



Norges veterinærhøgskole

Bruk av C-reaktivt protein og senkningsreaksjon i klinisk diagnostikk hos hund.

C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate as diagnostic tools in canine veterinary practice.

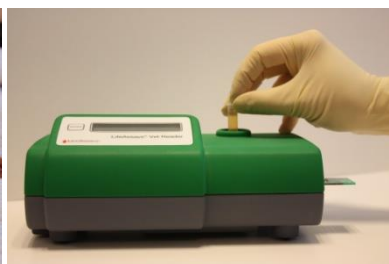
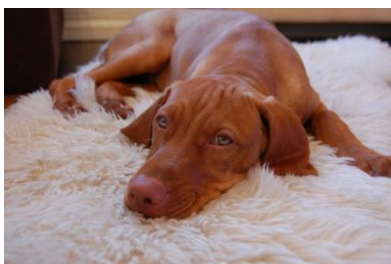
Monica Jørgensen, Stine Jevnehagen Moe
Kull 2006

Fordypningsoppgave
Smådyrmedisin

Veileder Anita Haug Haaland

Institutt for sports- og familiedyrmedisin
Seksjon for smådyrsykdommer

Oslo, november 2011



Innholdsfortegnelse

Forord.....	4
Sammendrag.....	5
Innledning.....	6
Materiale og metoder.....	9
Materiale.....	9
Studiepopulasjon.....	9
Prøvetaking og analyse.....	10
Metode.....	10
Pasientnær analyse av C-reaktivt protein.....	10
Analyse av C-reaktivt protein ved et referanselaboratorium.....	11
Sekningsreaksjon.....	12
Andre generelle sykdomsparametere.....	13
Statistiske metoder.....	13
Resultater.....	14
C-reaktivt protein.....	14
Senkningsreaksjon.....	19
Andre uspesifikke sykdomsparametere.....	21
Sammenlikning av to metoder for bestemmelse av CRP- konsentrasjonen i blod.....	22
Diskusjon.....	24
C-reaktivt protein.....	24
CRP som et diagnostisk hjelpemiddel.....	24

Inflammasjon og infeksjonssykdommer.....	26
Neoplastiske lidelser.....	29
Sykdommer som ikke påvirker CRP-konsentrasjonen...29	
CRP til monitorering av sykdom og behandling.....	30
Sammenlikning av to metoder for bestemmelse av CRP-	
-konsentrasjonen i blod.....	31
Senkningsreaksjon.....	33
Sammenlikning av CRP og andre generelle sykdomsparametere.....	35
Konklusjon.....	39
Takk til bidragsytere.....	40
Summary.....	41
Referanser.....	43
Vedlegg.....	47
1. Klinisk undersøkesskjema.....	48
2. Eierskjema.....	49
3. Medforfattererklæring.....	50

Forord

Bakgrunnen for vårt valg av emne til fordypningsoppgaven, var vår store interesse for smådyrmedisin. Å tolke uspesifikke sykdomsparametre er viktig innen klinisk diagnostikk. I denne oppgaven vil vi legge størst vekt på de uspesifikke sykdomsparametrene C-reaktivt protein (CRP) i blod og senkningsreaksjon (senkning). Senkningsreaksjonen har vært brukt som en generell sykdomsparameter i mange år, mens analyse av CRP er relativt nytt i veterinærmedisinen. Siden begge testene er basert på en akutfaserespons, er det spennende å undersøke likheter og forskjeller mellom dem, samt hvordan testenes forskjellige egenskaper påvirker tolkning av resultatene i klinisk praksis.

Da vi begynte dette arbeidet hadde vi et ønske om at fordypningsoppgaven skulle gi en mulighet til både praktisk arbeid, og fordypning innen en problemstilling som har nytteverdi for andre smådyrpraktikere. Videre ønsket vi et innblikk i hvordan en forskningsstudie blir gjennomført. Vi har derfor planlagt og utført en pilotstudie der vi ser på sammenhengen mellom fire forskjellige uspesifikke sykdomsparametre hos klinisk friske og syke dyr, samt sammenliknet CRP-konsentrasjoner i blod som er analysert med to forskjellige metoder. Disse resultatene blir presentert og diskutert i sammenheng med tidligere publiserte resultater. Vi håper denne oppgaven kan være til nytte for andre smådyrpraktiserende veterinærer.

Sammendrag

Tittel: Bruk av C-reaktivt protein og senkningsreaksjon i klinisk diagnostikk hos hund.

Forfattere: Monica Jørgensen og Stine Jevnehagen Moe

Veileder: Anita Haug Haaland, Institutt for sports- og familiedyrmedisin, Seksjon for smådyrsykdommer.

Oppgaven tar utgangspunkt i en todelt pilotstudie utarbeidet og gjennomført av forfatterne. I første ledd av studien ble C-reaktivt protein (CRP) og senkningsreaksjon (senkning) studert, samt nøytrofile granulocytter og rektal temperatur, hos friske og syke hunder som var pasienter ved Smådyrklubben på Norges Veterinærhøgskole. Målet med studien var å studere sammenhengen mellom uspesifikke sykdomsparametere, med spesiell vekt på CRP og senkning. Resultatene ble brukt som utgangspunkt for en litteraturstudie, om bruk av CRP og senkning på hund. I den andre delen av studien ble det sammenlignet CRP-målinger i blod utført på en pasientnær maskin (LifeAssays ®Vet Reader) med målinger analysert ved Sentrallaboratoriet.

Våre resultater viste at CRP generelt sett er en bedre sykdomsparameter til å detektere inflammasjonstilstander hos hund, enn senkningsreaksjon, antallet leukocytter, antallet nøytrofile granulocytter og rektal temperatur. Til tross for at vår studiepopulasjon er liten, samsvarer funn fra vårt materiale i stor grad med resultater som tidligere er publisert, i henhold til CRP-konsentrasjon og sykdomstilstander. CRP-analyse til bruk på hund har tidligere vært lite tilgjengelig for klinikere. Tilbudet har nylig blitt bedre da man i tillegg til å sende inn prøver til referanselaboratorium (Sentrallaboratoriet fra 2009), også kan ta i bruk en nylig markedsført pasientnær analysemaskin (LifeAssays ®Vet Reader) til bruk på hund. CRP viser seg å være et nyttig diagnostisk verktøy, som i større grad bør tas i bruk i klinisk diagnostikk.

