



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för Kliniska vetenskaper

Kan hundar nosa sig till cancer i blodprov?

En studie av tränade sökhundars förmåga att detektera
tumörsjukdom i serum

Lotta Siverhall

*Uppsala
2015*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:1*

Kan hundar nosa sig till cancer i blodprov? En studie av tränade sökhundars förmåga att detektera tumörsjukdom i serum

Can dogs smell cancer in blood samples? A study of the ability of trained detection dogs to identify tumors in serum

Lotta Siverhall

Handledare: Henrik Rönnberg, institutionen för Kliniska vetenskaper

Ev. Biträdande handledare: Staffan Eriksson, institutionen för Anatomi, fysiologi och biokemi. Sara Saellström, UDS.

Examinator: Jens Häggström, institutionen för Kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Delnummer i serie: Examensarbete 2016:1

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: sökhundar, cancer, blodprov, cancerdiagnostik, serologi, screening

Key words: detection dogs, cancer, blood sample, cancer diagnostics, serology, screening

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Cancersjukdomar blir allt vanligare bland människor såväl som bland våra sällskapsdjur, och framtagning av nya diagnostiska metoder är en ständigt aktuell fråga för forskningen. Att kunna ställa diagnos i ett tidigt skede av sjukdomen förbättrar prognos och överlevnad generellt sett. Serologi är en praktiskt lättillgänglig och kostnadseffektiv analysmetod, och skulle kunna underlätta diagnostik, rutinkontroller och sjukdomsuppföljning. Är det möjligt att i framtiden kunna ta ett enkelt blodprov för att utreda eller utesluta en cancerdiagnos? Tumörer utsöndrar olika kemiska föreningar till blodet, vilka kan fungera som biomarkörer för sjukdom. Dessa ämnen ger upphov till olika lukter som hundar med sitt väl utvecklade olfaktoriska sinne kan känna av. En rad olika studier har gjorts där man utvärderat tränade hundars förmåga att med hjälp av luktsinnet detektera specifika former av cancer i prov av varierande ursprung, detta med övervägande goda resultat.

I det här arbetet har vi genomfört en blindad studie där vi analyserat tränade hundars förmåga att detektera cancer i blodprover från andra hundar. Frågeställningen vi hade var om något tyder på att tumörer generellt utsöndrar ämnen till blodet som hundar kan lära sig känna igen. Finns det en gemensam ”cancerlukt”? 94 blodprover samlades in under perioden februari-juni 2015, varav 16 prover kom från cancersjuka hundar med olika typer av tumörsjukdom, och 78 kontrollprover från friska hundar. Sökhundarna och deras hundförare tränades enligt en belöningsbaserad metod efter en regim framtagen av erfarna hundtränare. Hundarna fick lukta på serum från cancerpatienter samt från friska kontroller och förväntades markera cancerproven genom att stanna med nosen vid dessa, en så kallad frysmarkering. Vid korrekt markering belönades hundarna. Efter träningsperioden valdes sex hundar ut för att ingå i de dubbelblindade tester som ligger till grund för resultaten i denna studie. Under testen användes alltså kodade blodprover och varken hundförarna eller hundtränarna kände till identiteten hos proverna.

Hundarna som grupp lyckades hitta tumörproverna bland prover från friska kontroller i 46 % av fallen, jämfört med 20 % som vi hade kunnat förvänta oss om hundarnas markeringar vore helt slumpmässiga. De sex sökhundarna som ingick i studien var relativt jämbördiga i sina förmågor att korrekt identifiera cancerproven, medan en viss skillnad kunde ses gällande hur lätta/svåra de olika cancerdiagnoserna var att detektera.

Den slutsats vi kan dra efter våra tester är att hundar kan tränas upp för att lukta sig till cancer i blodprover i större utsträckning än vad man kan förvänta sig av slumpen. Resultaten skulle antagligen kunna förbättras genom modifiering av studiedesign och träningsupplägg och redan nu finns planer på hur man kan finslipa och förbättra upplägget av hundträning och tester inför vidare studier inom ämnet.

SUMMARY

Cancer is a leading cause of death worldwide, among humans as well as our pets. To develop new diagnostic tools for early detection of the disease would improve prognosis and survival. The possibility to use a serological test that is easily accessible and cost effective would facilitate diagnostics, routine checkups and disease monitoring. So, in the future, will we be able to take a simple blood test to decide if a patient has cancer or not? Tumors give rise to chemical compounds that are secreted into the blood and can act as biomarkers for disease. These compounds generate different odors that dogs with their remarkable sense of smell can sense. Many studies have evaluated olfactory detection of cancer by trained dogs, showing predominantly positive results.

In this report, we have performed a blinded study where we analyzed trained dogs ability to detect cancer in blood samples from other dogs. We wanted to find out if something indicates that tumors in general secretes substances into the blood and, in that case, if dogs can learn to recognize them. Is there a common cancer smell? Ninety-four blood samples were collected during February-June 2015. Sixteen samples from cancer patients with different diagnoses and seventy-eight control samples from healthy dogs. The detection dogs were trained by experienced dog trainers according to a reward based method. The dogs were allowed to smell the serum samples from cancer patients and the control samples, and they were expected to indicate the cancer samples by freezing (standing still) above them. When they indicated correctly they were rewarded with a piece of food. After a period of training six detection dogs were chosen, based on performance at training, to participate in the double blinded tests that the results in this study are based upon. During the tests coded blood samples were used, and neither the trainers nor the dog handlers knew the identity of the different samples.

The dogs as a group were able to find the tumor samples among the healthy controls 46 % of the times, compared to 20 % expected by chance alone. The six dogs were more or less equal in their ability to correctly identify the cancer samples, but there was a difference in how easily detectable the different cancer diagnoses were.

Our conclusion is that dogs can be trained to detect cancer in blood samples by smell more successfully than can be expected by chance alone. Our results could probably be improved by modification of study design and training. The dog trainers learned a lot from this study and already have plans on how to improve the dog training and the tests to move forward with further studies on the subject.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	1
Bakgrund	1
Olfaktorisk analys	2
<i>Hundens luktsinne</i>	2
<i>Cancerdetektion</i>	2
<i>Elektroniska näsor</i>	3
Tumördetektion via blodanalys	3
<i>Biomarkörer</i>	3
<i>Serologi</i>	4
<i>Immunosignatur</i>	4
<i>Hur tidigt kan diagnos ställas?</i>	5
MATERIAL OCH METODER.....	5
Försök Hundnosen.....	5
Blodproven	6
<i>Val av kontroller och tumörprover</i>	6
<i>Hantering av prover</i>	6
Cancersök	6
<i>Team Hundnosen</i>	6
<i>Sökhundarna</i>	6
<i>Träningen</i>	7
<i>Testen</i>	10
<i>Statistik</i>	10
RESULTAT	10
DISKUSSION	11
KONKLUSION.....	16
REFERENSER.....	16
APPENDIX 1	
APPENDIX 2	

INLEDNING

Cancersjukdomar bland människor fortsätter att öka världen över (Lippi & Cervellin, 2011). Även hundar drabbas av cancer i stor utsträckning och att hitta nya diagnostiska metoder för att detektera tumörer i ett tidigt skede är föremål för intensiv forskning. Ju tidigare i sjukdomsskedet som diagnos kan ställas desto bättre blir prognosen generellt sett (McCulloch et al., 2006). Ett serologiskt test som tidigt kan detektera förekomst av cancer i blodet skulle möjliggöra tidigare diagnos samt rent praktiskt underlätta rutinkontroller och diagnostik (Johnston et al., 2014). Cancersjukdomar producerar olika kemiska föreningar vilka utsöndras bland annat i blod och kan fungera som biomarkörer för sjukdom. Dessa ämnen kan ge upphov till olika lukter, vilka potentiellt kan upptäckas av hundar tack vare deras väl utvecklade luktsinne. I detta examensarbete har vi genomfört en blindad studie där vi utvärderat tränade hundars förmåga att detektera cancer i serumprover från andra hundar. Sökhundarna ställdes inför blodprover från cancerpatienter med olika slags tumörsjukdomar samt från hundar utan påvisbar cancer. Frågeställningen vi hade var om det finns något som tyder på att tumörer generellt utsöndrar ämnen till blodet som hundar kan lära sig känna igen via sitt luktsinne. Verkar det finnas en gemensam ”cancerluk”? ”

