



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Tollare med SLE-liknande sjukdom: ANA-mönster i relation till MHC klass II-uttryck

Anna Hedlund

Uppsala

2013

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:41*

Tollare med SLE-liknande sjukdom:
ANA-mönster i relation till MHC klass II-uttryck
Nova Scotia duck tolling retrievers with SLE-related
disease: ANA-patterns correlated to MHC class II

Anna Hedlund

Handledare: Helene Hamlin, Institutionen för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Maria Wilbe, Institutionen för husdjursgenetik
Examinator: Jens Häggström, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0736, Nivå A2E, 30hp

Nyckelord: ANA-mönster, SLE-liknande sjukdom, IMRD, DLA, MHC klass II
Key words: ANA fluorescence pattern, SLE-related disease, IMRD, DLA, MHC class II
Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:41

SAMMANFATTNING

Hundrasen Nova Scotia duck tolling retriever (tollare) är överrepresenterad för autoimmun sjukdom med SLE-liknande inslag, immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD). Hos såväl människa som hund har kopplingar påvisats mellan autoimmuna sjukdomar och olika gener som kodar för MHC klass II. I en tidigare studie över tollare med IMRD sågs stark koppling till MHC klass II. I den här studien har vi tittat närmare på hundar med IMRD som är positiva för antinukleära antikroppar (ANA) och studerat eventuella kopplingar mellan immunofluorescens mönster och MHC klass II-generna. Hundarna har delats in i undergrupper utifrån om de haft ett kornigt eller homogent mönster vid positivt ANA. Vi har funnit att det finns ett starkt samband mellan en specifik genotyp för MHC klass II och hundar med kornigt ANA-mönster och generell homozygoti för hundar med homogent ANA-mönster.

SUMMARY

The canine breed Nova Scotia Duck Tolling retriever (NSDTR) is predisposed to SLE-like autoimmune disease, immune-mediated rheumatic disease (IMRD). In both man and dog a correlation between autoimmune disease and different MHC class II alleles has been found. An earlier study of NSDTRs with immune-mediated rheumatic disease (IMRD) showed a strong correlation to MHC class II. In this study we further investigate NSDTRs with IMRD who are positive for antinuclear antibodies (ANA). The dogs were grouped according to the immunofluorescence pattern and divided into groups with speckled and homogenous ANA-pattern to see if any group are more associated to MHC class II or not. We found a strong correlation between a specific MHC class II-genotype and a speckled ANA-pattern. Dogs with homogenous ANA-pattern tend to have a higher frequency of homozygous individuals.

INNEHÅLL

Sammanfattning	1
Summary	1
Förkortningar och ordlista	3
Inledning.....	4
Syfte	4
Rashistoria.....	4
Immunförsvaret	4
SLE och SLE-liknande sjukdomar	5
MHC och sjukdom	6
Material och metoder.....	9
Patienter och kontroller	9
Inklusionskriterier	9
IIF anatest.....	9
DNA extraktion.....	9
PCR amplifiering.....	9
DNA sekvensering och analys av data.....	10
Statistik.....	10
Etiskt godkännande	10
Resultat.....	11
Alleler, haplotyper och genotyper	11
Tabeller och data	13
Diskussion	21
Alleler.....	21
Haplotyper.....	21
Genotyper och generell homozygoti	21
Koppling mellan ANA ^K och och DLA-MHC klass II.....	22
Kopplingar mellan alleler i haplotyp 2 och andra sjukdomar	22
Praktisk användning av resultaten.....	22
Referenser.....	23

FÖRKORTNINGAR OCH ORDLISTA

IMRD	Immunmedierad reumatisk sjukdom, eng. immune-mediated rheumatic disease
SRMA	Steroidresponsiv meningit-arterit
SLE	Systemisk lupus erythematosus
ANA	Antinukleära antikroppar, dvs antikroppar mot cellkärneantigener
RNP	Ribonukleinprotein (RNA)
Anti-Smith	Antikroppar mot nukleära protein, namngett efter patienten Smith Även kallat Smith antigen.
Histoner	Strukturella proteiner som paketerar DNA-spiralen
dsDNA	Dubbelsträngat DNA
MHC	Eng. förkortning för Major Histocompatibility Complex, genkluster som bl.a. kodar för proteiner som ingår i MHC-receptorn som uttrycks på alla antigenpresenterande celler
Lokus	Ett bestämt område på en kromosom som innehåller en gen/allel
Allel	En av två eller flera varianter av en gen eller nukleotidsekvens som ligger i ett lokus
Haplotyp	Uppsättning gener/alleler som ligger nära varandra på den ena kromosomen och i praktiken alltid nedärvs tillsammans
Genotyp	En individs genetiska uppsättning
Fenotyp	Resultatet av genotypen, ex ögonfärg
Exon	Del av gen som kodar för ett protein.
Intron	Del av gen som inte kodar för ett protein.
Grundareffekt	Begrepp som används inom populationsgenetiken när en ny population bildas från ett fåtal individer.

INLEDNING

SYFTE

Syftet med den här studien är att undersöka om det finns en genetisk koppling mellan ANA-mönster och MHC klass II hos s.k. tollarsjuka hundar av rasen Nova Scotia duck tolling retrievers (tollare).

RASHISTORIA

Tollaren är en relativt ny ras i Europa, den första tollaren kom till Sverige 1984. Ursprungligen kommer rasen från Kanada och härstammar från början av 1600-talet och är en apportrande fågelhund som används för att söka upp skjutet vilt och sedan apportera det till föraren. Tollaren kan även användas som lockhund och locka till sig fågeln före skott, detta kallas ”tolling”. Rasen tillhör grupp 8 i Svenska Kennelklubben, ”stötande hundar, apportrande hundar och vattenhundar” tillsammans med andra retrieverraser (Lindholm, 1997). Trots att rasen funnits så länge registrerades den första tollaren i Kanada så sent som 1945 och totalt ingick endast 13-15 individer i den smala avelsbasen (Bauer, 2003, Lindholm, 1997).

Tollaren som ras var nära att dö ut under tidigt 1900-tal då stora delar av populationen slogs ut när Kanada drabbades av två stora valpsjukeutbrott 1908 och 1912 (Strang & MacMillan, 1996). I slutet av 1950-talet var de flesta av de individer som registrerades 1945 döda och rasen hotades återigen då antalet individer tillgänglig för avel var lågt men räddades av rasentusiaster (Bauer, 2003). Antalet grundare av rasen, dvs. antalet individer som registrerades och användes i aveln var få vilket ger upphov till s.k. grundare-effekt. Detta innebär att genfrekvensen speglas av grundarnas genuppsättning snarare än från den population grundarna kom ifrån.

IMMUNFÖRSVARET

Kroppens immunförsvar består av fysiska barriärer, det medfödda immunförsvaret och det förvärvade immunförsvaret. Allra först skyddas kroppen av barriärer som intakt hud och slemhinnor samt en skyddande bakterieflora men även reaktioner som hostningar, nysningar, kräkningar och diarré skyddar kroppen. Det medfödda immunförsvaret är snabbt och agerar inom timmar och består av makrofager, dendritceller, neutrofiler och NK-celler. Det förvärvade immunförsvaret är långsammare och agerar under dagar till veckor och består av T- och B-celler (Tizzard, 2009).

Autoimmuna sjukdomar uppkommer när immunförsvarets celler identifierar kroppsegna celler som främmande antigen. Detta kan ske endera vid ett normalt immunsvaret där kroppseget antigen som tidigare varit dolt kommit fram exempelvis vid en cell- eller vävnadsskada eller så kan ett onormalt immunsvaret ske när immunförsvarets reglering fallerar för ett vanligt antigen (Tizzard, 2009).

