

## **SLUTRAPPORT: TIDIG DRÄKTIGHET OCH HERPESVIRUSINFEKTION HOS HUND – IMMUNOLOGI OCH DIAGNOSTIK (PROJEKT BITCH), JULI 2013**

### **Forskargrupp:**

Docent Bodil Ström Holst, Inst kliniska vetenskaper, SLU

Professor Eva Axné, Inst kliniska vetenskaper, SLU

Professor Anders Johannisson, Inst anatomi, fysiologi och biokemi, SLU

Docent Inger Lilliehöök, Klinisk-kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset, SLU

AgrD Malin Hagberg Gustavsson, Inst kliniska vetenskaper, SLU

### **Studiens mål:**

1. Utarbeta en metod för att studera immunologiska förändringar, aktivering av vita blodkroppar, med så lite manipulation av blodkropparna som möjligt
2. Studera om immunologiska parametrar (kapacitet hos fagocyterande celler) skiljer sig under olika delar av löpningscykelns progesteronfas
3. Studera om infektion med hundens herpesvirus påverkas av dräktighet, och om dräktighetsresultatet påverkas av infektionen
4. Utvärdera olika akutfasproteiner för att se om de skulle kunna lämpa sig för tidig dräktighetsdiagnostik (1-2 veckor efter parning vid optimal tidpunkt).
5. Studera hundens vita blodbild och eventuell aktivering av de vita blodkropparna under dräktighet

### *I tillägg:*

6. Studera hormonella förändringar under dräktighet hos hund
7. Med hjälp av proteomics undersöka alternativa dräktighetsmarkörer hos hund

### **Resultat**

(En lista över publikationer i projektet listas i slutet av dokumentet).

#### Mål 1.

Särskilt om man ska studera fysiologiska immunologiska förändringar, där förändringarna kan antas vara förhållandevis små, så är en minimerad påverkan på de vita blodkropparna en fördel. När man hanterar vita blodkroppar så påverkas deras uttryck av adhesionsfaktorer, och det kan påverka resultaten. I en första studie användes en metod där de vita blodkropparna analyserades med hjälp v flödescytometri utan att de röda blodkropparna lyserades först, och utan att provet tvättades med tex centrifugering. Vidare undersöktes om provet kunde fixeras och lagras för analys vid ett senare tillfälle. Metoden "No-lyse, no-wash" fungerade bra för att analysera hundens vita blodkroppar. Om det gick att lagra proverna eller inte berodde på vad man skulle studera, och måste därför undersökas för varje antikropp för sig. Resultaten från studien är publicerade (1).

#### Mål 2.

Löpningscykeln påverkar tikarna på många sätt, och hos tik är den fas under vilken tiken påverkas av dräktighetshormonet progesteron lika lång hos icke-dräktiga som hos dräktiga tikar. En studie utfördes genom utökade undersökningar på kontrolltikarna i projektet, för att se om tikarnas immunförsvar påverkas under den relativt långa period som de har förhöjda progesteronnivåer. Detta är av intresse eftersom vissa sjukdomar, till exempel pyometra, ofta debuterar under denna period. I studien sågs att de fagocyterande cellernas

aktivitet var lägre under den senare delen av progesteronfasen, och att en lägre andel av dem visade "oxidativ burst" (frisättning av "reactive oxygen species", ROS, tex väteperoxid), en del av fagocyteringsprocessen, då till exempel *E.coli*-bakterier oskadliggörs. Det är därför inte otroligt att dessa förändringar bidrar till att tikar oftare utvecklar pyometra under den senare delen av progesteronfasen. Studiens resultat är presenterade som en rapport på en kongress i smådjursreproduktion (EVSSAR: European Veterinary Society of Small Animal Reproduction) (4) och i en vetenskaplig publikation (2).

### Mål 3.

Hundens herpesvirus är idag spritt i den svenska hundpopulationen, och de allra flesta hundarna har antikroppar mot viruset, och har alltså stött på infektionen. Herpesviruset är sådant till sin natur att det lägger sig vilande i hunden om den en gång infekterats. Syftet med den här studien var att undersöka om hundar som är infekterade med herpesvirus, och är kliniskt friska men troligen har virus vilande i kroppen, påverkas under dräktigheten; om viruset aktiveras under dräktigheten och om dräktighetsresultatet påverkas. Alla tikar som inkluderades hade antikroppar mot hundens herpesvirus. Högre antikroppstitrar var inte associerade med mindre kullar, och det fanns inget särskilt mönster vad gäller antikroppstitrar under dräktigheten och inte heller under den icke-dräktiga progesteronfasen. Ingen av tikarna utsöndrade herpesvirus som kunde påvisas i vagina. En vilande herpesvirusinfektion verkade därför inte ha någon negativ påverkan på dräktigheten hos dessa privatägda tikar som hölls i förhållandevis stressfria miljöer. Resultaten är publicerade i en artikel (3) och ett kongressabstract (5).