LITTERATURÖVERSIKT

Bakgrund

I takt med att världens befolkningsantal blir större, folk blir äldre och ”cancerorsakande” beteenden blir vanligare så fortsätter cancersjukdomar bland människor att öka globalt sett (Lippi & Cervellin, 2011). Även hos hundar är cancer i olika former vanligt och en av de stora anledningarna till att man uppsöker veterinär. Enligt Lippi & Cervellin (2011) uppskattas ca 30 % av cancerbördan bland människor kunna förebyggas genom förbättrade screeningmetoder och tidig diagnosticering. På humansidan finns screeningprogram för en del cancerformer, såsom mammografi för bröstcancer och cellprovtagning för livmoderhalscancer. I vissa länder görs även allmän koloskopi för screening av koloncancer och PSA-screening (*Prostata-specifikt Antigen*) för prostatacancer. Screening har bidragit till minskad mortalitet i dessa sjukdomar (Bjartell, 2011), då möjligheten att upptäcka cancersjukdom i ett tidigare skede ofta leder till minskad behandlingstid, förbättrad prognos och förlängd överlevnad (McCulloch et al., 2006). Önskvärt är att hitta en metod som är kostnadseffektiv och som inte innebär några risker för patienterna, såsom ett enkelt blodprov. Ofta tar man hjälp av olika bilddiagnostiska metoder för att ställa en cancerdiagnos såsom röntgen, ultraljud, CT (*Computed Tomography/Datortomografi*), MR (*Magnetisk Resonanstomografi*) och PET-scan (*Positronemissionstomografi*). Framför allt de tre sistnämnda är precisa, men dyra och leder ibland till onödiga biopsier av benigna lesioner. Upprepade undersökningar med exempelvis CT och PET utsätter dessutom patienten för ökad mängd strålning, vilken i sig är potentiellt cancerframkallande (Moser & McCulloch, 2010). Att kunna använda sig av serologi för tidig cancerdiagnostik eller inom screening är en lockande tanke och något som undersökts av en rad olika forskarteam. Men hur ska blodprovet analyseras? Vilka biomarkörer ska vi leta efter, och hur ska vi identifiera dem? Hypotesen att hundar med hjälp av sitt luktsinne skulle kunna upptäcka maligna tumörer föreslogs första gången av Williams och Pembroke i ett brev till *The Lancet* år 1989. De hade då konsulterats av en kvinna vars hund visat överdrivet intresse för ett av hennes födelsemärken, vilket senare visade sig vara ett malignt melanom (Williams & Pembroke, 1989). Detta ledde till en rad studier kring hundens luktsinne som potentiellt

hjälpmedel inom cancerdiagnostiken, varav en del lagt fokus på de lukter som eventuellt kan överföras från tumörvävnad till blodet.

Olfaktorisk analys

Hundens luktsinne

Hundar har genom tiderna avlats på olika egenskaper som bland människor anses önskvärda. Den olfaktoriska förmågan, luktsinnet, är något som prioriterats högt inom aveln av bland annat jakthundar. Idag används hundar och deras luktsinne till exempel för att detektera narkotika, sprängmedel och försvunna personer (Quignon et al., 2012). Hundar har även visat sig ha förmåga att detektera kor i brunst genom att lukta på kornas saliv och kan därmed fungera som ett hjälpmedel vid brunstpassning (Fischer-Tenhagen et al., 2013). Vidare finns exempel på hundar som används inom sjukdomsdetektion, exempelvis så kallade diabeteshundar (Hardin et al., 2015) och epilepsihundar (Dalziel et al., 2003). En hund kan tränas upp att känna igen en doft relaterad till hypoglykemi hos en typ 1-diabetiker och varna denne innan glukoshalten i blodet sjunker till skadliga nivåer (Hardin et al., 2015). Vad hunden känner av hos en epileptiker som är på väg in i ett anfall är mer oklart, men det är enligt Dalziel et al. (2003) möjligt att det även där handlar om en förändring i den doft som människan utsöndrar. Ett flertal studier har gjorts för att utreda huruvida hundar och deras väl utvecklade luktsinne också kan användas som ett hjälpmedel för att detektera cancer. Man har tränat hundar på olika typer av prover såsom vävnadsprover, urin, utandningsluft och blod från människor med olika typer av cancerdiagnoser.

Cancerdetektion

Redan år 1989 rapporterades om en kvinna vars hund frekvent nosat på och försökt bita över ett av hennes födelsemärken, vilket ledde till att kvinnan uppsökte läkare som senare kunde fastställa att det rörde sig om ett malignt melanom (Williams & Pembroke, 1989). Denna rapport ligger till grund för en rad studier med syfte att bedöma hundens förmåga att via sitt luktsinne detektera cancer. År 2004 gjorde Pickel et al. en mer systematisk studie efter ovan nämnda anekdot där de tränade två hundar att identifiera melanomvävnad som gömmts på huden hos friska volontärer. Den ena hunden lyckade lokalisera melanomet med en sensitivitet på 86 % medan den andra hunden kom upp i en sensitivitet på 75 %. Värt att notera angående denna studie är också att den ena av hundarna markerade förekomst av melanom på en lokalisation som efter initial patologiundersökning bedömts som negativ, men där man efter mer noggrann histopatologisk undersökning mycket riktigt fann melanom i en liten andel celler (Pickel et al., 2004). Willis et al. (2004) visade att hundar med hjälp av sitt luktsinne kan lära sig detektera urinvägscancer i urinprover med större framgång än vad man kan förvänta sig av slumpen. Deras resultat tydde även på att hundarna kunde särskilja ”cancerlukten” från de lukter som uppstår genom sekundära effekter av tumörsjukdomen såsom blödning, inflammation och infektion (Willis et al., 2004). Vidare har en studie gjorts där man fann att hundar kan detektera även prostatacancer i urinprover, detta med en sensitivitet och specificitet på 91 % (Cornu et al., 2011). År 2006 utvärderade McCulloch et al. ett olfaktoriskt test för att identifiera lung- och bröstcancer i utandningsluft. I studien tränade man under 2-3 veckor upp vanliga sällskapshundar för att analysera utandningsluft från patienter med kända cancerdiagnoser samt från friska kontroller. Testet visade att hundarna kunde identifiera cancerproverna med en specificitet och sensitivitet på 99 % (McCulloch et al., 2006). Horvath et al. visade i sin studie

från 2008 att tränade hundar kan hitta äggstockscancer genom att lukta på vävnadsprover från tumörer samt från frisk vävnad. I deras test var sensitiviteten 100 %, och specificiteten 97,5 %. Hundarna tycktes även kunna skilja mellan karcinom i just äggstockarna och andra gynekologiska tumörer, varför man föreslog att olika cancerformer utsöndrar olika lukter. Dessutom fann man att den lukt som tumörerna utsöndrar verkar vara samma, oavsett stadiet av sjukdom. I och med dessa observationer föreslog forskarna i studien att den specifika lukten hos en cancersjukdom potentiellt kan användas inom sjukdomsscreening och diagnostik/differentialdiagnostik (Horvath et al., 2008). År 2010 fann samma forskarteam att den karaktäristiska lukten som äggstockskarcinom avger även utsöndras till blodet. Genom att träna hundar både på vävnadsprover från tumörerna samt på blod från samma patienter fann man att hundarna med 100 % sensitivitet och 98 % specificitet kunde känna igen cancerproverna genom att lukta på blodprover (plasma) från cancerpatienterna samt från friska kontroller (Horvath et al., 2010).

Elektroniska näsor

Man har även elektroniskt försökt imitera det biologiska olfaktoriska systemet genom olika typer av elektroniska ”näsor”. Det har bland annat tagits fram prototyper för elektronisk detektion av bröstcancer i utandningsluft (Shuster et al., 2011) och urinvägscancer i urinprover (Khalid et al., 2013). Trots att ingen direkt jämförande studie har gjorts verkar hundnosen prestera bättre än de elektroniska varianterna, baserat på sensitivitet och specificitet från de olika studierna (Bijland et al., 2013). Horvath et al. (2008) tror dock inte att vi kommer hitta hundar på kliniska laboratorier i framtiden, då de som ett ”levande instrument” kan påverkas av alltför många faktorer för att vara en säker analysmetod. Men man tror däremot att de under kontrollerade former kan användas i experimentellt syfte för att vidare utreda egenskaper såsom just lukter hos tumörer (Horvath et al., 2008). Hunden kan eventuellt också användas som ett hjälpmedel under framtagning av säkrare elektroniska analysinstrument.

