström, J., Borgarelli, M. & Tarducci, A. 2001a. Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Part I: Aetiology, Clinical Characteristics, Epidemiology and Pathology. *The Veterinary Journal*, 162, 92-107.
- Tidholm, A., Häggström, J. & Hansson, K. 2001b. Effects of dilated cardiomyopathy on the renin-angiotensin-aldosterone system, atrial natriuretic peptide activity, and thyroid hormone concentrations in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 62, 961-967.
- Tidholm, A., Häggström, J. & Hansson, K. 2005. Vasopressin, cortisol, and catecholamine concentrations in dogs with dilated cardiomyopathy. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 1709-1717.
- Tidholm, A., Häggström, J. & Jönsson, L. 1998. Prevalence of attenuated wavy fibers in myocardium of dogs with dilated cardiomyopathy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212, 1732-1734.
- Tidholm, A. & Jönsson, L. 1997. A retrospective study of canine dilated cardiomyopathy (189 cases). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 33, 544-550.
- Tidholm, A. & Jönsson, L. 2005. Histologic Characterization of Canine Dilated Cardiomyopathy. *Veterinary Pathology Online*, 42, 1-8.
- Werner, P., Raducha, M. G., Prociuk, U., Sleeper, M. M., Van Winkle, T. J. & Henthorn, P. S. 2008. A novel locus for dilated cardiomyopathy maps to canine chromosome 8. *Genomics*, 91, 517-521.
- Wess, G., Schulze, A., Butz, V., Simak, J., Killich, M., Keller, L. J. M., Maeurer, J. & Hartmann, K. 2010. Prevalence of Dilated Cardiomyopathy in Doberman Pinschers in Various Age Groups. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, 533-538.