### Mål 4 och 5

Det finns önskemål från flera håll att kunna ställa en tidigare dräktighetsdiagnos på hund. Det vore värdefullt forskningsmässigt, vid utredning av reproduktionsstörningar och för att uppfödaren bättre ska kunna planera sin verksamhet. I studien följdes ett antal tikar under dräktigheten. Blodprover analyserades avseende akutfasproteiner, och de vita blodkropparna studerades avseende antal och aktiveringsgrad. De vita blodkropparna ökade i antal under dräktigheten, men inte hos icke-dräktiga tikar under progesteronfasen. I denna studie följdes tikarna mycket noggrant i förhållande till dagen för ägglossning. Trots detta var mönstret avseende förändringar i akutfasproteiner för varierande för att kunna användas som dräktighetsdiagnostik, enligt de preliminära bearbetningar som gjorts. Resultaten avseende de vita blodkropparna är publicerade i ett kongressabstract (6), och tillsammans med akutfasproteinerna är de också i ett manuskript under utarbetande (8).

### Mål 6.

Hormonella förändringar hos hund är intressanta ur diagnostisk synvinkel, och för att hormonella förändringar kan påverka andra funktioner hos hunden, till exempel de immunologiska. I samarbete med SciLife Lab i Uppsala och med ARUP Institute for Clinical & Experimental Pathology i Salt Lake City, USA, har en förhållandevis ny metod för att analysera steroidhormoner använts: vätskekromatografi kombinerat med tandem masspektrometri (LC-MS/MS). Med denna metod kan en hel panel av steroider analyseras från en begränsad mängd serum. Vi har analyserat serum med denna metod, och fått ny information om hormonella förändringar under tidig dräktighet. Resultaten är i manuskriptform (9). Ett hormon som är av ökat intresse inom reproduktionsforskningen är IGF-I (insulin-like growth hormone I). Detta har vi analyserat, och sett variationer under

progesteronfasen, men preliminära resultat ger vid handen att det inte skiljer sig mellan dräktiga och icke-dräktiga tikar. Resultaten presenteras i sommar på en EVSSAR-kongress (7). Ett annat hormon som fått ett kraftigt ökat intresse inom human reproduktion och även inom veterinärmedicinsk reproduktion är AMH (anti-Müllerian hormone). Analyser planeras även av detta hormon under hösten 2013.

#### Mål 7.

Eftersom det diagnostiska värdet av akutfasproteinerna (mål 4) tycks begränsat, så har vi planer på att använda proteomics för att analysera ett antal prover och se om någon annan markör kan användas för tidig dräktighetsdiagnostik. Inledande kontakter och diskussioner har tagits med Sci Life Lab, men inga analyser är utförda.

#### Sammanfattning

I projekt BITCH har immunologiska förändringar och effekten av hundens herpesvirus studerats hos tikar under dräktighet och under motsvarande period i löpningscykeln hos icke-dräktiga tikar. En metod har utvecklats för att studera de vita blodkropparna med minsta möjliga manipulation. Den har använts för att studera de vita blodkropparna under dräktighet, och då sågs bland annat en signifikant ökning av antalet vita blodkroppar hos dräktiga tikar. Funktionen hos de vita blodkropparna var sämre under den senare delen av progesteronfasen hos icke-dräktiga tikar, och det är också den tid då flest tikar utvecklar pyometra. Hundens herpesvirus är spritt i hundpopulationen. Viruset aktiveras inte av dräktigheten hos tikar som hålls i en lugn miljö. Vi såg ingen koppling mellan antikropps nivåer och dräktighetsresultat. Studier rörande hormonella förändringar under dräktigheten på hund pågår.

#### **Ekonomi:**

Forskningsmedel har erhållits för 3 år: 275 tkr, 300 tkr och 240 tkr, totalt 815 tkr. Projektet blev uppdelat på två konton. På det ena kontot blev det 4 kr kvar, det andra kontot gick 2 885 kr back. Totalt har kostnader motsvarande 2881 kr finansierats med andra medel.

Den ekonomiska uppföljningen bilägges (Bilaga 1).

Uppsala, 2012-07-01



Bodil Ström Holst

#### **Spridning av forskningsresultaten:**

##### Föreläsningar för avnämare:

Bodil Ström Holst har föreläst om parning, dräktighet och hundens herpesvirus vid ett antal tillfällen, och med olika huvudarrangörer:

- Svenska schäferklubben, oktober 2009
- Uppsala läns kennelklubb, november 2009
- Husdjurshälsan i Göteborg, februari 2011

## Lista över publikationer inom projektet

### Artiklar i granskade internationella tidskrifter:

(1) *Expression of four canine leukocyte adhesion factors in fresh and stored whole blood samples using a no-lyse, no-wash method*, B Ström Holst, M Hagberg, I Lilliehöök, A Johannisson. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 139, 271-276.

(2) *Leukocyte phagocytosis during the luteal phase in bitches*. Ström Holst B, Hagberg Gustavsson M, Lilliehöök I, Morrison D, Johannisson A. *Vet Immunol Immunopathol* 2013, 153, 77-82.

(3) *Canine herpesvirus during pregnancy and non-pregnant luteal phase*. Ström Holst B, Hagberg Gustavsson M, Grapperon-Mathis M, Lilliehöök I, Johannisson A, Isaksson M, Lindhe A, Axné E. *Repro Dom Anim* 2012, Suppl 6, 362-365.