Innledning

Inflammasjonsprosessen er en uspesifikk respons som settes i gang av multiple inflammatoriske stimuli, deriblant traume, introduksjon av fremmede stoffer eller overreaksjon på kroppsegne stoffer (1). Prosessene ved en inflammasjon er kompliserte, og det er mange faktorer som avgjør hvordan forløpet utarter seg, og hvilke celler og signalstoffer som inngår. I tillegg til de lokale kardinalsymptomene *tumor, rubor, calor, dolor* og *functio laesa*, kan det også ses en systemisk respons på inflammasjonen (1,2,3). Denne systemiske responsen er i hovedsak mediert av de makrofag-deriverte cytokinene interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1) og tumor nekrose faktor alfa (TNF- α) (1, 4). I løpet av timer vil cytokinene føre til forøket syntese og sekresjon av akutfase proteiner (AFP) (1,2,4).

Akutfaseproteinene (AFP) produseres i hovedsak av hepatocytter i leveren, men en viss produksjon kan finne sted i ekstrahepatisk vev som jurkjertelvev, lungevev, tarmvev, fettvev, nyrevev, leukocytter, endometrieceller, chondro- og synoviocytter i ledd (4,5). De kan deles i to hovedgrupper, positive AFP og negative AFP, basert på om de får en konsentrasjonsøkning eller -nedgang i blodet ved en akutfaserespons (4,6). Positive akutfaseproteiner kan videre graderes etter grad og hastighet på respons til henholdsvis sterke, intermediære og svake AFP (3). De positive AFP inkluderer blant annet C-reaktivt protein (CRP), serum amyloid A (SAA), haptoglobulin, alfa-1-antitrypsin og fibrinogen. Blant de negative har vi albumin, alfa-lipoprotein og transferrin (4,3). Sub-klassifiseringen av AFP varierer hos forskjellige dyrearter (5,7,8).

Fibrinogen har vært og er, mye brukt indirekte som generell inflammasjonsindikator hos hund og katt. Fibrinogenet påvirker erytrocyttenes evne til rouleux- og erytrocyttklumpedannelse, og påvirker dermed erytrocyttenes evne til å sedimentere (eller synke, derav tilnavnet senkning) (9). Da fibrinogen er et intermediært AFP vil det ta dager før fibrinogennivåene er

høye nok til å påvirke senkningsreaksjonen (3). Videre tar det dager til uker før nivåene normaliserer seg igjen etter at inflammasjonen eller traumet er helet (5). På grunnlag av fibrinogenets egenskaper anses senkningsreaksjonen som en test med lav sensitivitet og lav spesifisitet.

CRP er et sterkt og positivt akutfaseprotein hos hund, som i hovedsak blir syntetisert i lever etter IL-6 stimulering (2,4,8). CRP-konsentrasjonen i blod øker kraftig i løpet av få timer og når maksimal konsentrasjon på omkring 24 timer (2,10,11). Etter opphør av inflammatorisk stimuli faller CRP-konsentrasjonen fort (4). Dette har gjort at CRP-målinger anses som en god "real-time" indikator på inflammasjon, og kan brukes som redskap for vurdering av prognose og behandlingsrespons (2). I humanmedisinen har CRP i mange år i stor grad overtatt for senkningen som en generell sykdomsparameter. Selv om hundens CRP ble identifisert og karakterisert for over 15 år siden, og det finnes mange publikasjoner på metoder som i forskningsøyemed ble brukt til å måle CRP-nivåer i hundeblood, er det likevel først de siste årene at det har blitt utviklet metoder som er kalibrerte og validerte til kommersiell bruk på hund. I Norden har man validert en human analyse til bruk på hund, som nå anses som en "gullstandard" (3,5). Sentrallaboratoriet begynte å tilby denne analysen i 2009 (12). I 2010 kom også den første pasientnære CRP analyse maskinen til bruk på hund på markedet.

I tillegg til å stimulere produksjonen av akutfaseproteinene, setter cytokinene også i gang andre systemiske responser. IL-1 stimulerer benmargen til økt frigjøring av nøytrofile granulocytter til sirkulasjonen, og hemmer sult-senteret i hjernen. IL-1, IL-6 og TNF- α stimulerer nedbrytning av skjelettmuskulatur. Videre påvirker de hjernen både til å frigjøre søvninduserende molekyler, samt påvirker hjernens termoregulerende senter til å øke

kroppens termostatiske ”set-point”. Disse forandringene gir nøytrofil og kliniske symptomer som nedsatt appetitt, slapphet og feber (1,2).

I denne oppgaven presenterer vi resultatene fra en pilot studie der målet vårt var å studere CRP konsentrasjoner i blod og senkningen hos syke hunder som var pasienter ved Norges Veterinærhøgskole. Vi diskuterer forskjellene ved bruk og tolkning av de to metodene, samt mer kortfattet forholdet til andre uspesifikke sykdomsparametere som rektaltemperatur og nøytrofile granulocytter. Videre ønsker vi å sammenlikne resultater fra to CRP-analyse metoder til bruk på hund, som er tilgjengelige for norske veterinærer i dag.

Materiale og metoder

Materiale

Studiepopulasjon

Blodprøver fra pasienter ved Smådyrklubben på NVH i perioden 20.01.2011-22.06.2011 ble inkludert i denne studien. Hundene ble delt inn i henholdsvis gruppen frisk og syk. Hunder ble karakterisert som friske dersom de oppfylte følgende kriterier; årsak til konsultasjon var vaksinasjon, måling av rabiestiter etter vaksinasjon eller kloklipp. I tillegg måtte eier oppfatte hunden som allment frisk og hunden måtte være fri fra anmerkninger ved en generell klinisk undersøkelse basert på informasjon i et klinisk undersøkesskjema (vedlegg 1). Klinisk undersøkelse ble i hovedsak utført av forfatterne, men ved noen få anledninger ble de utført av fast ansatt dyrepleier ved poliklinisk rutineklinikk. Eier måtte også signere et godkjenningsskjema for deltagelse i studien (vedlegg 2). Hunder ble karakterisert som syke dersom klinikkveterinæren, som et ledd i sin diagnostiske utredning, tok blodprøver for enten å sette opp en senkning eller måle CRP- konsentrasjon i blodet.

På grunnlag av retrospektiv gjennomgang av samtlige sykehistorier (inkludert de fra friske hunder) ble pasientene fordelt på fem sykdomskategorier; 0 = friske hunder, 1 = hunder med inflammasjon (forøket CRP, uten at bakterier er påvist ved mikroskopi eller dyrkning fra kroppsekret eller vevsvæsker), 2 = hunder med infeksjon (bakterier påvist ved mikroskopi eller dyrkning fra kroppsekret eller vevsvæsker), 3 = hunder med neoplasi (påvist ved cytologi eller histologi fra biopsi), 4 = hunder med andre sykdommer (identifisert ved kliniske symptomer på sykdom, diagnostiske tester og/eller akutfase respons). Av hensyn til faktorer som eventuelt kan interagere eller konfundere, ble hunder under 3 måneders alder, drektige tisper, postoperative pasienter, hunder med usikker eller multiple diagnoser ekskludert fra studien, uansett gruppetilhørighet.