Tumördetektion via blodanalys

Biomarkörer

Kroppens metabolism i kombination med bland annat körtlar, hormoner och så kallade flyktiga organiska föreningar (*”Volatile Organic Compounds”* – VOCs) ger upphov till lukter (Bijland et al., 2013). Man tror att varje individ har en unik lukt, vilket utnyttjas bland annat vid användning av hundar för personsök i polisärenden (Kusano et al., 2013). Olika typer av cancersjukdomar producerar ett stort antal kemiska föreningar, vilka utsöndras i blod, urin, utandningsluft och svett (Lippi & Cervellin, 2011). Dessa ämnen kan fungera som biomarkörer, vilka potentiellt kan användas inom cancerdiagnostik, screening samt under monitorering av sjukdomen. Cancerceller uttrycker VOCs såsom aldehyder, fettsyror och alkaner med flera, varav en del är specifika för just cancerceller och alltså inte uttrycks av friska celler. Det är också möjligt att cancercellerna uttrycker samma VOCs som friska celler men i betydligt större mängd, vilket eventuellt kan vara detekterbart via blodanalys (Lippi & Cervellin, 2011). Genom användning av exempelvis gaskromatografi-masspektroskopi (GC-MS) har man kunnat identifiera vissa av dessa föreningar med potential att fungera som biomarkörer för sjukdom (Lippi & Cervellin, 2011). Ovan nämnda analysmetod har dock inte förmåga att identifiera alla kemiska föreningar som kan finnas i blodet, varför risken finns att de kanske missar den

viktigaste biomarkören (McCulloch et al., 2006). Där hoppas man att hundar ska kunna komma in och leda vägen till ”cancerlukten”.

Serologi

Finns det något som tyder på att man i framtiden skulle kunna ta ett enkelt blodprov för att utreda om en patient har cancer eller inte? Serologi är generellt praktiskt lättillgängligt och kostnadseffektivt. För att kunna designa ett serologiskt test krävs att man hittar en passande biomarkör (Johnston et al., 2014). Önskvärt vore att identifiera en biomarkör som kan återfinnas i blodet tidigt i sjukdomsförloppet hos olika typer av tumörer. Horvath et al. fann år 2010 att ovariekarcinom avger en karaktäristisk lukt vilken även utsöndras till blodet. Att identifiera de specifika molekyler som ger upphov till denna lukt är nästa utmaning (Horvath et al., 2010). Cancerantigen-125 (CA-125) är ett protein förknippat med ovariekarcinom, och ca 80 % av kvinnor med framskriden äggstockscancer har förhöjda nivåer av CA-125 i blodet (Nossov et al., 2008). Analys av denna molekyl används dock inte som en allmän screeningmetod då den anses ha för låg sensitivitet och specificitet tidigt i sjukdomsförloppet (Nossov et al., 2008). Vidare finns ett antal andra blodbaserade biomarkörer identifierade för olika cancerformer, såsom prostataspecifikt antigen (PSA) för prostatacancer och alfa-fetoprotein (AFP) för levercancer. Dessa analyser används till viss del inom diagnostiken och i bland annat USA används PSA-testet även inom screening för prostatacancer (Moyer, 2012). Generellt anses dock både PSA- och AFP-analyserna ha för låg sensitivitet och specificitet för att ingå i allmänna screeningprogram (Moyer, 2012; Arrieta et al., 2007). En utmaning för forskningen är alltså att ta fram ett mer specifikt och sensitivt serologiskt test.

Immunosignatur

Vid framtagning av ett serologiskt test för tidig detektion av cancer krävs, enligt Johnston et al. (2014) att man löser problemet med utspädning av ämnen i blodet: det vill säga, om 10^6 cancerceller utsöndrar 1000 molekyler var av en specifik biomarkör i två liter blod vid steady-state skulle koncentrationen av denna biomarkör endast vara 1.3×10^{-14} M, vilket är under en detekterbar nivå även för de bästa befintliga analyserna. De flesta typer av cancer genererar ett detekterbart cellulärt och humoralt immunsvär, även om detta inte är kapabelt att kontrollera sjukdomen. Johnston et al. har utvecklat en teknologi de kallar *immunosignatur*, vilken åskådliggör cirkulerande antikroppar på en så kallad mikromatris (*peptide microarray*). En lösning på blodutspädningsproblemet skulle således kunna vara analys av just antikroppar. Självreaktiva antikroppar förekommer hos cancersjukdomar där aktivering av en enskild B-cell tidigt i sjukdomsförloppet kan resultera i en 10^{11} x amplifiering av signalen på endast en vecka. Antikroppar är dessutom stabila i blod, vilket möjliggör användning av arkiverade prover bland annat under utvecklingen av analysmetoden. Johnston et al. fann vidare i sin studie att hundar har en individuell immunosignatur och att denna förändras hos hundar med lymfom. Man upptäckte också att det finns en generell immunosignatur för just lymfom, vilken kunde förutspå sjukdomsstadiet och bekräfta regression av sjukdomen tre månader efter diagnos. Med hjälp av immunosignaturen vid diagnos lyckades man förutspå vilka hundar med B-cellslymfom som skulle få ett återfall inom 120 dagar efter behandling, därmed kunde man skilja mellan en mer aggressiv form av sjukdomen och en ”snällare” variant. Immunosignaturen kunde även skilja på B- och T-cellslymfom (Johnston et al., 2014).

Hur tidigt kan diagnos ställas?

Hori & Gambhir skrev i sin studie från 2011 om en matematisk modell de utvecklat för att bestämma minsta möjliga volym en tumör måste ha för att den ska kunna detekteras via befintlig biomarkörbaserad blodanalys. Studien är baserad på kända egenskaper hos prostata- och äggstockscancer hos människa och visade att en tumör kan växa i över 10.1 år och bli 20.4 mm³ innan den kan detekteras med befintlig klinisk blodanalys. Det är då troligt att tumören redan hunnit metastasera. Modellen kan enligt forskarna appliceras på i stort sett alla solida cancertyper och dess associerade biomarkörer. Man såg ett samband mellan grad av malignitet och utsöndring av biomarkör – maligna tumörer tycktes utsöndra dessa i större mängd än vad benigna tumörer gör. Vidare visade man att utsöndringshastigheten hos de biomarkörer för vilka det idag finns kliniska blodanalyser troligen är 10⁴ för låg för att kunna detekteras inom det första decenniet av tumörtillväxt. Forskarteamet konkluderar att det borde vara möjligt att detektera tumörer tidigare med hjälp av blodanalys, men att detta beror på flera faktorer såsom bland annat biomarkörsutsöndring, angiogenes och tumörtillväxt (Hori & Gambhir, 2011).

MATERIAL OCH METODER

Försök Hundnosen

I denna studie har vi utvärderat tränade hundars förmåga att detektera cancer i serumprover från andra hundar. Frågeställningen vi hade var om det finns något som tyder på att tumörer av olika ursprung utsöndrar ämnen till blodet som hundar kan lära sig känna igen via sitt luktsinne. Hundarna förväntades efter en träningsfas kunna skilja på blod från cancerpatienter och blod från friska kontroller. Blodproverna vi använde kom från cancerpatienter med olika typer av tumörsjukdomar samt från friska hundar av varierande ras, kön och ålder. Dessa prover har gjorts tillgängliga för SLU:s biobank och går därmed under särskilt biobanksavtal, varför ingen etisk prövning har gjorts. Proverna för träning och tester fördelades i två grupper: ”Sjuk” och ”Frisk”. Alla prover märktes upp och fördes in i en tabell där ras, kön och ålder registrerades, samt i tumörpatienternas fall även diagnos. Vi kunde därmed bland annat även utvärdera om det verkar finnas tendens till att vissa cancerformer är lättare för de tränade hundarna att detektera än andra, men detta var alltså inte huvudsyftet med studien. Vi valde att använda oss av serum då det är ett lättillgängligt prov som fungerar väl i praktiken, både vad gäller insamling och förvaring etc.

Blodprover från 94 hundar samlades in under perioden februari-juni 2015. Proverna togs från 78 friska och 16 cancersjuka hundar av varierande ålder, ras, kön och i cancerpatienternas fall även med olika typer av tumörsjukdomar. Serum delades upp i mindre rör, varav ett av varje prov användes till träning av hundar inom cancersök. Övriga provrör sparades i frys (-70 °C) för användning vid senare träningsstillfällen samt vid blindtester. Hundarna tränades i cancersök vid upprepade tillfällen efter en speciell regim framtagen av erfarna hundtränare. Sex hundar valdes sedan ut för att ingå i de dubbelblindade tester som ligger till grund för resultaten i denna studie.

Blodproven

Val av kontroller och tumörprover

Som kontroller användes blodprover från friska hundar av varierande kön, ålder och ras. Vi fick en del prover från blodgivarhundar som kommit in till Universitetsdjursjukhuset för att donera blod till blodbanken. För att rekrytera ytterligare kontroller till studien skickades ett e-mail ut till alla veterinär- samt djursjukskötare studenter på SLU där friska hundar efterfrågades för donering av blod. Det enda kriteriet för att de skulle få ingå i studien var att de var kliniskt fullt friska. Blodproverna som togs från dessa hundar analyserades för bl.a. lever- och njurvärden, infektionsbild etc., se aktuell remiss i Bilaga 1. Om något prov visade avvikande värden på någon parameter uteslöts denna hund från studien.