Autoimmuna sjukdomar kan vara systemiska eller organspecifika. Systemisk Lupus Erythematosus (SLE) orsakar skada i flera organsystem och är ett exempel på en systemisk autoimmun sjukdom. Dessutom görs en indelning i primär och sekundär autoimmun sjukdom

där den primära används när den autoimmuna reaktionen uppstår utan att underliggande orsak kan fastställas. Sekundär autoimmun sjukdom avser autoimmun sjukdom där man kan identifiera orsaken till reaktionen, ex. infektion, läkemedel, neoplasi, eller vaccin. Det är ofta svårt att fastställa vad som orsakar en autoimmun reaktion och sjukdomen kallas ofta immunmedierad när man inte säkert har kunnat fastställa bakomliggande immunologisk reaktion (Nelson & Couto, 2009).

SLE OCH SLE-LIKNANDE SJUKDOMAR

Det har på senare tid visat sig att hundrasen Nova Scotia duck tolling retriever tycks vara drabbad av immunmedierade sjukdomar i ökad utsträckning. Exempel på dessa sjukdomar är SLE-liknande immunmedierad reumatisk sjukdom (Immune Mediated Rheumatic Disease, IMRD), steroid responsiv meningit arterit (SRMA) och Addison's sjukdom (Anfinsen et al., 2008, Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009, Hughes et al., 2010). De skandinaviska tollarna är överrepresenterade för att drabbas av såväl IMRD som SRMA. I folkmun kallas detta sjukdomskomplex för tollarsjuka, även om en och samma individ sällan drabbas av båda varianterna. IMRD och SRMA är två skilda sjukdomar men båda kan ge upphov till stel och stapplande gång. Ursprunget till stelheten skiljer sig dock mellan de båda sjukdomarna. Vid IMRD ses framförallt en polyartrit som ger en vandrande hälta och stelhet. SRMA yttrar sig främst som stelhet i nacke och rygg till följd av en meningit, men där även generell stelhet och stapplande gång kan ses till följd av smärta. Vid SRMA är det dessutom vanligt med feber. Dessutom skiljer sig IMRD och SRMA sig åt gällande vid vilken ålder djuren insjuknar, IMRD drabbar vuxna hundar (i medeltal vid 3 års ålder) medan SRMA drabbar den yngre hunden (7-16 månaders ålder) (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009, Anfinsen et al., 2008).

I den här studien ligger fokus på tollare med sjukdomen IMRD. Tollare med IMRD uppvisar en varierande symtombild men vanligtvis ses symtom som stelhet, smärta från flera leder, vandrande hälta och i ett fåtal fall har även feber och hudproblem noterats (Axelsson, 2007, Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009). Tidigare studier har fastslagit att det rör sig om en immunmedierad/autoimmun sjukdom där ca 70 % av hundarna är positiva för ANA, samt att många av hundarna visar en förbättring vid insatt kortisonbehandling (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009).

SLE, systematisk lupus erythematosus finns beskrivet hos människa, apor, hundar, katter, hästar och möss (Tizzard, 2009). Vid SLE ses symtom som polyartrit, feber, proteinuri, anemi och hudsjukdom. Ett kännetecken för SLE är förekomsten av höga titrar av ANA, antinukleära antikroppar, som orsakar skada genom kronisk inflammation i olika delar av kroppen. Bland annat kan antikropparna initiera immunkomplexbildning som sedan kan orsaka njurskada såsom membranös glomerulonefrit. Immunkomplexen kan också deponeras i kärlväggar och orsaka nekros och fibros eller ansamlas i synovian och orsaka artrit. I begreppet ANA ingår många olika typer av autoantikroppar som alla har olika specificitet för strukturer i cellkärnan (Tizzard, 2009, Nelson & Couto, 2009).

För att diagnosticera SLE på humansidan krävs att patienten uppfyller minst fyra av följande elva kriterier: ansiktserytem, diskoida erytem, fotosensibilitet, munhålesår, icke erosiv artrit,

serosit, njursjukdom, neurologisk sjukdom, hematologiska avvikelser, och ett positivt ANA (Tan et al., 1982). Flera försök har gjort att skapa motsvarande kriterielista för SLE hos hund men man har inte nått fram till en gemensam strategi (Day, 1999, Smee et al., 2007). Diagnoskriterierna för SLE hos hund är därmed inte lika distinkta. Enligt en studie föreslår man att en hund med symtom från fler än ett organsystem samt ett positivt ANA ses som en trolig SLE (Smee et al., 2007). IMRD hos tollare räknas som en SLE-liknande sjukdom och delar symtom som polyartrit (100 %), positivt ANA (70 %), feber (12 %) och hudproblem (18 %) med SLE (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009).

ANA analyseras med indirekt immunofluorescens (IIF), och utöver att ett ANA test kan vara positivt eller negativt så bedöms vid analys även vilket mönster som ses. Mönstret beror på vad antikroppen har för specificitet och var i cellkärnan den bundit in. Exempel på antigen är intranukleära strukturer som dubbelsträngat DNA (dsDNA), histoner och enzymer. Utifrån mönstret har kopplingar gjorts till specifika sjukdomar samt vilken typ av antikropp som bundit in (Tan, 1989). Antikroppsspecificiteten delas in i kromosomala och icke kromosomala antikroppar, och vid kromosomala antikroppar ses ett homogent mönster till skillnad från det korniga mönstret som associeras till icke kromosomala antikroppar (Hansson-Hamlin et al., 2006). Vissa av de antinukleära antikropparna anses sjukdomsspecifika, till exempel har antikroppar mot lösliga antigen som Smiths antigen (anti-Sm) och dsDNA kopplats till SLE hos människa (Tan, 1989).

Hos hund har en typ av specifika ANA identifierats, s.k. ribonukleinprotein (RNP). Denna subtyp av ANA visade sig vara kopplat till kornigt ANA-mönster (Hansson & Karlsson-Parra, 1999).

Eftersom mönstret som ses vid analys av ANA är kopplat till vilka antikroppar som binder in och var de binder in så kan mönstret ibland även kopplas till sjukdom. Vid SLE hos människa anses antikroppar mot dsDNA och Sm vara starkt associerat till SLE. Flera andra antikroppar förekommer vid SLE hos människa men de anses inte vara sjukdomsspecifika utan ses även vid andra autoimmuna sjukdomar (Tan, 1989). Vid SLE hos hund har man identifierat antikroppar mot histoner, Sm, RNP och andra lösliga antigen (Gershwin, 2010, Monestier et al., 1995). Att fastställa diagnosen SLE hos hund är som sagt svårt eftersom ingen specifik kriterielista finns tillgänglig (Day, 1999). Detta kan göra det svårt att särskilja vilka specifika autoantikroppar som förekommer vid just SLE. Begreppet ”SLE-liknande sjukdom” kan istället bli aktuellt att använda i dessa sammanhang (Hansson-Hamlin et al., 2006). Vid tolkning av ett positivt ANA hos människa registreras flera olika typer av fluorescensmönster medan man hos hund än så länge endast registrerar mönstren som homogena eller korniga (Tan, 1989, Hansson et al., 1996). Hos tollare med IMRD kan såväl homogent som kornigt mönster ses (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009)

MHC OCH SJUKDOM

Antigenpresenterande celler som B-lymfocyter, makrofager och dendritiska celler har receptorer som kallas för MHC-receptorer. Namnet har de fått för att de är glykoproteiner som kodas av gener i genklustret som på engelska kallas ”major histocompatibility complex”. MHC-receptorns syfte är att binda och presentera antigen på cellytan. Det förvärvade

immunsvarer svarar först när ett specifikt antigen presenteras av MHC och T-cells-receptorn binder in, detta kallas för MHC-restriktion (Tizzard, 2009).