Prøvetaking og analyse

Dersom mulig ble det ble foretatt 3 analyser av samtlige pasienter; analyse av CRP-konsentrasjonen i blod målt med henholdsvis en pasientnær metode (LifeAssays® Vet Reader) og Sentrallaboratoriets metode, samt senkningsreaksjon. På prøvetakingstidspunktet ble det samlet inn minst ett EDTA fullblodrør og ett fullblodrør for serumframstilling. EDTA fullblodrøret ble vendt gjentatte ganger umiddelbart etter uttak. Senkningsanalysen ble satt opp så fort som mulig, men innen 2 timer, på klinikklaboratoriet på Smådyrklubben. Fullblodrøret ble vendt grundig også før oppsett, og hvis det hadde stått slik at sedimentasjon kunne ha inntrådt, ble det satt i en vippe i 10-15 minutter før oppsett. Dersom det ble samlet inn to fullblodglass, ble det ene sendt direkte til klinikklaboratoriet for serumframstilling og CRP-analyse, mens det andre ble sendt til Sentrallaboratoriet for serumframstilling og analyse. Serum ble framstilt etter henstand på benken i romtemperatur i minimum en halv time og maksimalt to timer, før det ble sentrifugert med 3000 omdreininger/min i 10 minutter. Serumet ble trukket opp i en pipette og overført til en ny beholder. Dersom det ikke var mulig å samle to fullblodglass, ble serumet framstilt på klinikklaboratoriet og analysert for CRP-konsentrasjon der med en gang, for så å bli videresendt til Sentrallaboratoriet for CRP-analyse.

Metode

Pasientnær analyse av C-reaktivt protein

CRP-konsentrasjonen ble målt i serum ved hjelp av LifeAssays® Vet Reader, etter produsentens instruksjoner. Metoden baserer seg på et magnetisk permeabilitetsbasert assay, hvor hundens egne antistoffer er brukt. Før hver analyse ble reagenset inkubert i romtemperatur i minimum 15 minutter. Serumet fra pasienten ble trukket opp i en pipette og overført i et lite kapillær-rør (5 µl), som ble tilsatt i reagensglasset. Dette ble umiddelbart

ristet ved bruk av vortex-maskinen, og samtidig vending av glasset i 30 sekunder, for å løse opp bunnfall. Deretter ble reagensglasset plassert i analysemaskinen, hvor det etter inkubering i 660 sekund, automatisk ble gjennomført fem målinger av bunnfallet ved gjennomlysning. Analysemaskinen oppga verdier mellom <math><10\text{mg/L}</math> til $>210\text{mg/L}$. For verdier som ble registrert som <math><10\text{ mg/L}</math> ble 5 mg/L (medianverdien av 0-10mg/L), brukt som verdi i de statistiske analysene. Maskinen ble kalibrert med et medfølgende hundeserum en gang per testkit, hvert testkit bestod av 20 reagens. Etter 41 testede blodprøver ble instruksene endret av produsent. Endringen innebar bruk av vortex-maskinen også før tilsetning av kapillær-røret med hundens serum, dette ble gjort for å minimalisere eventuelle preanalytiske faktorer som kunne påvirke resultatet ved for dårlig blanding av materialet. Øvre referanseverdi var 20 mg/L (13).

Figur 1. Figuren illustrerer bruken av LifeAssays® Vet Reader til målinger av CRP konsentrasjoner i serum.



Analyse av C-reaktivt protein ved et referanselaboratorium

Serum sendt til Sentrallaboratoriet, ble analysert ved bruk av en human turbidometrisk immunoassay, kalibrert og validert for bruk på hundeserum (14). Verdier ble oppgitt fra 0,0 til 100,0 mg/L. Ved konsentrasjoner over 100 mg/L, ble prøver fortynnet 1:5, og analysert på nytt (Muntlig meddelelse Torill Kylling, Sentrallaboratoriet). Øvre referanseverdi var 15 mg/L (12).

Senkningsreaksjon

For å måle senkningsreaksjonen ble det brukt en modifisert Westergrens metode med EDTA som antikoagulans, som brukes og undervises i, ved Norges Veterinærhøgskole (muntlig meddelelse Anita Haug Haaland, NVH). Det ble brukt Originalt Standard DISPETTE senkningsutstyr. Blod ble overført ved hjelp av en pipette, til reservoir-plastbeholderen og et Dispette-senkningrør senket forsiktig ned i beholderen, slik at blodsøylen kom på nivå med 0 mm målemerket. Røret var merket med en skala fra 0 til 150 mm. Røret og plastbeholderen ble satt vinkelrett i forhold til en rett benkeplate i et standard senkningsstativ (15). Senkningen ble avlest i mm/t etter 1, 2 og 24 timer. Referanseverdier var 0-5 mm. Da senkningsreaksjonen i stor grad er påvirket av blodets hematokrit (HCT), ble alle senkningsreaksjoner kontrollert i forhold til HCT ved bruk av en korreksjonstabell for hund, utarbeidet for bruk av Wintrobe senkningsmetode (figur 2).

Figur 2: Tabellen blir brukt ved korrigering av senkning (ESR) i forhold til hematokrit (HCT). Tabellen er beregnet til bruk av Wintrobe senkningsmetode, til bruk på hundeblood (16).

Table 2-6. Relative Anticipated Erythrocyte Sedimentation Rate of Canine Blood in mm in 1 Hour for PCV value from 9 to 50

PCV	ESR	PCV	ESR	PCV	ESR
9	82	23	40	37	13
10	79	24	38	38	12
11	76	25	36	39	11
12	73	26	34	40	10
13	70	27	32	41	9
14	67	28	30	42	8
15	64	29	28	43	7
16	61	30	26	44	6
17	58	31	24	45	5
18	55	32	22	46	4
19	52	33	20	47	3
20	49	34	18	48	2
21	46	35	16	49	1
22	43	36	14	50	0

Examples: (a) PCV 43, observed ESR 45, anticipated ESR 7 (from the table): Corrected ESR $45 - 7 = +38$.

(b) PCV 24, observed ESR 16, anticipated ESR 38 (from the table): Corrected ESR $16 - 38 = -22$.

Andre generelle sykdomsparametere

Da sykehistoriene til de syke hundene ble gjennomgått retrospektivt for å samle data om diagnose, ble også antall nøytrofile granulocytter, rektal temperatur og hematokrit registrert i datasettet. Referanseverdiene var: nøytrofile granulocytter $3,6-13 \times 10^9/L$, rektal temperatur $37,5-39^{\circ}C$ og hematokrit (HCT) 0,35-0,55 (12).