Tumörproverna kom från cancerpatienter som inkommit till specialistmottagningen på Universitetsdjursjukhuset. Även dessa hundar var av varierande kön, ålder och ras samt med olika typer av tumörsjukdomar, diagnostiserade med gängse metoder för respektive sjukdom (biopsier/FNA, CT samt röntgen etc.). Blodproverna togs innan eventuell behandling, medicinsk eller kirurgisk.

Hantering av prover

Blodproven samlades i serumrör som sedan centrifugerades. Serumet hälldes över i kryorör vilka märktes med hundens journalnummer och datum för provtagningen. Dessa rör förvarades sedan i frys (-70 °C). Prover skickades kontinuerligt i små grupper till företaget *Hundnosen* för specialsöksträning. För blindtesten kodades blodproverna slumpmässigt och fördelades i kryorör numrerade 1A, 1B, 1C osv. Fullständig förteckning i Bilaga 2.

Cancersök

Team Hundnosen

Hundnosen består av två erfarna hundtränare som håller i utbildningar i specialsök och spår. De tränar upp ekipage, det vill säga både hundar och hundförare. Hundföraren är den person som arbetar med hunden, här ofta hundägaren. Under 2014-2015 tränades ca 15 ekipage i cancersök, ett projekt som startats i samarbete med SLU.

Sökhundarna

Sex stycken av de specialtränade cancersökhundarna valdes efter deras prestation på träningarna ut för att ingå i de blindade studierna, dvs de testomgångar då varken hundtränare eller hundförare kände till identiteten hos blodproverna. De hundar som ingick i denna testgrupp, tre tikar och tre hanar, var av varierande ras och ålder samt med olika erfarenhet av sökträning. Två av hundarna hade tränats i cancersök kontinuerligt sedan början av 2014, medan övriga fyra hundar tränat cancersök vid ca 10 tillfällen vardera. Samtliga hundar har genomgått kurser/träning hos Hundnosen. Övrig information om hundarna kan ses i Tabell 1. Hundarna som valdes ut av Hundnosens tränare var de som presterat bäst under den senaste träningsomgången inför de blindade studierna, då träningen gjordes så lik blindtesten som möjligt. Man tog även viss hänsyn till respektive hundförares kompetens vid val av sökhundar.

Tabell 1. Information om sökhundarna

Hund nr. /Namn	Ras	Kön	Född (år/mån)	Bakgrund
1/Akita	Schäfer	Tik	2013/01	1-årig utbildning i specialsök-droger. Cancersök ca 10 träningstillfällen.
2/Tindra	Schäfer	Tik	2004/06	Tränat specialsök sedan 2006. Droger, spår/ID, personsök. Cancersök sedan 2014.
3/Sniff	Flatcoated retriever	Hane	2005/04	Tränat specialsök sedan 2010. Droger, spår. Cancersök sedan 2014.
4/Keo	Australian sheperd	Hane	2013/12	1-årig utbildning i specialsök-droger. Cancersök ca 10 träningstillfällen.
5/Saga	Schäfer	Tik	2013/11	Grundkurs i specialsök och kurs i Nosework*. Cancersök ca 10 träningstillfällen.
6/Ice	Border collie	Hane	2013/02	Grundkurs i specialsök och kurs i Nosework*. Cancersök ca 10 träningstillfällen.

(* Nosework är en tävlingsform inom specialsök, ursprungligen från USA)

Träningen

Träningsupplägget, framtaget av Hundnosens hundtränare, bygger på en belöningsbaserad metod där hundarna förväntas markera ett specifikt prov för att erhålla sin belöning i form av en godisbit. Blodproverna fördes innan träningen över från kryorör till burkar av rostfritt stål, utvalda för att de i sig själva inte avger störande dofter. Hundarna placerades på ett bord framför en stålkonstruktion, en så kallad *plattform* framtagen av Hundnosen. Plattformen består av fem brunnar täckta med galler samt med en förskjutbar ränna under brunnarna där burkarna med blodprover placerades (Bild 1). Rännan har plats för nio burkar. Hundarna fick nosa i alla brunnarna och skulle sedan markera det blodprov som kom från en cancerpatient (Bild 2). Markeringen som användes i detta fall var en så kallad frysmarkering, vilket innebär att hunden ska stanna med nosen ovanför aktuell brunn/prov (Bild 3). Hundarna belönades varje gång de markerade rätt prov och efter varje markering flyttade hundföraren burkarna genom att skjuta rännan under brunnarna åt det ena eller andra hållet, och lät därefter hunden nosa igen. Detta upprepades ett antal gånger under en träningsomgång. Mellan varje omgång rengjordes plattform och burkar för att undvika att hundarna stördes av föregående hunds doft/saliv.



Bild 1. Plattformen framtagen av Hundnosen. Fem gallerförsedda brunnar samt en förskjutbar ränna med nio burkar i rostfritt stål där blodproverna placerades.



Bild 2. Hunden nosar i samtliga brunnar för att utvärdera var cancerprovet finns. Efter markering kan hundföraren förskjuta rännan under brunnarna åt olika håll för att upprepa proceduren



Bild 3. Hunden stannar med nosen ovanför en av brunnarna (frysmarkering). Vid korrekt markering sker belöning genom att en godisbit släpps ner till hunden. (Foto: Lotta Siverhall)

Under de första träningsomgångarna visste både hundtränarna och hundförarna vilka burkar som innehöll kontroller och vilken burk som innehöll ett tumörprov. I slutskedet av träningen, innan blindtesten tränade de ”enkelblindat”, dvs. hundtränarna visste vilka prover som var kontroller och vilka som var tumörer medan hundförarna var blindade. Detta för att minska risken för att hundförarna omedvetet ger hundarna subtila signaler vilka hundarna uppfattar istället för att de verkligen via luktsinnet avgör vilka prover som är vilka.

Till en början användes blod från tre individer i samma burk, både för kontroller och för cancerprover. Detta dels för att under uppstarten av träningen höja koncentrationen doftämnen och dels för att minska risken för att hundarna lärde sig känna igen individuella dofter. Under senare träningsfas och under blindtesterna användes blod från en individ i varje burk, bland annat för att möjliggöra för oss att föra protokoll på varje enskilt prov samt analysera för andra parametrar.

Testen

De kodade blodproverna delades upp i grupper om fem prover varav ett prov i varje grupp kom från en cancerpatient. Varken hundförare eller hundtränare visste vilka prover som var vilka. Den enda person som kände till identiteten hos de kodade proverna befann sig inte på plats under genomförandet av blindtesten. Testen bestod av 20 omgångar, det vill säga hundarna ställdes inför 20 grupper med fem prover i varje grupp. Testupplägget var samma som under träningen med den skillnaden att hundarna efter varje testomgång fick gå in i ett annat rum där en likadan plattform stod preparerad med kända prover, vilka de fick nosa på upprepade gånger. Detta för att hundförarna skulle kunna belöna hundarna för markering vid rätt prov ett antal gånger och befästa den kunskapen, då risk fanns att hundarna belönats för markering vid felaktigt prov inne i blindtestrummet. Blindtesten genomfördes under två dagar, med 10 omgångar under dag 1 och resterande 10 omgångar under dag 2. Hundtränarna/hundförarna fyllde under blindtesten i en tabell, där de för varje hund och för varje grupp med prover antecknade vilket prov som hunden markerade för. Denna tabell är sedan underlaget för våra resultat.

Statistik

För att avgöra om hundarnas prestationer överträffade den nivå man skulle ha förväntat sig av slumpen räknade vi först ut hur stor procentuell andel korrekta markeringar vi fick av hundarna som grupp. Utifrån dessa siffror räknades sedan en procentsats ut, vilken jämfördes med den procentuella andel korrekta markeringar man kan förvänta sig av enbart slumpen. Detta testades i statistikprogrammet Minitab med testet One-Sample Proportion, ensidigt test med signifikansnivån 5 %. Testet räknar ut om en proportion av observerade värden signifikant skiljer sig från ett specificerat värde. För att få en överblick över huruvida någon tumörform tycktes lättare för hundarna att upptäcka, eller om någon av hundarna presterade bättre än övriga räknades procentsatser ut för andel korrekta markering per diagnos samt andel korrekta markeringar per hund. Detta främst för underlag till diskussion.