### Kongressrapporter:

(4) *Leukocyte phagocytosis during early and late luteal phase in bitches*, Ström Holst B, Hagberg M, Lilliehöök I, Johannisson A. 7<sup>th</sup> EVSSAR Congress, Louvain-La-Neuve, Belgium, 14-15 May 2010.

(5) *Canine herpesvirus during pregnancy and non-pregnant luteal phase*. Ström Holst B, Gustavsson MH, Lilliehöök I, Johannisson A, Axné E. 7<sup>th</sup> ISCFR symposium on canine and feline reproduction, Whistler, Canada, July 26-29, 2012. Muntlig presentation.

(6) *Leukocyte changes in the pregnant bitch*, Ström Holst B, Gustavsson M, Lilliehöök I, Axné E, Johannisson A. *Am J Reprod Immunol* 2011, 66, p 113 (S14).

(7) *IGF-I levels during canine pregnancy and in non-pregnant luteal phase*. B. Ström Holst, E. Strage, R. Hagman, M. Hagberg Gustavsson and E. Axné. 16<sup>th</sup> EVSSAR Congress, Toulouse, France, 5-6 July 2013.

### Manuskript:

(8) *Acute phase proteins and leukocyte changes in the pregnant bitch*. Ström Holst B, Hillström A, Gustavsson M, Johannisson A, Axné E, Lilliehöök I.

(9) *Concentrations of endogenous steroids in blood of early pregnant and non-pregnant bitches during luteal phase of the reproductive cycle*. Ström Holst B, Kushnir M, Bergquist J.

# Projektuppföljning (kr)

Agresso  
Anv: 715MBM  
Best.nr: 28658  
01/07/2013

Projekt 17085\*

|  | Utfall          | Utfall        | Summa           | Budget   |
|--|-----------------|---------------|-----------------|----------|
|  | Tidigare år     | 201300-201306 |                 |          |
| Bidragsintäkter                        | 515 000         | 0             | 515 000         | 0        |
| Övriga intäkter                        | 344             | 0             | 344             | 0        |
| <b>SUMMA INTÄKTER</b>                  | <b>515 344</b>  | <b>0</b>      | <b>515 344</b>  | <b>0</b> |
| Traktamenten och bilersättningar       | -940            | -1 057        | -1 997          | 0        |
| Övr personalkostnader                  | -7 403          | 0             | -7 403          | 0        |
| Köpta tjänster                         | -232 204        | 0             | -232 204        | 0        |
| Driftkostnader                         | -248 736        | -318          | -249 054        | 0        |
| Resor                                  | -26 060         | -1 510        | -27 570         | 0        |
| <b>SUMMA KOSTNADER</b>                 | <b>-515 344</b> | <b>-2 885</b> | <b>-518 229</b> | <b>0</b> |
| <b>Resultat exkl semesterkostnader</b> | <b>0</b>        | <b>-2 885</b> | <b>-2 885</b>   | <b>0</b> |
| <b>Resultat inkl semesterkostnader</b> | <b>0</b>        | <b>-2 885</b> | <b>-2 885</b>   | <b>0</b> |
| Oförbrukade bidrag/uppdrag             |                 | 0             | 0               |          |
| Kontraktfordringar                     |                 | 0             | 0               |          |
| Kapital                                |                 | 0             | 0               |          |
| Årets utfall                           |                 | -2 885        | -2 885          |          |
| Totalk att disponera                   |                 | -2 885        | -2 885          |          |

# Projektuppföljning (kr)

Agresso  
Anv: 715MBM  
Best.nr: 28659  
01/07/2013

Projekt 17763\*

|  | Utfall          |               | Summa           | Budget   |
|--|-----------------|---------------|-----------------|----------|
|  | Tidigare år     | 201300-201306 |                 |          |
| Bidragsintäkter                        | 299 996         | 0             | 299 996         | 0        |
| <b>SUMMA INTÄKTER</b>                  | <b>299 996</b>  | <b>0</b>      | <b>299 996</b>  | <b>0</b> |
| Köpta tjänster                         | -297 840        | 0             | -297 840        | 0        |
| Driftkostnader                         | -2 156          | 0             | -2 156          | 0        |
| <b>SUMMA KOSTNADER</b>                 | <b>-299 996</b> | <b>0</b>      | <b>-299 996</b> | <b>0</b> |
| <b>Resultat exkl semesterkostnader</b> | <b>0</b>        | <b>0</b>      | <b>0</b>        | <b>0</b> |
| <b>Resultat inkl semesterkostnader</b> | <b>0</b>        | <b>0</b>      | <b>0</b>        | <b>0</b> |
| Oförbrukade bidrag/uppdrag             |                 | 4             |                 |          |
| Kontraktfordringar                     |                 | 0             |                 |          |
| Kapital                                |                 | 0             |                 |          |
| Arets utfall                           |                 | 0             |                 |          |
| <b>Totalt att disponera</b>            |                 | <b>4</b>      |                 |          |

I denna rapport är tecknen omvända, dvs minustecken = kostnad, negativ intäkt, underskott