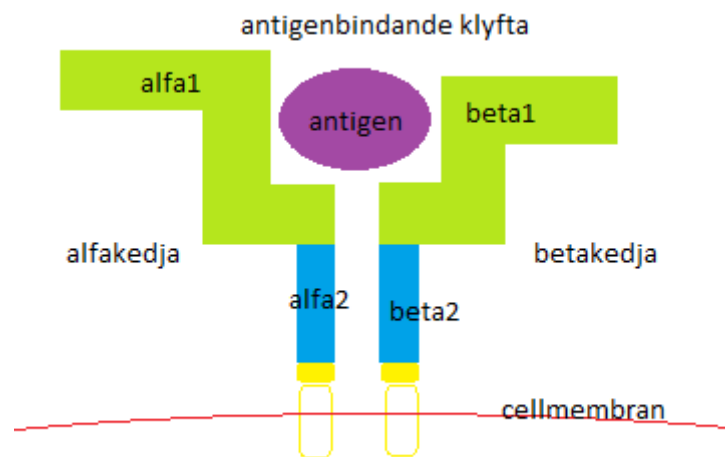
Generna som kodar för proteinerna som ingår i MHC-receptorn ligger fördelade på tre områden på kromosom 12 och de namnges klass I-III. Klass I generna kodar för MHC-receptorer som finns på alla antigenpresenterande celler medan MHC klass II hos hunden endast återfinns hos professionella antigenpresenterande celler som makrofager, dendritceller och B-lymfocyter. Generna för MHC klass III kodar för flera olika proteiner med en mängd olika funktioner.

En MHC-receptor är uppbyggd av en alfa- och en beta-kedja (se Figur 1) och generna för alfakedjan är namngivna med ett A på slutet, ex DQA och DRA medan beta-kedjans namnges med ett B på slutet, ex DQB och DRB (Tizzard, 2009).

Figur 1

Schematisk skiss över MHC-receptorns uppbyggnad med dess alfa- och beta-kedja och hur den antigenbindande klyftan bildas av de båda kedjorna.

Återgivet efter Figur 9-7, Veterinary Immunology: An introduction, Tizzard, 2009.



En gen eller en nukleotidsekvens som ligger i ett lokus kallas för allel, det kan finnas många olika varianter av alleler i ett lokus som då benämns som polymorft (Tizzard, 2009). Gener kan innehålla delar som inte kodar för proteiner, dessa kallas för introner och klipps bort innan transkription sker. Introner kan innehålla information som är viktig för genuttrycket. De delar av en gen som består av en nukleotidsekvens som kodar för proteiner kallas för exon. I stort sett alla introner börjar och slutar alltid på samma sätt och kan därför lätt identifieras, detta används vid PCR då primers som omsluter det eftersökta området väljs och PCR-produkten blir den nukleotidsekvens där den genetiska variationen finns (Nicholas, 2010).

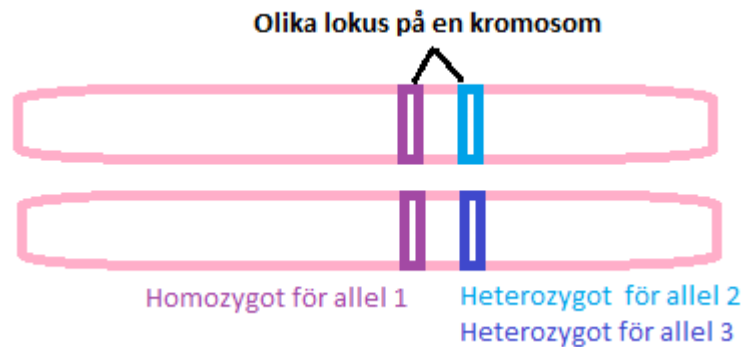
En grupp närliggande alleler som i praktiken alltid nedärvs tillsammans benämns haplotyp. Eftersom DNA är dubbelsträngat har varje individ 2 varianter av såväl alleler som haplotyper och denna uppsättning bildar genotypen (Nicholas, 2010). MHC-regionen innehåller alltid 3 klasser men i vilken ordning de finns skiljer sig mellan arterna. För att ange vilken arts MHC som avses läggs betäckningen HLA (human leukocyte antigen) till för människa, DLA (dog leukocyte antigen) för hund, RLA (rabbit leukocyte antigen) för kanin osv (Tizzard, 2009).

Generna för hundens MHC klass II ligger på kromosom 12 och namnges DLA-allelnamn. Hundens MHC klass II innehåller tre polymorfa gener, DLA-DRB1, DLA-DQA1, DLA-DQB1 och en monomorf, DLA-DRA. Allelerna i polymorfa lokus uppvisar en hög variation medan lokus som är monomorfa saknar genetisk variation (Tizzard, 2009). Den största

polymorfismen ligger i exon 2 och vid sekvensering är det endast denna del som amplifieras med PCR (Nicholas, 2010). Alla hundar har samtliga lokus men olika alleler, dvs. de har olika varianter av genen i respektive lokus. I skrivande stund har 206 olika alleler identifierats för DRB1, 37 för DQA1 och 100 för DQB1 (Personligt meddelande Kennedy, 2013) och de generna anses därför som polymorfa (Kennedy et al., 2007). Nya alleler upptäcks kontinuerligt och definieras och namnges av DLA Nomenclature Committee (Robinson et al., 2010).

Figur 2

Schematisk skiss över alleler i olika lokus. Om samma allel återfinns på båda kromosomerna är djuret homozygot för den allelen, är det olika alleler är djuret heterozygot.



Generna för MHC klass II uppvisar normalt sett en hög polymorfism i en population och den genetiska mångfalden är viktig för artens överlevnad. I det vilda upprätthålls polymorfismen främst genom patogendrivna selektion som ett svar på de infektionssjukdomar som finns i omgivningen (Wilbe & Andersson, 2012).

Hos både människa och hund har man kunnat se en koppling mellan MHC och olika immunmedierade sjukdomar. Flera studier hos människa har t.ex. visat på en genetisk koppling mellan HLA-DRB1, -DRA, -DQA1 och -DQB1 och reumatoid artrit (Fugger & Svejgaard, 2000), (Holmdahl, 2000). Hos hund har man sett starka kopplingar mellan DLA-MHC klass II-regionens gener och sjukdomar som hypoadrenokorticism (Addison's sjukdom) (Hughes et al., 2010), kloavlossning (canine symmetrical lupoid onychodystrophy, SLO) (Wilbe et al., 2010c), diabetes mellitus (Kennedy et al., 2006b), immunmedierad hemolytisk anemi (IMHA) (Kennedy et al., 2006a), reumatoid artrit (Ollier et al., 2001), lymfocytär tyreoidit (canine lymphocytic thyroiditis, CLT) (Wilbe et al., 2010b), kronisk inflammatorisk hepatit (Bexfield et al., 2012) och anal furunkulos (Kennedy et al., 2008).

Det har visat sig finnas många likheter mellan komplexa sjukdomar (såsom de immunmedierade) hos människa och hund. Att studera motsvarande sjukdomar hos hund och sedan dra nytta av undersökningarna vid vidare studier hos människa kan därför vara värdefullt. Hund och människa lever till stor del i samma miljö och sjukdomarna uppkommer spontant. Hundens genom kartlades 2005 och överensstämmer till ca 95 % med människans. Hunden är därför ett bra modelldjur vid studier av bl.a. genetiska sjukdomar (Lindblad-Toh et al., 2005).

I tidigare studier har man sett ett samband mellan MHC klass II och IMRD hos tollare (Wilbe et al., 2009). Den här studien syftar till att undersöka sambandet mellan generna för MHC klass II och kornigt och homogent ANA-mönster hos tollare med IMRD.

MATERIAL OCH METODER

PATIENTER OCH KONTROLLER

I studien ingick totalt 142 privatägda hundar av rasen Nova Scotia duck tolling retriever, varav 64 patienter med diagnosen IMRD och 78 friska kontroller. All provtagning och undersökning har skett med djurägarens medgivande. Insamlingen av proverna har skett under tidsperioden 2002-2012.