RESULTAT

Av 120 markeringar totalt (20 testomgångar med totalt 6 markeringar per omgång) fick vi 55 korrekta markeringar, vilket ger en procentuell träffsäkerhet på 46 % (55/120) totalt sett, inbegripet samtliga hundar och samtliga diagnoser. Med 5 prover per omgång varav 1 tumörprov förväntas man få 1/5 dvs. 20 % korrekta träffar enbart genom slumpen. Utifrån testet One-Sample Proportion erhöles ett p-värde på 0,000 räknat med en konfidensgrad på 95 % (konfidensintervall 0,367060; 0,551712).

Tabell 2 visar en sammanställning över aktuella tumördiagnoser som förekom i proverna inklusive andel korrekta markeringar för respektive diagnos. I Tabell 3 ses en förteckning över varje hunds individuella resultat under blindtesten.

Tabell 2. Cancerdiagnoser förekommande i blodproverna

Diagnos	Hundarnas markeringar		
	Totalt antal	Antal rätt	Andel rätt
Skivepitelscarcinom	6	5	83 %
Osteosarkom	12	7	58 %
Juvertumör	18	9	50 %
Lungtumör	6	3	50 %
Histiocytärt sarkom	6	3	50 %
Malignt lymfom	30	14	47 %
Mastocytom	18	8	44 %
Tumör näshåla	12	3	25 %
Fibrosarkom	12	2	17 %

Vid kontroll av respektive cancerpatients journal har inget samband hittats mellan grad av malignitet och antal markeringar för respektive prov.

Tabell 3. Hundarnas individuella prestationer

Hund	Andel korrekta markeringar	Träffsäkerhet i procent
1/Akita	11/20	55 %
2/Tindra	11/20	55 %
3/Sniff	8/20	40 %
4/Keo	8/20	40 %
5/Saga	10/20	50 %
6/Ice	7/20	35 %

DISKUSSION

Under genomförandet av denna studie har vi frågat oss: Kan hundar lukta sig till cancer i blodprov? Det vill säga, verkar det finnas en generell lukt som utsöndras i blodet oavsett tumörtyp? Ytterligare en fundering som funnits med i tankarna, och något som bör analyseras vidare i framtida studier har varit: Hur tidigt i sjukdomsförloppet kan vi ställa diagnos?

Förhoppningen är att denna pilotstudie ska kunna bistå med lärdomar inför vidare studier inom ämnet. Vi valde enklast möjliga upplägg och våra prover placerades i kategorierna *frisk* (kontrollprov) eller *sjuk* (tumörprov). I de primära analyserna togs ingen hänsyn till andra parametrar. För att detta ska kunna fungera krävs således att alla typer av tumörer utsöndrar samma eller liknande ämnen, vilka hundar kan särskilja från friska kontroller. Alternativt att sjukdomsprovernas lukt tydligt skiljer sig från de friska kontrollerna fastän kanske på olika sätt.

Om det senare är fallet ökar risken för att sjukdom oavsett diagnos, såsom tumörsjukdom, infektion, inflammation, endokrinopati etc. kan särskiljas från en fullt frisk individ men att det då inte är specifikt cancersjukdom som hundarna kan identifiera. Enligt studien av Willis et al. (2004) fann man att hundar kunde hitta just cancer, i deras fall i urinprover, och att detta var oberoende av annan typ av diagnos. Det önskvärda vore att cancer i sig har en specifik och generell lukt vilken utsöndras till blodet och som man kan träna hundar att känna igen. Olika cancerformer har troligen olika lukter (Horvath et al., 2008), men kan det finnas en kemisk förening som förekommer i blodet hos alla med cancer, oavsett sjukdomens lokalisation?

Våra blodprover togs från andra hundar, medan de flesta övriga studier inom ämnet har använt sig av humanprover. Hunden har i många sammanhang redan föreslagits som ett modelldjur för människan, eftersom de lever i samma miljö som vi och drabbas av samma typer av sjukdomar (cancersjukdomar, fetma, diabetes etc.), men pga. generellt kortare levnadslängd hos hund än hos människa så är sjukdomsförloppet mer överskådligt, vilket är lämpligt just i studiesyfte (Rowell et al., 2011). I ett längre perspektiv hoppas vi därför att de kunskaper vi förvärvar ska kunna appliceras både på hundar och människor.

Resultaten från våra tester är inte entydiga. Hundarna som grupp lyckades hitta tumörproverna bland prover från friska kontroller i 46 % av fallen, jämfört med 20 % som vi hade kunnat förvänta oss om hundarnas markeringar vore helt slumpmässiga. Detta indikerar att det finns något i blodet hos cancerpatienter som hundar genom träning kan lära sig känna igen. P-värdet på 0,000 från One-Sample Proportion testet kan tolkas som att det är mindre än 0,1 % sannolikt att hundarnas markeringar är slumpmässiga ($P < 0,05$ tyder på ett statistiskt signifikant resultat). Förutsättningarna för en säker tolkning av resultatet från detta test är att alla sökhundar är lika skickliga samt att alla tumörer är lika lätta/svåra att detektera i blodproverna. Underlaget i vår studie är för litet för att säkert kunna uttala sig om hur dessa förutsättningar uppfyllts. Resultaten som kan ses i Tabell 2 pekar på att tumördiagnoserna är olika svåra att detektera, men vi har som sagt ett för litet underlag för att kunna dra några säkra slutsatser från denna tabell. I Tabell 3 kan vi se att det verkar som att hundarna är relativt jämbördiga i sina förmågor. En liten skillnad kan ses mellan hundarna men det är ingen som markant sticker ut åt det ena eller andra hållet. Det är inte heller någon signifikant skillnad mellan de hundar som tränat cancersök under en längre period (Tindra och Sniff) och de som tränat cancersök vid ca tio tillfällen (övriga hundar). De sex hundar som valdes ut av Hundnosens tränare att medverka under blindtesten var av olika raser, kön och ålder. Det finns med största sannolikhet individuella skillnader mellan hundar i deras förutsättningar att bli skickliga sökhundar, vilket i många fall kan vara oberoende av träningsmängd. Quignon et al. (2012) visade att den olfaktoriska förmågan varierar både mellan individer och raser. Detta på grund av att generna för olfaktoriska receptorer uppvisar polymorfism i hög grad (Quignon et al., 2012). Det är möjligt att ett annat val av sökhundar hade gett ett annorlunda resultat, men dessa sex valdes ut bland de tillgängliga sökhundarna för att de presterade bäst under träningsfasens slutskede, då träningen i så hög grad som möjligt liknade blindtesten. En svårighet med att arbeta med sökhundar är att de måste tränas kontinuerligt för att underhålla sin kapacitet. Idealiskt vore att ha möjlighet att välja bland fler väl tränade hundar, men urvalet av hundar för vår studie var begränsat, helt enkelt för att det inte finns fler hundar som är tränade inom detta område.

De falskt negativa svaren, det vill säga de tumörprover som markerades i väldigt låg grad av hundarna återfinns längst ner i Tabell 2. Vid kontroll av respektive cancerpatients journal har inget samband hittats mellan grad av malignitet och antal markeringar för respektive prov. Ett intressant fynd är dock att i fråga om de tre juvertumörprover som vi hade tillgång till så var två av mer malign karaktär och ett prov kom från en hund med benigna tumörer. De två förstnämnda proverna markerades av fyra respektive fem sökhundar, medan det benigna provet inte markerades alls. Detta skulle kunna bero på att maligna tumörer utsöndrar biomarkörer i högre grad än benigna, vilket föreslogs i studien av Hori & Gambhir (2011). Maligna juvertumörer är således kanske en av de tumörformer som hundar i hög grad kan identifiera i blodprover. I tabell 2 kan vi se att träffprocenten för juvertumörer var 50 %, men om vi räknar bort resultaten för det benigna provet så blir träffsäkerheten istället 75 %. Det här är intressant i det avseendet att man med en framtida serologisk analys kanske redan i tidigt skede kan skilja på benigna och maligna tumörer, vilket spelar en betydande roll för vidare diagnostik, eventuell behandling och inte minst prognos.

Bland de falskt positiva svaren, alltså de gånger ett kontrollprov markerades av hundarna, var det ett prov som markerades av fem hundar och två prov som markerades av fyra hundar. De tre aktuella kontrollhundarna är födda 2011-2012, två hanar och en tik av olika raser. För att utreda om det verkade finnas någon typ av mönster bland de kontrollprover som gav många markeringar gjordes en sammanställning av de prov som fått mellan 3-5 markeringar (alltså markerats av hälften eller fler av hundarna). Det handlar om åtta prover, från hundar av olika kön, ras och ålder. Man skulle kunna tänka sig att hitta företrädesvis äldre hundar i denna kategori, då risken för cancer ökar med åldern och odiagnostiserade tumörer skulle kunna förekomma men av de hundar som bidragit med dessa kontrollprover är sju stycken födda mellan 2011-2014, och endast en äldre hund, född 2004 (tre markeringar). Vad det är som sökhundarna känt av och markerat för är oklart. Vid genomgång av journaler den 2 december 2015 hade ingen av de aktuella kontrollhundarna besökt UDS sedan blodprovstagningen i april-maj 2015 annat än i egenskap av blodgivare. Givetvis kvarstår möjligheten att någon av dessa kontrollhundar har en odiagnostiserad tumör, men det är ingenting som misstänks i nuläget.