Statistiske metoder

Statistiske analyser ble utført ved bruk av JMP software, versjon 9. Beskrivende statistikk ble utført ved rutineundersøkelser av datasettet. Det ble utført en Shapiro-Wilks test for normalitet på studievariablene. Forskjellene mellom CRP-konsentrasjoner, senkningsreaksjon, antall nøytrofile granulocytter og rektal temperatur i de forskjellige sykdomskategoriene ble illustrert ved hjelp av box-plot. Verken CRP eller senkning viste seg å være normalfordelte parametere, og heller ikke konvensjonell log-konvertering gav normalfordelte data. De ikke-parametriske testene Kruskal-Wallis/Wilcoxon-tester ble derfor utført for å bestemme om det var en statistisk signifikant forskjellig mellom CRP-konsentrasjoner og senkningsreaksjoner mellom sykdomskategoriene. En P-verdi under 0,05 ble ansett som statistisk signifikant. Sammenhengen mellom CRP og henholdsvis senkningsreaksjon, antall leukocytter, antall nøytrofile granulocytter og rektal temperatur ble derfor illustrert ved hjelp av standard XY-plot med regresjonslinje. Et Bland-Altman difference plot ble brukt for å illustrere et eventuelt samsvar mellom måleverdiene fra de to CRP-målingsmetodene (17).

Resultater

Det ble samlet inn 97 blodprøver fra pasienter ved Smådyrklubben på Norges Veterinærhøgskole. Etter eksklusjon av pasienter med usikker diagnose, multiple diagnoser eller pasienter under behandling, gjenstod blod fra 70 pasienter som alle hadde som minimum målt CRP-konsentrasjon med LifeAssays® Vet Reader. Av disse 70 ble 26 pasienter kategorisert som friske i henhold til kriteriene satt for studien, mens 44 ble kategorisert som syke pasienter. Videre sub-gruppering av syke gav 10 hunder med inflammatoriske lidelser, 15 hunder med infeksiøse lidelser, 5 hunder med neoplastiske lidelser og 14 hunder med andre sykdommer som ble identifisert ved kliniske symptomer, diagnostiske tester og/eller akuttfase respons, men som ikke med sikkerhet kunne grupperes i øvrige sykdomskategorier. Pasientene bestod av et vidt spekter av forskjellige hunderaser i alderen fra 4 måneder til 13 år. Ingen av kjønnene var overrepresentert. Det ble ikke observert store forskjeller i pasientsammensetningen i de forskjellige sykdomskategoriene.

C-reaktivt protein

CRP-konsentrasjonen i blod ble analysert hos 70 av hundene. Alle pasientene kategorisert som frisk (n=26), med unntak av en, hadde CRP-konsentrasjoner innenfor metodens referanseverdier (tabell 1). Denne ene hunden hadde en CRP-konsentrasjon på 21 mg/L (referanseverdi <20 mg/L). Hunden hadde også en senkning på 8 mm etter 24 timer, mens avlesingene ved henholdsvis 1 time og 2 timer lå innenfor referansenivået. Eier oppfattet hunden som frisk, det var ingen anmerkninger på klinisk undersøkelse. Sentrallaboratoriets CRP-analyse viste 0 mg/L.

Hos de syke pasientene (n= 44) ble det observert forøket CRP hos 25 av hundene (tabell 1).

Tabell 1 viser oversikt over median av og spredning i CRP-konsentrasjoner hos hunder, kategorisert som frisk eller syk.

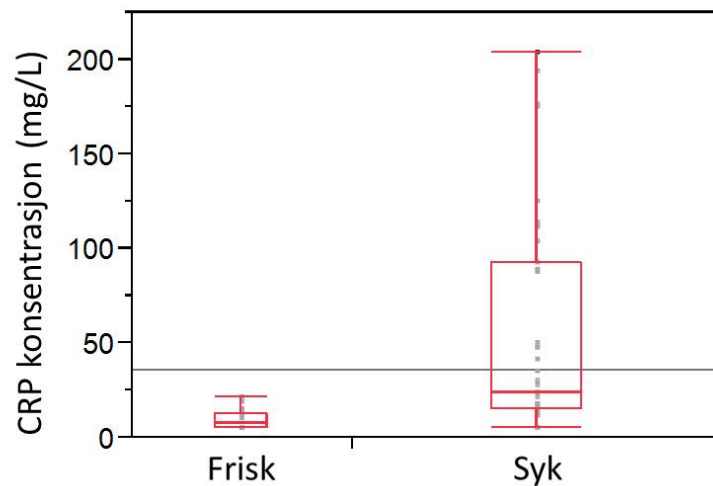
Tabell 1: Tabellen beskriver sentralmål og spredningsmål for CRP-konsentrasjonene målt med henholdsvis LifeAssays® Vet Reader og Sentrallaboratoriets metode fordelt på sykdomskategorier. LifeAssays® Vet Reader måler ikke absoluttverdier når konsentrasjonen kommer <10 mg/L, for verdier som ble registrert som <10 mg/L ble 5 mg/L (medianverdien av 0-10mg/L) brukt som verdi i de statistiske analysene

Sykdomskategorier	<u>CRP LifeAssays® Vet Reader</u>	<u>CRP Sentrallaboratoriet</u>
<i>Frisk</i> (n=26/21) *		
Antall CRP+	1	0
Median (mg/L)	7,5	0,5
Intervall (mg/L)	(5-21)	(0,0-14,0)
<i>Syk</i> (n=44/29)*		
Antall CRP +	25	25
Median (mg/L)	24	47,8
Intervall (mg/L)	(5-204)	(0-236,2)
<i>Inflammasjon</i> (n=10/8)*		
Antall CRP +	5	5
Median (mg/L)	20	27,8
Intervall (mg/L)	(5-112)	(0-191,5)
<i>Infeksjon</i> (n= 15/11)*		
Antall CRP +	10	7
Median (mg/L)	41	63,9
Intervall (mg/L)	(5-204)	(1,3-267,7)
<i>Neoplasi</i> (n=5/2)*		
Antall CRP +	4	2
Median (mg/L)	104	78,8
Intervall (mg/L)	(12-194)	(62,5-95)
<i>Andre</i> (n= 14/8)*		
Antall CRP +	5	3
Median (mg/L)	17	7,1
Intervall (mg/L)	(5-89)	(0-168,8)

*n=antall testet med CRP LifeAssay® VetReader/ antall testet med Sentrallaboratoriets metode.