INKLUSIONSKRITERIER

Inklusionskriterier för IMRD var reumatiska symtom från rörelseapparaten som stelhet efter vila, smärta från en eller flera leder, nacke eller rygg. Tecken på reumatisk sjukdom skulle ha varat i minst 14 dagar och andra differentialdiagnoser uteslutits.

De friska kontrollerna var mer än 7 år gamla och hade ingen sjukdomshistorik avseende immunmedierad sjukdom.

IIF ANATEST

ANA påvisades med indirekt immunofluorescens (IIF) på Klinisk kemiska laboratoriet på Universitetsdjursjukhuset vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) i Uppsala. IIF analyseras på humana epitelceller från celllinjen HEP-2 som fixerats på objektglas (Immuno Concepts, Sacramento, CA, USA). Serum från patienten späddes och applicerades på HEP-2-cellerna på objektglaset och inkuberades i rumstemperatur. Antikroppar som bundit till antigen i cellkärnan ses vid fluorescensmikroskopering efter tillsats av hundspecifikt fluorescinerat konjugat.

Med hjälp av fluorescensmikroskopering fastställs ett positivt ANA vid en serumtiter på $\geq 1:100$. De positiva proverna delas sedan in i 2 undergrupper beroende på vilket fluorescensmönster som framträder, ett kornigt (ANA^K) eller homogent mönster (ANA^H) som tidigare beskrivits (Hansson-Hamlin et al., 2006). Av de totalt 64 fallen hade 26 ett homogent ANA mönster och 32 ett kornigt mönster. Sex av de 64 fallen var analyserade i Finland och dessa var inte uppdelade i undergrupper utifrån fluorescensmönster.

DNA EXTRAKTION

DNA extraherades från EDTA-blod med hjälp av Qiagen QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Kortfattat så sker extraktionen genom att blodet förbereds genom tillsatts av buffert som dels lyserar cellmembranen för att frigöra nukleinsyran men även stabiliserar denna. Efter tillsatts av alkohol till lösningen appliceras lösningen i en kolumn med ett silicagel-membran som DNA binder hårt till när lösningen centrifugeras genom kolumnen. I blodet finns produkter som förhindrar PCR-amplifieringen i nästa steg och dessa renas bort genom upprepade sköljningar med tvättslösning och centrifugering. Slutligen frigörs allt bundet DNA från kolumnen genom en sista centrifugering av kolumnen efter att destillerat vatten tillförts. En koncentrationsmätning av DNA sker med spektrofotometri.

PCR AMPLIFIERING

PCR, "polymerase chain reaction" användes för att amplifiera DNA-sekvenserna i den polymorfa regionen i exon 2 för DLA-MHC klass II-generna. Olika primers användes för DLA-DRB1, -DQA1 och DQB1, se tabell 1 för nukleotidsekvens. Varje primerpar hade en T7 inmärkning, för att kunna sekvensera alla tre lokus med samma primers, se tabell 1.

I PCR protokollet som användes för PCR amplifiering ingick 15,46 µl destillerat vatten, 1x PCR Buffer II (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1,5mM MgCl₂, 0,5 µM av respektive primer, 0,2mM dNTP och 0,7 U av AmpliTaq Gold™ (ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits, Original and Version 2.0 Protocol Applied Biosystems) och ca 25 ng DNA vilket sammanlagt ger 20 µl lösning i PCR reaktionen.

PCR-programmen för respektive lokus (DRB1, DQA1 och DQB1) startas med ett denatureringssteg och följs med repeterade cykler med denatureringssteg, hybridisering med temperatursänkning och polymerisering. Därefter sker flera amplifieringscykler. PCR-programmet avslutas med ytterligare ett förlängningssteg (tabell 2).

Kontroll av förekomst och storlek av PCR-produkten efter att PCR-programmet slutförts gjordes med gel-elektrofores (2 % agarosgel).

DNA SEKVENSERING OCH ANALYS AV DATA

Inför DNA-sekvensering renades PCR-produkten från överflödiga nukleotider och primers. DNA-sekvensering utfördes med kapillärelektrofores på en Applied Biosystems 3730xl. BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Sekvensering skedde i en riktning, reverserat för DLA-DRB1 och -DQA1, och framåt för DLA-DQB1. Nukleotidsekvenserna analyserades och jämfördes med konsensussekvenser i dataprogrammet MatchTools och MatchTools Navigator (Applied Biosystems). Polymorfa positioner korrigerades manuellt och jämfördes mot ett referensbibliotek i programmet MatchTools (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/index.html>).

STATISTIK

Statistisk analys utfördes med hjälp av programmet Vassarstats (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>). Odds ratio och p-värden för varje allel, haplotyp och genotyp beräknades med en 2x2-tabell. Förekomsten av en viss allel, haplotyp eller genotyp hos fallen jämfördes med kontrollgruppen. Samma jämförelse gjordes för alleler, haplotyper och genotyper för fallen med homogent respektive kornigt mönster. Fall och kontroller jämfördes gällande antalet homozygota individer jämfört med heterozygota dito, samma jämförelse gjordes med korrigerad riskgenotypen.

ETISKT GODKÄNNANDE

Ansökan om etiskt tillstånd var godkänt av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (Dnr C138/6). Samtliga djurägare har gett sitt medgivande till att deras djur ska ingå i studien.

RESULTAT

ALLELER, HAPLOTYPER OCH GENOTYPER

Allel, haplotyp- och genotypfrekvenserna beräknades för samtliga ANA-positiva hundar samt för respektive ANA-mönster och jämfördes sedan med kontrollgruppen (tabell 3-5).

Hos de 142 tollarna som ingick i studien identifierades fem olika DLA-DRB1 alleler, fyra DLA-DQA1 och fem DLA-DQB1 (tabell 3). Allelerna bildade totalt fem olika haplotyper som namngavs haplotyp 1-5 (tabell 4). Haplotyp 1 och 2 var mest förekommande med frekvenserna 32,4 % respektive 41,5 %, haplotyp 3 var inte lika vanlig (18,3 %) och haplotyp 4 och 5 var ovanlig (0,7 % respektive 7,0 %) (tabell 4).

11 olika genotyper observerades i populationen (tabell 5) och fyra av dem (genotyp 1, 2, 4 och 5) observerades mer frekvent (13,4-26,8 %), genotyp 3, 6, 7, 8 och 9 förekommer mer sällan (3,5-7,0 %) och återstående genotyper (10 och 11) sågs mycket sällan (0,7 %). Andelen homozygota djur i hela populationen var 45,8 % (tabell 6).

I fallgruppen sågs en signifikant skillnad i allelfrekvens oavsett ANA-mönster. DRB1*00601-DQA1*005011-DQB1*02001 (haplotyp 2) förekommer mer frekvent i fallgruppen jämfört med kontrollgruppen (50,8 % resp. 34,0 %, OR 2,0 och p 0,00617) (tabell 7). Även för genotyp 2 sågs en signifikant skillnad i förekomsten med 45,3 % resp. 11,5 %, OR 6,4 och p <0,0001 jämfört med kontrollerna (tabell 8).

30 av de 32 tollarsjuka hundarna med kornigt ANA-mönster har haplotyp 2 i en eller två uppsättningar. Av dem var 26 hundar (81,3 %) homozygota för haplotyp 2, dvs de har genotyp 2, 3 hundar (9,4 %) har genotyp 4 och de övriga har genotyp 3 (3,1 %), genotyp 6 (3,1 %) eller genotyp 8 (3,1 %) (tabell 5).

Hos de tollarsjuka hundarna med ett homogent ANA sågs en större spridning av genotyperna. Endast 2 av hundarna (7,7 %) har genotyp 2 och övriga genotyper fördelas så att 9 av 26 hundar (34,6 %) har genotyp 1, 6 hundar (23,1%) har genotyp 3, 6 hundar (23,1 %) har genotyp 5, 1 hund (3,8 %) har genotyp 4, 1 hund (3,8 %) har genotyp 6, 1 hund (3,8 %) har genotyp 7 (se tabell 5).