När vårt arbete befann sig i träningsfasen fick vi återkoppling från mycket positiva hundtränare som lät meddela att de såg stor potential hos hundarna. De tycktes helt klart känna igen ett cancerprov bland friska kontroller, oavsett cancerdiagnos. Även när hundförarna blindades gentemot proverna fick de fortsatt goda resultat från hundarna. Kort därpå, under de dubbelblindade testerna när också hundtränarna blindades sågs inte alls samma lovande resultat. Vad beror denna plötsliga resultatförsämring på? Troligen är det ett flertal faktorer som spelat in. I början av träningsfasen hade man inte tillgång till så många blodprover, varken friska kontroller eller cancerprover. Man gjorde då så att man endast flyttade på proverna från de friska kontrollerna efter varje omgång medan man bytte ut cancerproverna, som det bara behövdes ett prov av per omgång. Det är sannolikt att hundarna under träningen memorerade de individuella lukterna hos kontrollerna och sedan markerade för det nya provet i varje omgång. Och då det nya provet bland ett flertal välkända dofter oftast var ett cancerprov fick man rätt markering från hundarna, men av fel anledning. Alltså utan att de nödvändigtvis kände en specifik "cancerlukt". Enligt Elliker et al. (2014) bör man alltid ha hundens olfaktoriska minne i åtanke vid framtagning av den här typen av studier, och det är viktigt att man är extremt noggrann vid val av metoder för dubbelblindning för att undvika felkällor (Elliker et al., 2014).

I och med vår efterlysning av friska hundar för donering av blod fick vi så småningom tillgång till en betydligt större mängd kontrollprover och under den sista träningsomgången inför blindtesten byttes även dessa ut samtidigt som cancerproverna. Att ha tillgång till fler prover var självklart positivt, men det visade sig alltså leda till betydligt sämre resultat. Nu var plötsligt alla prover nya i varje omgång, och hundarna blev förvirrade. Här krävs sannolikt att man ”omprogrammerar” hundarna genom att under en längre period träna dem på endast nya blodprover, så att de lär sig vad det är de ska leta efter. Det ställs stora krav även på hundförarna i den här typen av träning/studie. De ska kunna läsa av sina hundar korrekt och de ska vara så neutrala som möjligt, vilket kan vara svårt även när de inte vet vilket prov som är vilket och vi vet inte vad hundarna kan uppfatta som subtila signaler från sina förare. Att man har en väl fastställd markering är viktigt, och att hundarna är tydliga i sina markeringar, detta för att säkerställa att hundförarna gör korrekta avläsningar. Både tränare och hundförare var lite nervösa inför de dubbelblindade testen (detta har bekräftats muntligt av Hundnosens tränare), vilket hundarna sannolikt märkte och lät sig påverkas av. Detta kan också ha bidragit till att resultaten var bättre dag två (55 % korrekta markeringar) jämfört med dag ett (37 % korrekta markeringar). Kanske vore det säkrare att genomföra fler tester, alltså ”träna” på testerna några gånger innan man läser av resultaten.

Som kontroller använde vi oss av prover från hundar av olika kön, ålder och ras, vilket kan ha försvårat arbetet för sökhundarna, då kontrollerna troligen utsöndrar olika sammansättningar av olika biomarkörer i olika stor mängd. Studier har visat att människor har individuella lukter baserat på deras sammansättning av VOC:s (Kusano et al., 2013), vilket sannolikt också gäller för hundar, så även om vi hade använt mer likvärdiga kontroller skulle de antagligen ha utsöndrat olika lukter. En alltför begränsad kontrollpopulation skulle inte heller kunna utgöra grunden för framtagning av ett kliniskt väl fungerande test, då verkligheten inte är så pass homogen. Ytterligare ett viktigt argument för vårt val av kontroller är att vi annars skulle ha haft väldigt svårt att få tag på ett så pass stort urval olika blodprover. Trots våra generösa urvalskriterier hade vi dock endast ett begränsat antal prover att basera våra testresultat på, och i vidare studier vore det lämpligt med ett större underlag.

Våra test såg ut så att varje testomgång bestod av fem blodprover varav ett var tumörprov och övriga fyra var kontrollprover. Hundarna skulle markera ett prov i varje omgång genom att stanna med nosen ovanför den brunn de ville markera, en så kallad frysmarkering. Vi hade ingen specifik markering för ”negativt prov”, och uppbyggnaden av testen tillät inte heller att hundarna markerade för fler än ett prov per omgång. Ett alternativ hade varit att helt slumpmässigt placera fem helt okända prover i plattformen, vilket skulle ha lett till att vissa testomgångar innehöll flera tumörprover och andra omgångar kanske skulle vara helt utan tumörprov. Detta ansåg hundtränarna inte vara något bra alternativ, då hundarna enligt deras regim tränas för att i varje omgång utföra en markering. Risken fanns då att hundarna i större utsträckning skulle ha markerat en kontroll i de fall inget tumörprov fanns i rännan, vilket skulle leda till ett ökat antal falskt positiva svar. Alternativet skulle också ge ett större antal falskt negativa svar då hundarna och hundförarna inte heller tränades på det scenario där fler tumörprover fanns i rännan samtidigt. För vidare träning/tester kan man behöva arbeta fram en annan slags markering för ”inget tumörprov”. Detta är en utmaning och något som bör ses över i samarbete med hundtränarna.

Vi kan se en skillnad i resultat från de olika studierna som utvärderat hundnosen som potentiellt hjälpmedel inom cancerdiagnostiken. Många av de övriga studierna som refererats till i detta arbete har visat resultat med sensitivitet och specificitet på mellan 90-100 %, vilket vi i våra tester inte riktigt uppnått (våra resultat är inte heller presenterade i proportionerna sensitivitet/specificitet). Vad beror det på att övriga studier tycks ha fått bättre resultat än vad vi fick? Till att börja med har upplägg och frågeställning skiljt sig en del mellan de olika undersökningarna, så att göra direkta jämförelser är svårt. En viktig aspekt är att vi i denna studie har analyserat en rad olika cancerformer i samma test, medan övriga undersökningar fokuserat på en specifik cancerdiagnos. Det är sannolikt lättare och ger mindre risk för felkällor att träna upp hundar att känna igen en viss typ av cancer än att lära dem hitta en generell lukt för tumörsjukdom. Provmaterialet spelar kanske också roll för hundarnas förmåga att identifiera sjukdom. Vävnadsprov, utandningsluft och urin utsöndrar sannolikt mer intensiva lukter än ett serumprov. Därför är det möjligt att det innebär en större utmaning att träna hundar på just blodprover jämfört med andra material. I studien av Willis et al. (2004) lyckades hundarna genom att lukta på urinprover detektera urinvägscancer i 41 % av fallen, jämfört med 14 % som kunde förväntas av enbart slumpen. Detta såg författarna som ett bevis på att det går att träna upp hundar att lukta sig till urinvägscancer i urinprov. Resultaten från den studien liknar till stor del de resultat som vi fick fastän våra hundar letade cancersjukdom generellt och vi använde oss av blodprover istället för urin.

Så om hundar kan lukta sig till cancer i blodprover och om vi med deras hjälp hittar en gemensam biomarkör som vi kan börja analysera för att ställa en diagnos – hur tidigt i sjukdomsförloppet kan det vara möjligt att fånga upp dem? Enligt Hori & Gambhir (2011) kan en tumör hos människa växa i 10.1 år och bli 20.44 mm³ stor innan den kan upptäckas med befintlig blodanalys. Huruvida dessa siffror kan extrapoleras till tumörer hos hundar är inte klarlagt, men sannolikt. Målet måste således vara att ta fram en ny analysmetod som kan fånga upp sjukdomen tidigare. Williams & Pembroke (1989) rapporterade om en hund som frekvent nosat på ett av ägarens födelsemärken och till och med försökt bita över detta. Det maligna melanom som upptäcktes var 1.86 mm tjockt, och efter avlägsnande av detta har kvinnan varit frisk utan återfall, vilket då bör innebära att ingen spridning hade hunnit ske. Därmed finns möjligheten att en tumör börjar vara detekterbar för en hundnos redan i tidigt skede. Huruvida biomarkörsutsöndringen till blodet är tillräcklig i detta tidiga skede återstår dock att ta reda på. Enligt Johnston et al. (2014) är utspädningen av ämnen i blodet ett problem även för de bästa befintliga analysmetoderna, men möjligheten finns att en hundnos kan detektera lägre nivåer av en aktuell biomarkör än vad övriga analyser klarar av. Vidare föreslår Johnston et al. (2014) användandet av cirkulerande antikroppar i blodet, så kallad immunosignatur, för att förstärka biomarkörsignalen och möjliggöra tidigare cancerdiagnos via blodanalys. Deras studie berörde specifikt lymfom, men författarna slår också fast att de flesta typer av cancer genererar ett cellulärt och humoralt immunsvaret varför man kan anta att det är möjligt att analysera immunosignaturen även hos andra cancerformer.