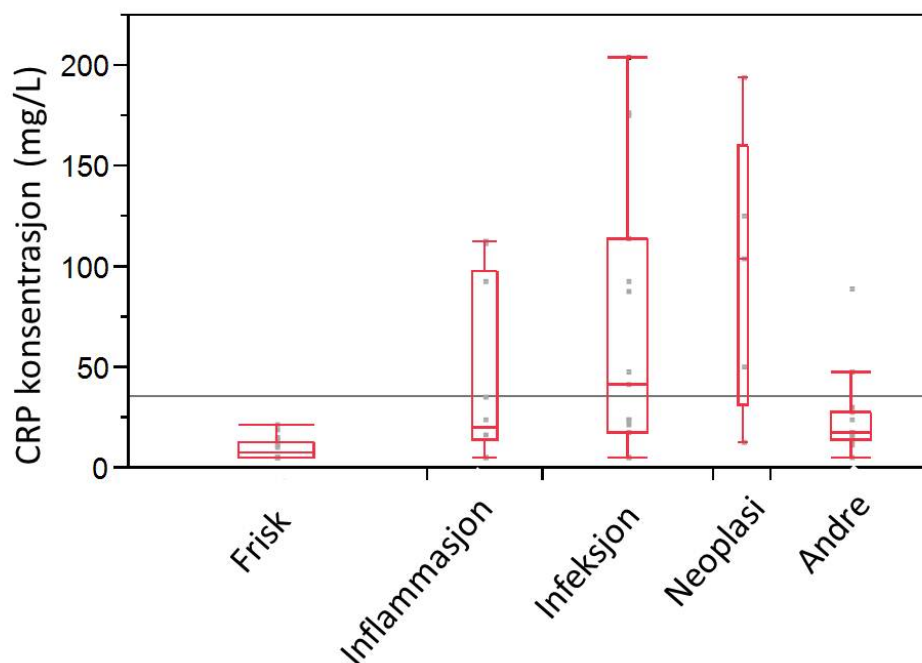
De tilsynelatende forskjellene i CRP-konsentrasjoner mellom *syke* og *friske* hunder (figur 3) ble bekreftet ved statistiske analyser ($P=0,001$ (LifeAssays® Vet Reader), $P = 0,004$ (Sentrallaboratoriet)).

Figur 3. Box-plot som illustrerer forskjeller i CRP-konsentrasjoner mellom friske og syke dyr.



Etter allokering av hundene i kategorier ble det funnet lavest CRP-konsentrasjoner hos *friske* hunder. Av sykdomskategoriene ble det funnet høyeste median konsentrasjoner hos hunder med neoplasi, deretter hunder med infeksjon, så hunder med inflammasjon og lavest blant sykdomskategoriene var hundene i samlekategoriene andre sykdommer (Figur 4). Alle sykdomskategoriene viste målinger med svært stor spredning i konsentrasjon av CRP (tabell 1). Det ble funnet statistisk signifikant forskjell i CRP-verdier mellom sykdomskategoriene ($P=0,0001$ (LifeAssays® Vet Reader), $P = 0,0004$ (Sentrallaboratoriet)).

Figur 4. Box-plot som illustrerer forskjeller i CRP-konsentrasjoner mellom sykdomskategoriene.

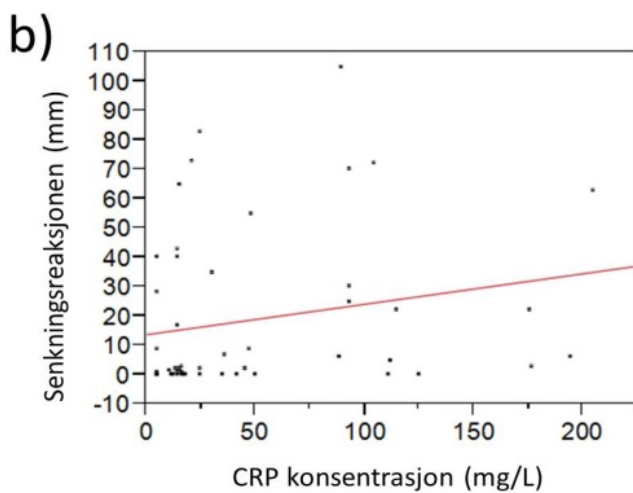
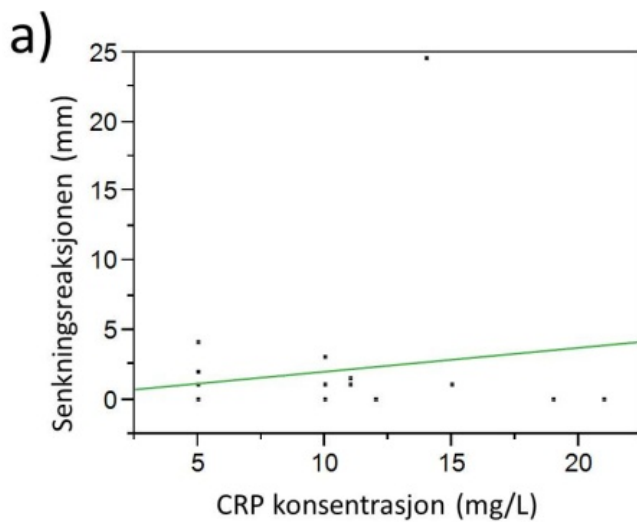


Det var tilsynelatende ingen systematiske forskjeller i resultatene etter endring av instruksjonene for bruk av LifeAssays® Vet Reader, men materialet var for lite for statistiske analyser.

Hos friske hunder ble alle unntatt en pasient funnet å ha normal senkning (figur 5 a). Denne hunden ble ansett som frisk av eier, var uten anmerkninger ved klinisk undersøkelse og hadde CRP-konsentrasjoner på 14 mg/L og 0,7 mg/L, målt med henholdsvis LifeAssays® Vet Reader og Sentrallaboratoriets metode, og hadde en senkning på 24,5 mm etter 2 timer. En telefonsamtale med eier avslørte at hunden hadde hatt hoste med nedsatt allmenntilstand noen uker forut for besøket. Hunden var behandlet med antibiotika og hadde respondert godt på behandlingen.

Av CRP positive hunder hadde 12 også forøket senkning. Det var tilsynelatende liten sammenheng mellom CRP-konsentrasjoner og grad av senkning (figur 5 b).

Figur 5: Plottet viser a) det er et tilsynelatende samsvar mellom pasienter som er negative på senkning og de som er negative på CRP, samt b) den svake graden av korrelasjon mellom CRP-konsentrasjon og grad av senkning hos syke hunder ved Smådyrklubben ved Norges Veterinærhøgskole.