En mycket signifikant skillnad sågs avseende frekvensen av haplotyp 2 hos ANA-positiva fall med kornigt utseende jämfört med kontrollerna (87,5 % resp. 11,5 %, OR 13,6 och p <0,0001) (tabell 7).

Hos de ANA-positiva hundarna sågs en generellt ökad homozygoti med 73,4 % jämfört med kontrollernas 23,1 %, skillnaden är signifikant med OR 9,2 och p <0,0001 (tabell 9).

De ANA-positiva hundarna med kornigt utseende var homozygota i en högre utsträckning än de med homogent utseende (84,4 % resp. 65,4 %, OR 18 resp. 6,3 och p <0,0001 resp. 0,000204). Efter korrigering för genotyp 2 var andelen homozygota i gruppen med homogent mönster jämfört med kontrollgruppen 62,5 % resp. 13,0 % (OR 11,1 och p <0,0001) (tabell 9).

TABELLER OCH DATA

Tabell 1. Använda primers vid PCR amplifiering

Allel	Primer
DRB1 F	CCGTCCCCACAGCACATTTTC
DRB1 B	TAATACGACTCACTATAGGGTGTGTCACACACCTCAGCACCA +T7
DQA1 F	TAAGGTTCTTTTCTCCCTCT
DQA1 B	TAATACGACTCACTATAGGGGGACAGATTCAGTGAAGAGA +T7
DQB1 F	TAATACGACTCACTATAGGGCTCACTGGCCCGGCTGTCTC +T7
DQB1 B	CACCTCGCCGCTGCAACGTG

F= riktning framåt, B= riktning bakåt,
T7=TAATACGACTCACTATAG

Tabell 2. PCR-program för respektive lokus.

PCR program DRB1

Startar med	95°C 15 min		
Denatureringssteg	95°C 30 s	} 14 cykler där hybridiseringstemperaturen sänks med 0,5°C för varje cykel	} 20 cykler där hybridiseringstemperaturen är konstant med 55°C i 1 min
Hybridisering	62°C 1 min		
Polymerisering	72°C 1 min		
Avslutas med	72°C 10 min		

PCR program DQA1

Startar med	95°C 15 min		
Denatureringssteg	95°C 30 s	} 14 cykler där hybridiseringstemperaturen sänks med 0,5°C för varje cykel	} 20 cykler där hybridiseringstemperaturen är konstant med 47°C i 1 min
Hybridisering	54°C 1 min		
Polymerisering	72°C 1 min		
Avslutas med	72°C 10 min		

PCR program DQA1

Startar med	95°C 15 min		
Denatureringssteg	95°C 30 s	} 14 cykler där hybridiseringstemperaturen sänks med 0,5°C för varje cykel	} 20 cykler där hybridiseringstemperaturen är konstant med 66°C i 1 min
Hybridisering	73°C 1 min		
Polymerisering	72°C 1 min		
Avslutas med	72°C 10 min		

Tabell 3. Allelfördelningen i populationen som helhet och fördelat på fall och kontroller samt undergrupper

Allel	Tot pop % 2n=284	Kontroller % 2n=156	Alla fall % 2n=128	ANA ^K % 2n=64	ANA ^H % 2n=52
DRB1*00401	0,7 (2)	1,3 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
DRB1*00601	41,5 (118)	34,0 (53)	50,8 (65)	87,5 (56)	11,5 (6)
DRB1*01501	18,3 (52)	19,2 (30)	17,2 (22)	3,1 (2)	36,5 (19)
DRB1*01502	32,4 (92)	35,3 (55)	28,9 (37)	6,3 (4)	50,0 (26)
DRB1*02301	7,0 (20)	10,3 (16)	3,1 (4)	3,1 (2)	1,9 (1)
DQA1*00601	50,7 (144)	54,5 (85)	46,1 (59)	9,4 (6)	86,5 (45)
DQA1*005011	41,5 (118)	34,0 (53)	50,8 (65)	87,5 (56)	11,5 (6)
DQA1*00201	0,7 (2)	1,3 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
DQA1*00301	7,0 (20)	10,3 (16)	3,1 (4)	3,1 (2)	1,9 (1)
DQB1*02301	32,4 (92)	35,3 (55)	28,9 (37)	6,3 (4)	50,0 (26)
DQB1*02001	41,5 (118)	34,0 (53)	50,8 (65)	87,5 (56)	11,5 (6)
DQB1*00301	18,3 (52)	19,2 (30)	17,2 (22)	3,1 (2)	36,5 (19)
DQB1*01501	0,7 (2)	1,3 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
DQB1*00501	7,0 (20)	10,3 (16)	3,1 (4)	3,1 (2)	1,9 (1)

K= Kornigt ANA mönster, H=Homogent ANA mönster

Tabell 4. Haplotypfördelningen i populationen som helhet och fördelat på fall och kontroller samt undergrupper

Haplotyp Nr	Haplotyp DRB1/DQA1/DQB1	Tot pop % 2n=284	Kontroller % 2n=156	Fall % 2n=128	ANA ^K 2n=64	ANA ^H 2n=52
1	01502/00601/02301	32,4 (92)	35,3 (55)	28,9 (37)	6,3 (4)	50,0 (26)
2	00601/005011/02001	41,5 (118)	34,0 (53)	50,8 (65)	87,5 (56)	11,5 (6)
3	01501/00601/00301	18,3 (52)	19,2 (30)	17,2 (22)	3,1 (2)	36,5 (19)
4	00401/00201/01501	0,7 (2)	1,3 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
5	02301/00301/00501	7,0 (20)	10,3 (16)	3,1 (4)	3,1 (2)	1,9 (1)

K= Kornigt ANA mönster, H=Homogent ANA mönster

Tabell 5. Genotypfördelningen i populationen som helhet och fördelat på fall och kontroller samt undergrupper

Genotyp Nr	Haplotyper	Tot pop % n=142	Kontroller % n=78	Fall % n=64	ANA ^K % n=32	ANA ^H % n=26
1	1,1	12,7 (18)	9,0 (7)	17,2 (11)	0,0 (0)	34,6 (9)
2	2,2	26,8 (38)	11,5 (9)	45,3 (29)	81,3 (26)	7,7 (2)
3	3,3	6,3 (9)	2,6 (2)	10,9 (7)	3,1 (1)	23,1 (6)
4	1,2	19,0 (27)	28,2 (22)	7,8 (5)	9,4 (3)	3,8 (1)
5	1,3	13,4 (19)	15,4 (12)	10,9 (7)	0,0 (0)	23,1 (6)
6	1,5	6,3 (9)	7,7 (6)	4,7 (3)	3,1 (1)	3,8 (1)
7	2,3	7,0 (10)	11,5 (9)	1,6 (1)	0,0 (0)	3,8 (1)
8	2,5	3,5 (5)	5,1 (4)	1,6 (1)	3,1 (1)	0,0 (0)
9	3,5	3,5 (5)	6,4 (5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
10	1,4	0,7 (1)	1,3 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
11	4,5	0,7 (1)	1,3 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
12	5,5	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
13	2,4	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)

K= Kornigt ANA mönster, H=Homogent ANA mönster

Tabell 6. Homozygotifördelningen i populationen med och utan riskgenotypen fördelat på fall och kontroller samt undergrupperna ANA^H och ANA^K

Andelen homozygota individer i populationen

	Tot pop % n=142	Kontroller % n=78	Fall % n=64	ANA ^K % n=32	ANA ^H % n=26
Homozygota	45,8 (65)	23,1 (18)	73,4 (47)	84,4 (27)	65,4 (17)
	Tot pop % n=142	Kontroller % n=78	Fall % n=64	ANA ^K % n=32	ANA ^H % n=26
Homozygota utan genotyp 2	26,0 (27)	13,1 (9)	51,4 (18)	16,7 (1)	62,5 (15)