Så hur ser hundens roll ut inom framtida cancerdiagnostik? Kanske främst som ett potentiellt hjälpmedel på väg mot att hitta ett nytt analysverktyg, snarare än som ett analysverktyg i sig själva. Även om man skulle lyckas designa en analysmetod för tidig detektion av cancer i blodprov skulle det sannolikt krävas vidare diagnostik, för att utreda lokalisering, stadie etc. Huvudsyftet med forskningen är kanske inte att hitta en metod som kan ersätta befintlig

diagnostik, utan snarare att hitta något som kan möjliggöra *tidigare* diagnos och därmed ge bättre behandlingsresultat och prognos. Ett serologiskt test är kostnadseffektivt, i stort sett riskfritt och minimalt invasivt. Det skulle även kunna underlätta rutinkontroller och uppföljning av cancerpatienter.

De blindtest som är underlag för resultaten i denna studie har enligt hundtränarna varit lärorika och man har tack vare dem börjat tänka i nya banor. Redan nu finns planer på hur man ska gå tillväga för att finslipa och förbättra upplägget av hundträning och tester inför vidare studier.

KONKLUSION

Den slutsats vi kan dra i och med våra testresultat är att hundar kan tränas upp för att lukta sig till cancer i blodprover i större utsträckning än vad man kan förvänta sig av slumpen. I den här pilotstudien fick vi en träffsäkerhet på 46 % av den grupp på 6 sökhundar som deltog. Denna andel skulle antagligen kunna förbättras genom modifiering av studiedesign och träningsupplägg och för detta behövs kunskap, tid och inte minst ekonomiska medel, vilket i dagsläget är en av de stora utmaningarna.

TACK

Henrik Rönnerberg för idé, uppstart och hjälp under arbetets gång, samt för tillhandahållande av tumörprover till studien.

Björnar och Lena Sörli – Team Hundnosen – för ert fina arbete med hundträning och genomförande av blindtester.

Alla sökhundar och hundförare som medverkat/medverkar i projekt Cancersök. Ett särskilt stort tack till Akita, Tindra, Sniff, Keo, Saga och Ice samt deras duktiga hundförare.

Alla hundar som donerade blod som normalkontroller, och alla hundägare som lät dem delta i studien.

Inger Lilliehöök och övriga medarbetare på Klinisk kemiska laboratoriet för blodprovsanalyserna från våra normalkontroller.

Matilda Backström, Tove Hultman och Maria Lyberg för hjälp med blodprovstagningen.

REFERENSER

- Arrieta, O., Cacho, B., Morales-Espinosa, D., Ruelas-Villavicencio, A., Flores-Estrada, D. & Hernández-Pedro, N. (2007). The progressive elevation of alpha fetoprotein for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *BMC Cancer*, 7:28.
- Bijland, L. R., Bomers, M. K. & Smulders, Y. M. (2013). Smelling the diagnosis a review on the use of scent in diagnosing disease. *The Netherlands Journal of Medicine*, 71(6):300-307.
- Bjartell, A. S. (2011). Dogs Sniffing Urine: A Future Diagnostic Tool or a Way to Identify New Prostate Cancer Markers? *European Urology*, 59:202-203.
- Cornu, J-N., Cancel-Tassin, G., Ondet, V., Girardet, C. & Cussenot, O. (2011). Olfactory Detection of Prostate Cancer by Dogs Sniffing Urine: A Step Forward in Early Diagnosis. *European Urology*, 59:197-201.

- Dalziel, D. J., Uthman, B. M., McGorray, S. P. & Reep, R. L. (2003). Seizure-alert dogs: a review and preliminary study. *Seizure*, 12:115-120.
- Elliker, K. R., Sommerville, B. A., Broom, D. M., Neal, D. E., Armstrong, S. & Williams, H. C. (2014). Key considerations for the experimental training and evaluation of cancer odour detection dogs: lessons learnt from a double-blind, controlled trial of prostate cancer detection. *BMC Urology*, 14:22.
- Fischer-Tenhagen, C., Tenhagen, B. A. & Heuwieser, W. (2013). Ability of dogs to detect cows in estrus from sniffing saliva samples. *Journal of Dairy Science*, 96:1081-1084.
- Hardin, D. S., Anderson, W. & Cattet, J. (2015). Dogs Can Be Successfully Trained to Alert to Hypoglycemia Samples from Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Therapy*, DOI 10.1007/s13300-015-0135-x. [2015-11-18]
- Hori, S. S. & Gambhir, S. S. (2011). Mathematical Model Identifies Blood Biomarker-Based Early Cancer Detection Strategies and Limitations. *Sci Transl Med.*, 3(109).
- Horvath, G., af Klinteberg Järverud, G., Järverud, S. & Horvath, I. (2008). Human Ovarian Carcinomas Detected by Specific Odor. *Integrative Cancer Therapies*, 7(2):76-80.
- Horvath, G., Andersson, H. & Paulsson, G. (2010). Characteristic odour in the blood reveals ovarian carcinoma. *BMC Cancer*, 10:643.
- Horvath, G., Andersson, H. & Nemes, S. (2013). Cancer odor in the blood of ovarian cancer patients: a retrospective study of detection by dogs during treatment, 3 and 6 months afterward. *BMC Cancer*, 13:396.
- Johnston, S. A., Thamm, D. H. & Barten Legutki, J. (2014). The immunosignature of canine lymphoma: characterization and diagnostic application. *BMC Cancer*, 14:657.
- Khalid, T., White, P., De Lacy Costello, B., Persad, R., Ewen, R., Johnson, E., Probert, C. S. & Ratcliffe, N. (2013). A Pilot Study Combining a GC-Sensor Device with a Statistical Model for the Identification of Bladder Cancer from Urine Headspace. *PLoS ONE*, 8(7): e69602.
- Kusano, M., Mendez, E. & Furton, K. G. (2013). Comparison of the Volatile Organic Compounds from Different Biological Specimens for Profiling Potential. *Journal of Forensic Sciences*, 58(1):29-40.
- Lippi, G. & Cervellin, G. (2011). Canine olfactory detection of cancer versus laboratory testing: myth or opportunity? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011:49(10).
- McCulloch, M., Jezierski, T., Broffman, M., Hubbard, A., Turner, K. & Janecki, T. (2006). Diagnostic Accuracy of Canine Scent Detection in Early- and Late-Stage Lung and Breast Cancers. *Integrative Cancer Therapies*, 5(1):30-39.
- Moser, E. & McCulloch, M. (2010). Canine scent detection of human cancers: A review of methods and accuracy. *Journal of Veterinary Behavior*, 5:145-152.
- Moyer, V. A. (2012). Screening for Prostate Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Annals of Internal Medicine*, 157:120-134.
- Nossov, V., Amneus, M., Su, F., Lang, J., Tran Janco, J. M., Reddy, S. T. & Farias-Eisner, R. (2008). The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, September 2008:215-223.
- Pickel, D., Manucy, G. P., Walker, D. B., Hall, S. B. & Walker, J. C. (2004). Evidence for canine olfactory detection of melanoma. *Applied Animal Behaviour Science*, 89:107-116.

- Quignon, P., Rimbault, M., Robin, S. & Galibert, F. (2012). Genetics of canine olfaction and receptor diversity. *Mammalian Genome*, 23:132-143.
- Rowell, J. L., McCarthy, D. O. & Alvarez, C. E. (2011). Dog Models of Naturally Occuring Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 17(7):380-388.
- Shuster, G., Gallimidi, Z., Heyman Reiss, A., Dovgolevsky, E., Billan, S., Abdah-Bortnyak, R., Kuten, A., Engel, A., Shiban, A., Tisch, U. & Haick, H. (2011). Classification of breast cancer precursors through exhaled breath. *Breast Cancer Research and Treatment*, 126:791-796.
- Williams, H. & Pembroke, A. (1989). Sniffer dogs in the melanoma clinic? *The Lancet Oncology*, 1:734.
- Willis, C. M., Church, S. M., Guest, C. M., Cook, A. W., McCarthy, N., Bransbury, A. J., Church, M. R. T. & Church, J. C. T. (2004). Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. *British Medical Journal*, 329.