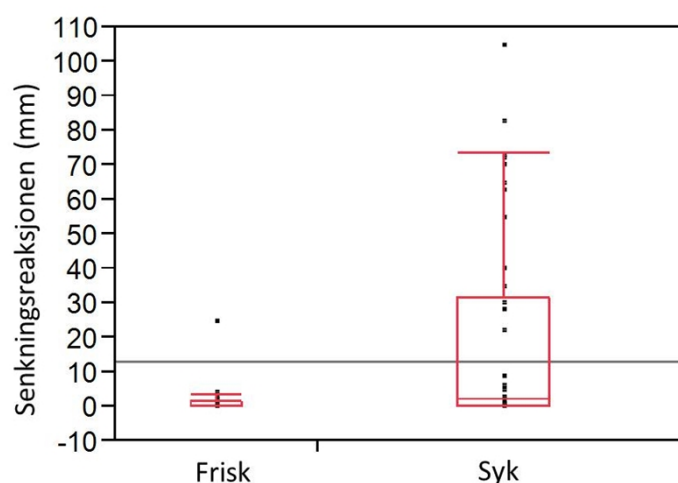


Senkningsreaksjon

Senkningsreaksjonen ble analysert hos 65 av hundene. Alle pasientene kategorisert som frisk (n=23), med unntak av en, hadde normal senkningsreaksjon (< 5mm) på avlesning etter 1 og 2 timer (tabell 2). Denne ene hunden hadde en senkningsreaksjon på 7 mm etter 1 time og 24,5 mm etter 2 timer (se ytterligere beskrivelse over i avsnittet over CRP). Kun 10 av de 23 prøvene fra friske hunder satt opp til senkningsreaksjon, ble avlest etter 24 timer. Av disse hadde to marginalt forhøyede senkningsverdier (henholdsvis 7 mm og 8 mm).

Hos de syke pasientene (n= 43) ble det observert forøket senkningsreaksjon hos 14 av pasientene etter 1 time (tabell 2). Etter 2 timer ble det observert senkning hos ytterligere tre pasienter (n=17). Det ble funnet statistisk signifikante forskjeller mellom grad av senkningsreaksjon mellom friske og syke pasienter ved senkningsavlesning etter 1 og 2 timers avlesning (henholdsvis P = 0,015 og P = 0,048) (Figur 6).

Figur 6: Box-plot som illustrerer fordelingen av grad av senkning etter 2 timer hos henholdsvis friske og syke hunder.



Kun 31 av de 43 prøvene ble avlest også etter 24 timer (tabell 2). Av disse ble det påvist forøket senkningsreaksjon hos 7 nye pasienter. Senkningsgraden varierte fra 9-55mm. Disse pasientene hadde følgende diagnoser: regional lymfocyttær hyperplasi, follikulær gastritt, lymfoplasmacytær rhinitt, hemorrhagisk traume i ryggmarg, discospondylitt og gastroenteritt. Den tilsynelatende forskjellen mellom frisk og syk gruppe etter 24 timers avlesning ble ikke funnet statistisk signifikant.

Tabell 2: Oversikt over senkning hos friske og syke hunder etter henholdsvis 1, 2 og 24 timer.

Sykdomskategorier	<u>Senkning 1 time</u>	<u>Senkning 2 timer</u>	<u>Senkning 24 timer</u>
<i>Frisk</i> (n = 23/23/10)*			
SR positive pasienter	0	1	2
median (mm)	0	1	4,5
intervall (mm)	(0-7)	(0-24,5)	(0-8)
<i>Syk</i> (n= 43/43/31)*			
SR positive pasienter	14	17	11
median (mm)	1	2	11
intervall (mm)	(0-62,5)	(0-105)	(0-129)

*n=antall tester avlest etter 1 time/2 timer /24 timer

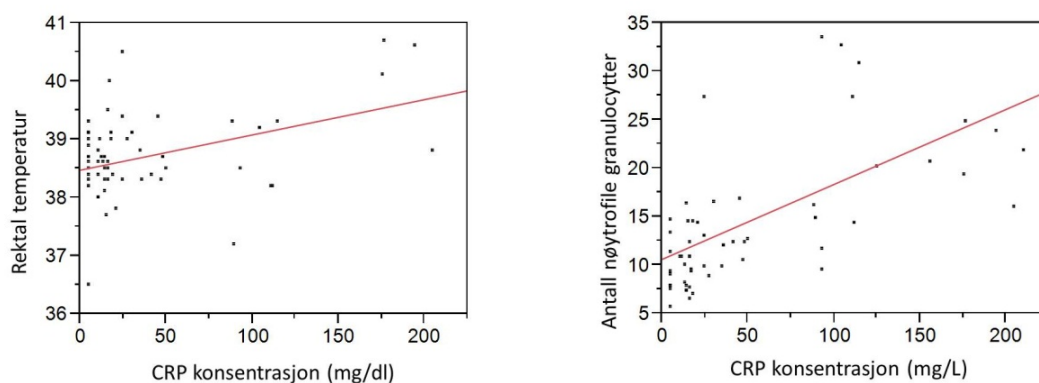
Av pasienter som hadde forøket senkningsreaksjon etter 1 time og/eller 2 timer (n=16) hadde 12 pasienter også forøket CRP-konsentrasjon i blodet (CRP > 20 mg/L i henhold til LifeAssays® Vet Readers resultater). De fire pasientene med forøket senkningsreaksjon, men normal CRP-konsentrasjon i blodet, var diagnostisert med hypothyroidisme, cystitt, degenerativ radiculomyopati, og en pasient var klassifisert som frisk (se beskrivelse av kasus i teksten over). Ingen sammenheng mellom CRP-konsentrasjon og grad av senkning ble funnet i den grafiske framstillingen av forholdet mellom de to variablene i syk gruppe (figur 5).

Andre uspesifikke sykdomsparametere

Rektal temperatur ble målt på 16 av de friske hundene. Gjennomsnittstemperaturen var 38,3 C, med en variasjon fra 36,5-39,1 C (En hund hadde 39,1 C). Blant syke hunder (n = 33) var gjennomsnittstemperaturen 38,9°C, med en spredning i gruppen fra 37,2 – 40,7°C. Det var signifikant forskjell i rektal temperatur mellom friske og syke hunder (P = 0,02). Av syke hunder med forøket CRP-konsentrasjon i blodet (n = 26) hadde 9 hunder feber (>39°C). Blant CRP negative hunder i syk-gruppe ble det funnet rektal temperatur > 39°C hos 3 av hundene. De hadde henholdsvis 39,1 °C, 39,3 °C og 40,0 °C. Figur 7 viser tilsynelatende fravær av korrelasjon mellom rektal temperatur og CRP-konsentrasjon.

Som følge av kostnader utover prosjektbudsjettet ble det ikke foretatt differensialtelling av leukocytene hos friske hunder. Av de syke hundene hadde samtlige med nøytrofilie (n= 10) også forøket CRP-konsentrasjon. Det er tilsynelatende sammenhengen mellom konsentrasjon av CRP og grad av nøytrofilie, men det er også mange avvik fra denne trenden.