K= Kornigt ANA mönster, H=Homogent ANA mönster

Tabell 7. Frekvens, OR och p-värde för haplotyp 1-5

Fall % (antal)	Kontroller % (antal) 2n=156	Odds ratio (95% KI ^a)	p-värde
Haplotyp 1			
Samtliga fall 2n=128			
28,9 (37)	35,3 (55)	0,7467 (0,4511-1,2358)	0,312519
ANA^H 2n=52			
50,0 (26)	35,3 (55)	1,8364 (0,973-3,4657)	0,084822
ANA^K 2n=64			
6,3 (4)	35,3 (55)	0,1224 (0,0422-0,3548)	<0,0001
Haplotyp 2			
Samtliga fall 2n=128			
50,8 (65)	34,0 (53)	2,0051 (1,2414-3,2386)	0,00617
ANA^H 2n=52			
11,5 (6)	34,0 (53)	0,2535 (0,1017-0,6316)	0,00338
ANA^K 2n=64			
87,5 (56)	34,0 (53)	13,6038 (6,0425-30,6268)	<0,0001
Haplotyp 3			
Samtliga fall 2n=128			
17,2 (22)	19,2 (30)	0,8717 (0,4747-1,6008)	0,777297
ANA^H 2n=52			
36,5 (19)	19,2 (30)	2,4182 (1,212-4,8248)	0,018375
ANA^K 2n=64			
3,1 (2)	19,2 (30)	0,1355 (0,0314-0,5853)	0,004143
Haplotyp 4			
Samtliga fall 2n=128			
0,0 (0)	1,3 (2)	0	-
Haplotyp 5			
Samtliga fall 2n=128			
3,1 (4)	10,3 (16)	0,2823 (0,0919-0,8668)	0,035313
ANA^H 2n=52			
1,9 (1)	10,3 (16)	0,1716 (0,0222-1,3269)	-
ANA^K 2n=64			

3,1 (2) 10,3 (16) 0,2823 (0,063-1,2651) 0,138011

K= Kornigt ANA mönster, H=Homogent ANA mönster

^a KI = Konfidensintervall

Tabell 8. Frekvens, OR och p-värde för genotyp 1-13

Fall % (antal)	Kontroller % (antal) n=78	Odds ratio (95% KI ^a)	p-värde
Genotyp 1			
Samtliga fall n=64			
17,2 (11)	9,0 (7)	2,1051 (0,765-5,7928)	0,22693
ANA^H n=26			
34,6 (9)	9,0 (7)	5,3697 (1,751-16,4673)	-
ANA^K n=32			
0,0 (0)	9,0 (7)	Infinity (NaN-Infinity)	<0,0001
Genotyp 2			
Samtliga fall n=64			
45,3 (29)	11,5 (9)	6,3524 (2,7115-14,882)	<0,0001
ANA^H n=26			
7,7 (2)	11,5 (9)	0,6389 (0,1289-3,1678)	-
ANA^K n=32			
81,3 (26)	11,5 (9)	33,2222 (10,7622-102,5552)	<0,0001
Genotyp 3			
Samtliga fall n=64			
10,9 (7)	2,6 (2)	4,6667(0,9341-23,3134)	-
ANA^H n=26			
23,1 (6)	2,6 (2)	11,4 (2,1365-60,8272)	-
ANA^K n=32			
3,1 (1)	2,6 (2)	1,2258 (0,1072-14,0156)	-
Genotyp 4			
Samtliga fall n=64			
6,3 (4)	28,2 (22)	0,1697 (0,055-0,5232)	0,001644
ANA^H n=26			
0,0 (0)	28,2 (22)	0	0,005553
ANA^K n=32			

9,4 (3)	28,2 (22)	0,2633 (0,0727-0,9537)	0,058832
Genotyp 5			
Samtliga fall n=64			
12,5 (8)	15,4 (12)	0,7857 (0,3-2,058)	0,806496
ANA^H n=26			
26,9 (7)	15,4 (12)	2,0263 (0,7001-5,8645)	-
ANA^K n=32			
0,0 (0)	15,4 (12)	0	-
Genotyp 6			
Samtliga fall n=64			
4,7 (3)	7,7 (6)	0,5902 (0,1416-2,4594)	-
ANA^H n=26			
3,8 (1)	7,7 (6)	0,48 (0,0551-4,1846)	-
ANA^K n=32			
3,1 (1)	7,7 (6)	0,3871 (0,0447-3,3516)	-
Genotyp 7			
Samtliga fall n=64			
1,6 (1)	11,5 (9)	0,1217 (0,015-0,9879)	-
ANA^H n=26			
3,8 (1)	11,5 (9)	0,3067 (0,037-2,5449)	-
ANA^K n=32			
0,0 (0)	11,5 (9)	0	-
Genotyp 8			
Samtliga fall n=64			
1,6 (1)	5,1 (4)	0,2937 (0,032-2,6955)	-
ANA^H n=26			
0,0 (0)	5,1 (4)	0	-
ANA^K n=32			
3,1 (1)	5,1 (4)	0,5968 (0,0641-5,5561)	-
Genotyp 9			
Samtliga fall n=64			
0,0 (0)	6,4 (5)	0	-

ANA^H n=26				
0,0 (0)	6,4 (5)	0	-	
ANA^K n=32				
0,0 (0)	6,4 (5)	0	-	
Genotyp 10				
Samtliga fall n=64				
0,0 (0)	1,3 (1)	0	-	
Genotyp 11				
Samtliga fall n=64				
0,0 (0)	1,3 (1)	0	-	
Genotyp 12				
Samtliga fall n=64				
0,0 (0)	0,0 (0)	-	-	
Genotyp 13				
Samtliga fall n=64				
0,0 (0)	0,0 (0)	-	-	

K= Kornigt ANA mönster, H=Homogent ANA mönster

^a KI = Konfidensintervall

Tabell 9. Frekvens, OR och p-värde för homozygoti i fall- och under- respektive kontrollgrupp samt utan riskgenotypen

Andelen homozygota i populationen

Sjuka fall % (antal)	Kontroller % (antal) n=78	Odds ratio (95% KI)	p-värde
Samtliga fall n=64			
73,4 (47)	23,1 (18)	9,2157 (4,2885-19,8036)	<0,0001
ANA^H n=26			
65,4 (17)	23,1 (18)	6,2963 (2,4-16,5183)	0,000204
ANA^K n=32			
84,4 (27)	23,1 (18)	18 (6,052-53,5357)	<0,0001

Andelen homozygota utan genotyp 2

Sjuka fall % (antal)	Kontroller % (antal) n=69	Odds ratio (95% KI)	p-värde
Samtliga fall n=35			
51,4 (18)	13,0 (9)	7,0588 (2,6906-18,5187)	<0,0001
ANA^H n=24			
62,5 (15)	13,0 (9)	11,1111 (3,7604-32,8311)	<0,0001
ANA^K n=6			
16,7 (1)	13,0 (9)	1,3333 (0,1393-12,7582)	-

K= Kornigt ANA mönster, H=Homogent ANA mönster

^a KI = Konfidensintervall

DISKUSSION

ALLELER

I den här populationen fann vi fem olika DRB1 alleler, fyra DQA1 alleler och fem DQB1 alleler vilket är samma resultat som i en tidigare studie (Wilbe et al., 2009). I en annan studie där man tittade på sambandet mellan DLA-MHC klass II och hypoadrenocorticism hos tollare i en population hundar från USA och Kanada hittade man fem olika DRB1 alleler, fyra DQA1 alleler och sex DQB1 alleler (Hughes et al., 2010). Vid sekvensering av generna för DLA-MHC klass II hos andra raser än tollare har man hittat mellan 2-14 alleler i respektive lokus (Kennedy et al., 2006b, Wilbe et al., 2010c, Wilbe et al., 2009, Kennedy et al., 1999, Kennedy et al., 2002a).