APPENDIX 1

Remiss till Klinkemlab HENRÖN

KOD: FO-

Projekt: Hälsokontroll hund

Ansvarig: Henrik Rönnberg,

Henrik.Ronnberg@slu.se, ankn 1363, Mobil:

ID: Ras:
Född år:

Kön: Kastrerad tik, kastred hane, intakt tik, intakt hane, suprelorinbeh Vikt:kg

Var i löpcykeln: När åt hunden senast:
.....timmar sedan

Annan information:

.....
.....

Provtagningsdatum: Kl:

EDTA-blod gärna 1ml, serum ca 4ml blod (el 1,5ml serum), citrat 3,8ml för PT/APTT/D-dimer, om TEG skall analyseras - ring då innan provet tas 1623. Citratprovet skall ej tas först, fyll exakt till markering på röret. Släng citratröret om problem vid provtagningen.

Information till lab:

- Kemi o hematologianalyserna beställs i Labmaster under beställarkod: FO-HENRÖN
- Remissen kopieras och följer med respektive rör. Provsvar till Henrik på mailen
- Om EDTA-röret kommer till Advia inom 1 timme kör provet och lämna det sedan direkt till Immulite för analys av ACTH (ingen LM-beställning). Kylförvaras!
- Sparylappar på serum/citrat. Serum/plasma delas helst i två små frysbara rör (-70)

S-ALAT, Albumin, ALP, CRP, Gallsyror, Glukos, Kalcium, Kalium, Kreatinin, Protein. Serum delas i två små frysbara rör (-70) och ställs i låda i vita frysen märkt FO-HENRÖN 2015.

HEMA + CDDIFF + BTPK. Advia-resultaten godkänns om de ser ok ut (streck på röd blodbild) – annars manuell diff. Inga utstryk behövs om Advia-resultat godkänns, men spara plottar i pärm vid Advia. **Om SPARA-lapp** på EDTA-röret, spara röret till blodbanken (hela eller cellpelleten). EDTA-röret kommer till Advia inom 1 timme kör provet och lämna det sedan direkt till Immulite för analys av ACTH. Kylförvaras!

Citratrör (beställs ej i LM). Kör TEG om prov inom ½timme. Märk med HENRÖN + labnumret och sätt kurvan i pärm (refv) i överskåp. Kör om möjligt APTT, PT och D-dimer, spara citratplasma i 1-2 rör i frysen vid Advia, låda märkt FO-HENRÖN 2015. Finns speciellt protokoll för resultat i pärm i överskåpet.

IL 150401

APPENDIX 2

Provtagning datum	Kodnr	Tumör/Normal	Ras	Kön	Född
19-feb	/	N	Golden retriever	Tik	2007
19-feb	/	N	Golden retriever	Tik	2013
19-feb	/	N	Vit herdehund	Tik	2011
19-feb + 04-jun	4R	N	Collie, långhårig	Hane	2011
05-mar	/	N	Blandras	Hane(kastr)	2012
05-mar	/	N	Boxer	Hane(kastr)	2011
05-mar	/	N	Boxer	Hane	2012
05-mar	/	N	Blandras	Hane	2007
05-mar	4H	N	Golden retriever	Tik	2013
05-mar	1A	T	Labrador retriever	Hane(kastr)	2008
05-mar	1F	T	Briard	Hane	2008
05-mar	1B	T	Dvärgpudel	Tik	2003
05-mar	1G	T	Cairnterrier	Tik (kastr)	2004
19-mar	1E	N	Labrador retriever	Hane	2012
19-mar	1J	N	Schäfer	Hane	2009
19-mar	1C	N	Golden retriever	Hane	2009
19-mar	1H	T	Schäfer	Tik	2004
19-mar	1I	T	Drever	Hane	2007
19-mar	1D	T	Glen of imaal terrier	Tik	2001
27-mar	3P	T	Bichon havanais	Tik	2010
16-apr	1Z	N	Flat coated retriever	Hane	2013
16-apr	1X	N	Labrador retriever	Tik	2012
16-apr	1Y	N	Blandras	Hane	2010
16-apr	1V	N	Labrador retriever	Hane	2013
23-apr	4U	N	Golden retriever	Hane	2012
28-apr	2C	N	Jack russel terrier	Hane	2014
28-apr	2D	N	Blandras	Hane(kastr)	2011
28-apr	2E	N	Blandras	Hane(kastr)	2007
28-apr	2F	N	Tollare	Hane	2014
28-apr	2G	N	Pointer	Hane(kastr)	2003
28-apr	2H	N	Welsh springer spaniel	Hane	2006
28-apr	2I	N	Cocker spaniel	Tik (kastr)	2014
29-apr	2A	N	Schäfer	Hane	2007
29-apr	2B	N	Golden retriever	Hane	2008
29-apr	2J	N	Jämthund	Hane	2007
29-apr	2K	N	Blandras	Tik (kastr)	2004

04-maj	3N	N	Riesenschnauzer	Tik (kastr)	2013
04-maj	3L	N	Blandras	Hane	2010
04-maj	3F	N	Flat coated retriever	Hane	2013
04-maj	3I	N	Tollare	Tik	2012
04-maj	3G	N	Breton	Tik	2006
04-maj	3M	N	Jämthund	Tik	2014
04-maj	3O	N	Perro de Agua Español	Hane	2013
04-maj	3H	N	Blandras	Hane(kastr)	2002
04-maj	3K	N	Jack russel terrier	Hane	2014
04-maj	3E	N	Dvärgpinscher	Tik	2013
05-maj	3D	N	Tollare	Hane	2013
05-maj	3A	N	Australian sheperd	Hane	2011
05-maj	1K	N	Border collie	Tik	2007
05-maj	1L	N	Border collie	Tik	2009
05-maj	1M	N	Border collie	Hane	2012
05-maj	1N	N	Labrador retriever	Tik (kastr)	2002
05-maj	1P	N	Border collie	Hane	2013
05-maj	1S	N	Border collie	Tik (kastr)	2002
05-maj	1T	N	Border collie	Hane	2008
05-maj	2N	N	Border collie	Tik	2014
05-maj	2O	N	Border collie	Tik	2009
05-maj	2P	N	Border collie	Tik	2010
05-maj	2Q	N	Border collie	Tik	2007
05-maj	2R	N	Labrador retriever	Hane(kastr)	2008
05-maj	2U	N	Border collie	Hane(kastr)	2008
05-maj	2V	N	Bostonterrier	Tik	2014
05-maj	2X	N	Border collie	Tik	2010
05-maj	2Z	N	Border collie	Hane	2014
06-maj	3U	N	Rhodesian ridgeback	Tik	2010
06-maj	4C	N	Rhodesian ridgeback	Tik	2006
06-maj	4B	N	Finsk lapphund	Hane	2012
06-maj	4E	N	Tysk spets	Hane	2010
06-maj	4D	N	Bearded collie	Hane	2009
06-maj	3X	N	Border collie	Hane(kastr)	2008
06-maj	3R	N	Border collie	Tik	2006
06-maj	3V	N	Border collie	Tik	2012
06-maj	3Q	N	Kooikerhondje	Hane	2011
06-maj	/	N	Mellanpudel	Tik	2007
06-maj	3S	N	Flat coated retriever	Tik	2009

06-maj	3T	N	Golden retriever	Tik	2014
06-maj	4A	N	Blandras	Tik	2011
06-maj	3Z	N	Blandras	Hane(kastr)	2010
07-maj	4K	N	Blandras	Hane	2011
07-maj	4I	N	Blandras	Tik (kastr)	2008
07-maj	4M	N	Schäfer	Hane	2012
07-maj	1U	T	Staffordshire bullterrier	Tik	2004
07-maj	1R	T	Dobermann	Hane	2006
07-maj	2L	T	Blandras	Hane(kastr)	2009
07-maj	4O	N	Irländsk terrier	Hane	2009
07-maj	4J	N	Golden retriever	Tik	2009
07-maj	4G	N	Blandras	Hane	2011
07-maj	4L	N	Shetland sheepdog	Hane	2013
21-maj	4S	N	Berner sennen	Tik	2012
21-maj	4T	N	Boxer	Tik	2012
21-maj	4A	T	Blandras	Tik	2007
21-maj	3B	T	Rottweiler	Hane	2008
04-jun	2M	T	Dvärgschnauzer	Tik (kastr)	
04-jun	2S	T	Eng springer spaniel	Tik	
05-jun	2T	T	Riesenschnauzer	Tik	