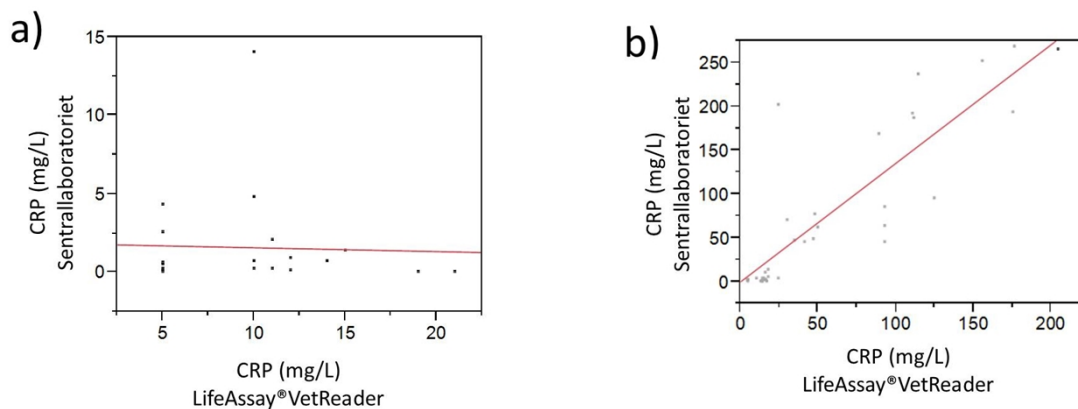
Figur 7: Figuren viser sammenheng mellom CRP-konsentrasjon og henholdsvis rektal temperatur og antall nøytrofile granulocytter i blodet hos syke hunder.



Sammenlikning av to metoder for bestemmelse av CRP-konsentrasjonen i blod

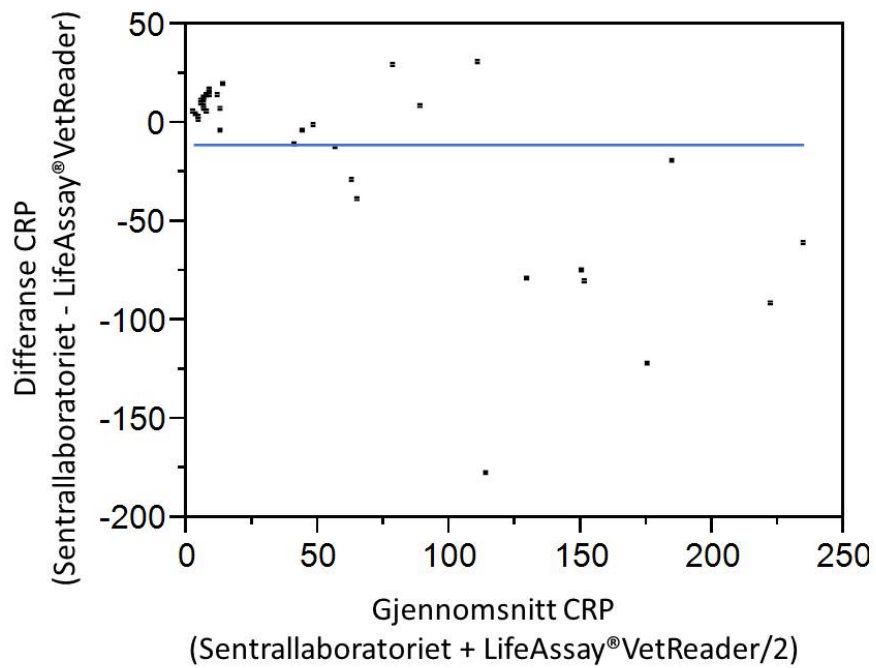
Ved deskriptiv sammenlikning av CRP-resultater fra Sentrallaboratoriet og LifeAssays® Vet Reader ved hjelp av XY-plot med beste tilpassede regresjonsline, ser man at samtlige målinger, med unntak av en verdi målt med LifeAssays® Vet Reader, ligger innen for testenes respektive referanseområder. Det er en tendens til større spredning av konsentrasjonene i normalfeltet ved målinger foretatt med LifeAssays® Vet Reader sammenlignet med målinger fra Sentrallaboratoriet. Hos Syke dyr viser regresjonslinjen en tendens til samsvar mellom nivåer av målinger mellom de to metodene, men det er mange avvikende enkelt målinger med stor forskjell i konsentrasjon mellom de to metodene (Figur 8).

Figur 8. Figuren viser sammenhengen mellom CRP-konsentrasjoner målt på samme prøve/prøve tatt på samme prøvetakingstidspunkt, og målt med to forskjellige metoder. a) viser friske pasienter, b) viser syke pasienter.



Sentrallaboratoriets analyser viser oftere høyere konsentrasjoner enn LifeAssays® Vet Reader. Det var 8 prøver som hadde >50 mg/L i forskjell på målingene. Den største differansen var på 178 mg/L (se Figur 9).

Figur 9: Bland Altman difference plotet illustrer forskjellen i CRP-konsentrasjonen målt med to forskjellige metoder. Forskjellen er størst ved høye konsentrasjoner og Sentrallaboratoriet viser gjerne de høyeste målingene



Diskusjon

I vår pilotstudie undersøkte vi bruken av en pasientnær CRP-analysemasking og analyserte resultatene ved bruk av denne opp mot et referanselaboratorium, og senkningsresultater ved bruk av en modifisert Westergrens metode for senkning. I denne delen av oppgaven vil vi diskutere våre resultater, og tolkningen av metodene. Videre vil vi kort diskutere bruken av disse i forhold til noen andre uspesifikke sykdomsparametere (rektal temperatur og nøytrofile granulocytter). Vi vil også diskutere sammenlikningen av resultatene fra de to metodene som måler CRP.

C-reaktivt protein

Hunder har normalt en lav konsentrasjon av CRP i blodet (10,18). Ved stimuli fra proinflammatoriske mediatorer, vil hepatocytene starte produksjon av CRP. Etter en kort ”lag-phase” på rundt 4 timer (10,18) observeres en konsentrasjonsøkning (18), til maksimal konsentrasjon nås innen 24 timer (10,11). LifeAssays Clinical guide oppgir at maksimal konsentrasjon kommer innen 24-48 timer (13). Sterke akutfaseproteiner, som CRP, kan få en konsentrasjonsøkning på 10-100 ganger grunn-nivået (10). Andre akutfaseproteiner kan ha mild eller moderat konsentrasjonsøkning eller nedgang i konsentrasjon (3,4). Disse blir kalt henholdsvis svake, intermediære og negative akutfaseproteiner (4). Halveringstiden til CRP hos hund er ikke fastslått (4), men det er påvist en rask normalisering etter at inflammasjonsprosessen er avsluttet (5,10,11,19).