Fram till år 2002 hade man identifierat 52 DLA-DRB1 alleler, 16 DLA-DQA1 alleler, och 41 DLA-DQB1 alleler från renrasiga hundar i Europa och Nordamerika. Det saknades dock underlag från andra delar av världen och en ny genotypning för DLA MHC klass II gener gjordes på 12 Alaskan huskies från Alaska och 115 blandraser från Brasilien. Man fann så många som 22 nya alleler i dessa populationer och de nya allelerna återfanns hos mer än ett djur (Kennedy et al., 2002b). Vilka alleler och i förlängningen vilka haplotyper och genotyper som återfinns i en ras eller population varierar stort vilket medför att det är viktigt att kontrollerna är av samma ras vid genetiska studier av DLA-MHC klass II hos hund (Kennedy et al., 2002b).

HAPLOTYPER

Spridningen i antalet haplotyper hos andra raser varierar stort, i en studie på Gordon Setters och schnauzer fann man 10 olika haplotyper i respektive ras (Wilbe et al., 2010c), i en annan studie på Engelska springer spaniel fann man 11 haplotyper (Bexfield et al., 2012). I studien över hundar från Alaska och Brasilien fann man två DLA-haplotyper som man tidigare trott var rasspecifika för papillon respektive shi-tzu vilket visar att ytterligare kartläggning behövs (Kennedy et al., 2002b).

Antalet DLA-haplotyper hos tollarna i den här studien är fem, det är två färre än i studien med engelska och kanadensiska tollare, vilket tyder på en lägre genetiska variation avseende MHC i den här populationen (Hughes et al., 2010). Detta är inte förvånande med tanke på att tollaren är en relativt ny ras i Sverige och Europa och att hundarna härstammar från ett fåtal importerade hundar på 1980-talet.

GENOTYPER OCH GENERELL HOMOZYGOTI

Genotyp 2 har hög förekomst i fallgruppen med kornigt ANA-mönster och sambandet är signifikant. Genotyp 3 är också vanlig bland fallen men där saknas underlag i kontrollgruppen för att få en statistisk signifikans.

Statistisk signifikans ses också gällande andelen homozygota hundar i ANA^H-gruppen efter korrigering för riskgenotyp 2. Detta indikerar att en individ som är homozygot har en ökad risk för att drabbas av sjukdom eftersom två upplagor finns av genen.

Tollarna som ras har genomgått flera genetiska flaskhalsar vilket har lett till en lägre genetisk variation och en hög andel homozygota individer. Det faktum att rasen drabbas av flera olika immun-medierade sjukdomar indikerar ett reaktivt immunförsvar. Kanske var det detta som räddade individerna som överlevde valpsjuka utbrotten under tidigt 1900-tal som slog ut stora delar av hundpopulationen (Strang & MacMillan, 1996). Det som var en fördel för rasens överlevnad i början av 1900-talet kan kanske idag vara till nackdel för rasen nu när många individer är homozygota för MHC klass II.

KOPPLING MELLAN ANA^K OCH OCH DLA-MHC KLASS II

De alleler som var vanligast hos de sjuka hundarna med ett positivt ANA med kornigt mönster motsvarar haplotyp 2. Det finns en stark koppling mellan haplotyp 2 och IMRD, frekvensen är så hög som 87,5 % för tollare med kornig ANA (50,8 % hos alla ANA-positiva tollare oavsett mönster) jämfört med kontrollgruppens 34 %. Det är 2 hundar i ANA^K-gruppen som inte har haplotyp 2. Efter kontakt med djurägare och behandlande veterinär har det visat sig att de båda hundarna med tiden utvecklade atypiska sjukdomstecken för IMRD. Den första hunden utvecklade utöver de reumatiska sjukdomstecknen symtom från flera organsystem med hudnekros och krustor, avmagring, muskelatrofi och slutligen andningssvårigheter, vilket ledde till att hunden avlivades. Den andra hunden som avviker insjuknade först i SRMA vid 10 månaders ålder vilket behandlades med framgång med kortison. Vid 2 års ålder insjuknade hunden igen med hälta, stelhet och ett positivt ANA. Det är mycket ovanligt att en och samma tollare först insjuknar i SRMA och senare i IMRD. Denna hund är dessutom numera fri från tecken på sjukdom trots en behandling med försumbar dos kortison vilket också är relativt ovanligt jämfört med andra tollare med IMRD. Även om de båda tollarna därmed kliniskt skiljer sig åt från övriga ANA-positiva tollare har de dock bedömts vara drabbade av IMRD. Man kan dock spekulera i om hundarna kanske är drabbade av andra varianter av sjukdomen jämfört med övriga individer. Men oavsett de 2 hundarna som avviker så är resultaten tydliga och med en hög statistisk signifikans.

KOPPLINGAR MELLAN ALLELER I HAPLOTYP 2 OCH ANDRA SJUKDOMAR

Hos Engelsk springer spaniel har man funnit att alleler som ingår i haplotyp 2 utgör en ökad risk för kronisk hepatit (Bexfield et al., 2012). Enstaka alleler kan ingå i flera olika haplotyper men i den här studien har ingen skillnad setts mellan de olika allelerna som ingår i haplotyp 2 eftersom de endast ingår i en haplotyp.

PRAKTISK ANVÄNDNING AV RESULTATEN

Oavsett ras är det viktigt att bibehålla den genetiska mångfalden. I hundaveln väljs individer ofta utifrån fenotyp som pälsfärg, kvalitet, storlek, ögonfärg osv till skillnad från i naturen där selektion görs utifrån egenskaper som ger en ökad överlevnad och skydd mot sjukdomar och infektioner. Med urvalskriterier som endast berör utseendet så ökar risken för homozygoti samt en minskad genetisk variation i populationen. I nuläget avråder vi starkt från att i avelsarbetet exkludera individer med en viss DLA-MHC-klass II allel, haplotyp eller genotyp eftersom det skulle riskera att ytterligare minska den genetiska mångfalden. IMRD och andra immunmedierade sjukdomar är komplexa och påverkas av såväl andra gener som av miljöfaktorer (Wilbe et al., 2010a). Mycket är fortfarande oklart när det gäller etiologin för

SLE-liknande sjukdomar och behöver utredas ytterligare innan eventuella avelsrekommendationer kan utformas.

REFERENSER

- ANFINSEN, K. P., BERENDT, M., LISTE, F. J. H., HAAGENSEN, T. R., INDREBO, A., LINGAAS, F., STIGEN, O. & ALBAN, L. 2008. A retrospective epidemiological study of clinical signs and familial predisposition associated with aseptic meningitis in the Norwegian population of Nova Scotia duck tolling retrievers born 1994-2003. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 72, 350-355.
- AXELSSON, J. 2007. *Tollarsjuka hos Nova Scotia Duck Tolling Retriever : en sjukdomsbeskrivning*, Uppsala, Sveriges lantbruksuniversitet.
- BAUER, N. K. 2003. *Nova Scotia duck tolling retriever*, Allenhurst, NJ, Kennel Club Book.
- BEXFIELD, N. H., WATSON, P. J., AGUIRRE-HERNANDEZ, J., SARGAN, D. R., TILEY, L., HEENEY, J. L. & KENNEDY, L. J. 2012. DLA Class II Alleles and Haplotypes Are Associated with Risk for and Protection from Chronic Hepatitis in the English Springer Spaniel. *Plos One*, 7, 7.
- DAY, M. J. 1999. *Clinical immunology of the dog and cat*, London, Manson.
- FUGGER, L. & SVEJGAARD, A. 2000. Association of MHC and rheumatoid arthritis HLA-DR4 and rheumatoid arthritis: studies in mice and men. *Arthritis Research*, 2.
- GERSHWIN, L. J. 2010. Autoimmune Diseases in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*, 40, 439-+.
- HANSSON, H. & KARLSSON-PARRA, A. 1999. Canine antinuclear antibodies: Comparison of immunofluorescence staining patterns and precipitin reactivity. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 40, 205-212.
- HANSSON, H., TROWALD-WIGH, G. & KARLSSON-PARRA, A. 1996. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence in dog sera: Comparison of rat liver tissue and human epithelial-2 cells as antigenic substrate. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10, 199-203.
- HANSSON-HAMLIN, H. & LILLIEHÖÖK, I. 2009. A possible systemic rheumatic disorder in the Nova Scotia duck tolling retriever. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51, 10.
- HANSSON-HAMLIN, H., LILLIEHÖÖK, I. & TROWALD-WIGH, G. 2006. Subgroups of canine antinuclear antibodies in relation to laboratory and clinical findings in immune-mediated disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 35, 397-404.
- HOLMDAHL, R. 2000. Association of MHC and rheumatoid arthritis - Why is rheumatoid arthritis associated with the MHC genetic region? An introduction. *Arthritis Research*, 2, 203-204.
- HUGHES, A. M., JOKINEN, P., BANNASCH, D. L., LOHI, H. & OBERBAUER, A. M. 2010. Association of a dog leukocyte antigen class II haplotype with hypoadrenocorticism in Nova Scotia Duck Tolling Retrievers. *Tissue Antigens*, 75.
- KENNEDY, L. 20130114. Personligt meddelande.
- KENNEDY, L. J., BARNES, A., HAPP, G. M., QUINNELL, R. J., BENNETT, D., ANGLES, J. M., DAY, M. J., CARMICHAEL, N., INNES, J. F., ISHERWOOD, D., CARTER, S. D., THOMSON, W. & OLLIER, W. E. R.

- 2002a. Extensive interbreed, but minimal intrabreed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs. *Tissue Antigens*, 59, 194-204.
- KENNEDY, L. J., BARNES, A., HAPP, G. M., QUINNELL, R. J., COURTENAY, O., CARTER, S. D., OLLIER, W. E. R. & THOMSON, W. 2002b. Evidence for extensive DLA polymorphism in different dog populations. *Tissue Antigens*, 60, 43-52.
- KENNEDY, L. J., BARNES, A., OLLIER, W. E. R. & DAY, M. J. 2006a. Association of a common DLA class II haplotype with canine primary immune-mediated haemolytic anaemia. *Tissue Antigens*, 68, 502-506.
- KENNEDY, L. J., CARTER, S. D., BARNES, A., BELL, S., BENNETT, D., OLLIER, B. & THOMSON, W. 1999. Interbreed variation of DLA-DRB1, DQA1 alleles and haplotypes in the dog. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69, 101-111.
- KENNEDY, L. J., DAVISON, L. J., BARNES, A., SHORT, A. D., FRETWELL, N., JONES, C. A., LEE, A. C., OLLIER, W. E. R. & CATCHPOLE, B. 2006b. Identification of susceptibility and protective Major Histocompatibility Complex (MHC) haplotypes in canine diabetes mellitus. *Tissue Antigens*, 68, 467-476.
- KENNEDY, L. J., O'NEILL, T., HOUSE, A., BARNES, A., KYOSTILA, K., INNES, J., FRETWELL, N., DAY, M. J., CATCHPOLE, B., LOHI, H. & OLLIER, W. E. R. 2008. Risk of anal furunculosis in German Shepherd dogs is associated with the major histocompatibility complex. *Tissue Antigens*, 71, 51-56.
- 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. H., 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. & BROAD INST GENOME SEQUENCING, P. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438.
- LINDHOLM, Å. 1997. Rasspecial - Nova Scotia Duck Tolling Retriever. *Hundsport*, 9/1997, 33-37.
- MONESTIER, M., NOVICK, K. E., KARAM, E. T., CHABANNE, L., MONIER, J. C. & RIGAL, D. 1995. AUTOANTIBODIES TO HISTONE, DNA AND NUCLEOSOME ANTIGENS IN CANINE SYSTEMIC LUPUS-ERYTHEMATOSUS. *Clinical and Experimental Immunology*, 99, 37-41.
- NELSON, R. W. & COUTO, C. G. 2009. *Small animal internal medicine*, St. Louis, Mo., Mosby.
- NICHOLAS, F. W. 2010. *Introduction to veterinary genetics*, Chichester, U.K. ; Ames, Iowa, Wiley-Blackwell.
- OLLIER, W. E. R., KENNEDY, L. J., THOMSON, W., BARNES, A. N., BELL, S. C., BENNETT, D., ANGLES, J. M., INNES, J. F. & CARTER, S. D. 2001. Dog MHC alleles containing the "human RA shared epitope" confer susceptibility to canine rheumatoid arthritis. *Immunogenetics*, 53, 669-673.
- ROBINSON, J., MISTRY, K., MCWILLIAM, H., LOPEZ, R. & MARSH, S. G. E. 2010. IPD-the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Research*, 38, D863-D869.

- SMEE, N. M., HARKIN, K. R. & WILKERSON, M. J. 2007. Measurement of serum antinuclear antibody titer in dogs with and without systemic lupus erythematosus: 120 cases (1997-2005). *Javna-Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230, 1180-1183.
- STRANG, A. & MACMILLAN, G. 1996. *The Nova Scotia Duck Tolling Retriever*, Loveland, Colorado, USA., Alpine Publications.
- TAN, E. M. 1989. ANTINUCLEAR ANTIBODIES - DIAGNOSTIC MARKERS FOR AUTOIMMUNE-DISEASES AND PROBES FOR CELL BIOLOGY. *Advances in Immunology*, 44, 93-151.
- TAN, E. M., COHEN, A. S., FRIES, J. F., MASI, A. T., MCSHANE, D. J., ROTHFIELD, N. F., SCHALLER, J. G., TALAL, N. & WINCHESTER, R. J. 1982. SPECIAL ARTICLE - THE 1982 REVISED CRITERIA FOR THE CLASSIFICATION OF SYSTEMIC LUPUS-ERYTHEMATOSUS. *Arthritis and Rheumatism*, 25, 1271-1277.
- TIZZARD, I. R. 2009. *Veterinary Immunology: An introduction*.
- WILBE, M. & ANDERSSON, G. 2012. MHC Class II is an Important Genetic Risk Factor for Canine Systemic Lupus Erythematosus (SLE)-Related Disease: Implications for Reproductive Success. *Reproduction in Domestic Animals*, 47.
- WILBE, M., JOKINEN, P., HERMANRUD, C., KENNEDY, L. J., STRANDBERG, E., HANSSON-HAMLIN, H., LOHI, H. & ANDERSSON, G. 2009. MHC class II polymorphism is associated with a canine SLE-related disease complex. *Immunogenetics*, 61.
- WILBE, M., JOKINEN, P., TRUVE, K., SEPPALA, E. H., KARLSSON, E. K., BIAGI, T., HUGHES, A., BANNASCH, D., ANDERSSON, G., HANSSON-HAMLIN, H., LOHI, H. & LINDBLAD-TOH, K. 2010a. Genome-wide association mapping identifies multiple loci for a canine SLE-related disease complex. *Nature Genetics*, 42, 250-U39.
- WILBE, M., SUNDBERG, K., HANSEN, I. R., STRANDBERG, E., NACHREINER, R. F., HEDHAMMAR, A., KENNEDY, L. J., ANDERSSON, G. & BJORNERFELDT, S. 2010b. Increased genetic risk or protection for canine autoimmune lymphocytic thyroiditis in Giant Schnauzers depends on DLA class II genotype. *Tissue Antigens*.
- WILBE, M., ZIENER, M. L., ARONSSON, A., HARLOS, C., SUNDBERG, K., NORBERG, E., ANDERSSON, L., LINDBLAD-TOH, K., HEDHAMMAR, A., ANDERSSON, G. & LINGAAS, F. 2010c. DLA Class II Alleles Are Associated with Risk for Canine Symmetrical Lupoid Onychodystrophy (SLO). *Plos One*, 5, 6.