CRP som et diagnostisk hjelpemiddel

CRP hos hund regnes som en god sykdomsindikator for inflammatoriske tilstander av flere grunner. For det første baserer CRP-analyser seg på en direkte måling av selve

akutfaseproteinet. En annen årsak til at CRP er en god generell sykdomsindikator er dens kinetiske egenskaper (2). Siden CRP-konsentrasjonen normalt er svært lav hos friske hunder, øker hurtig og kraftig som følge av inflammatorisk stimuli, for så å avta raskt etter opphør av inflammatorisk stimuli, anses CRP å ha egenskaper som gjør at den kan regnes som ekte ”real-time” markør på inflammatorisk aktivitet (3,4,20). Dette gjør CRP svært anvendbar for vurdering av utvikling ved patologiske tilstander og postoperative komplikasjoner.

For det tredje øker CRP-konsentrasjonen i blodet i all hovedsak som følge av *de-novo*-syntese i hepatocytter, som er påvirket av den proinflammatoriske mediatoren IL-6 (2,8). Det er ikke observert noen faste mønstre når det gjelder CRP-konsentrasjonen i forhold til tid på døgnet, fra dag til dag eller variasjoner i normalnivå hos en frisk hund over tid (4). Verken kjønn (21), tispas brunst status(22) eller fedme (20) har vist seg å ha signifikant innvirkning på konsentrasjonen. Det er heller ikke funnet påvirkning av CRP-konsentrasjonen etter antiinflammatorisk og immunmodulerende behandling, som med ikke-steroid antiinflammatorisk medikament(NSAIDs) og glukokortikoider (23,24,25,26,27).

Av faktorer som kan ha betydning for CRP-konsentrasjonen nevnes alder, drektighet og endestadiums leverlidelse (4,22,28). Når det gjelder CRP og drektighet er det noe sprikende resultater fra studiene som er gjort på dette feltet. Noen har funnet at man får forøkte CRP-konsentrasjoner ved implantasjon, placental vekst og de hormonelle forandringene man ser under drektighet (22). Siden det er mye usikkerhet rundt dette, har vi valgt å utelukke drektige tisper som en del av vårt materiale. CRP-respons, som har blitt observert hos valper under 3 måneder, er mild (28), og denne aldersgruppen er derfor ekskludert fra vårt studium. Siden CRP i all hovedsak produseres av hepatocytter, vil en hund med leversvikt kunne ha lavere CRP-konsentrasjon ved en inflammatorisk lidelse (4).

Preanalytiske og analytiske testfaktorer kan også påvirke CRP-konsentrasjonen. Det kan dreie seg om hemolyse, lagringstid, lagringstemperatur (3,10), utilstrekkelig blanding av testserum og reagens, serum på ytterside av testkapillær-rør og luftbobler i testkapillær-rør (13).

LifeAssays® Vet Readers metoden er ikke testet i forhold til forøket nivå av leukocytter, bilirubin og triglyserider (13), og vi vet derfor ikke hvordan dette påvirker CRP-målingene.

Vi forsøkte i vår pilotstudie å dele hundene inn i fire sykdomskategorier basert på diagnose. Kategoriene var inflammasjon, infeksjon, neoplasi og til slutt en samlegruppe for de sykdommer som ikke passet inn under de tre foregående grupperingene, kalt andre sykdommer. Det ble funnet en signifikant forskjell mellom kategoriene, men resultatene må tolkes med forsiktighet da det både var få observasjoner i de forskjellige sykdomskategoriene, og det ble observert en stor spredning i CRP-konsentrasjoner innad i sykdomskategoriene.

Inflammasjon og infeksjonssykdommer

Inflammasjon kan være forårsaket av en infeksjon (1,8,29). I humanmedisinen brukes CRP-konsentrasjonen til å differensiere bakterielle og virale infeksjoner, når man har identifisert det affiserte organet (30). Høye nivåer gir sterke indikasjoner på bakteriell infeksjon. I veterinærmedisinen har ikke slik tilnærming blitt undersøkt i noen særlig grad, men det er vist at utberedelsesgraden av en infeksjon (lokal vs. systemisk) kan være med på å bestemme CRP-konsentrasjonen (29,31), noe som kan tale mot å bruke en slik inndeling.

Flere systemiske infeksjoner som leptospirose, parvo-virus infeksjon (8), babesiose (32), erlichiose (33) og leishmaniose (34) har vist seg å gi forøket CRP-konsentrasjon i hundeblood. Er infeksjonen mild, lokalisert eller i en fase som ikke induserer inflammasjon, trenger ikke CRP-konsentrasjonen være forøket. Dette rapporterer Nakamura o.fl. i sine studier (29), der det er funnet at infeksjoner i nedre luftveier (bronkopneumoni og pneumoni) gir signifikant

økning, som ikke observeres ved infeksjon i øvre luftveier (rhinitt og bronkitt). I vår studie ble det funnet forøket CRP hos to pasienter diagnostisert med bronkopneumoni, mens det ikke ble påvist forøket CRP hos en hund med bronkitt.

Pyometra er en infeksjonstilstand hvor det er vist at man får en konsentrasjonsøkning av CRP (35). I vår studie ble det observert to pasienter diagnostisert med pyometra med tydelig forøket CRP, og en pasient mistenkt å ha pyometra, diagnostisert med cystisk endometrie hyperplasi(CEH)etter kirurgi, med svakt forøket CRP. Pyometra og andre tilstander knyttet til reproduksjonsorganene hos tisper kan være vanskelig å skille fra hverandre. Både ved pyometra og CEH vil man kunne palpere en fylt uterus og observere vaginal utflod (36). Fransson o.fl. (35) har vist at CRP sammen med prosentandel nøytrofile granulocytter var de viktigste parametrene til å diagnostisere pyometra, når de kliniske kriteriene var oppfylt. Ved pyometra vil man ofte få en markant økning i CRP-konsentrasjonen i tillegg til nøytrofili, da den bakterielle infeksjonen setter i gang en inflammasjonsrespons. Ved pyometra vil det også foreligge mucosa-skade og dette vil også påvirke konsentrasjon av CRP. Dette observeres ikke ved CEH (36).

Man kan også bruke CRP til å diagnostisere patologiske tilstander i gastrointestinal(GI) traktus. I vår studie ble det diagnostisert alt fra milde gastroenteritter, uten forøket CRP, til kraftige, hemorrhagiske gastroenteritter og pyogranulomatøse betennelser i tarm, med høye CRP-konsentrasjoner i blod. Eksperimentelle studier utført av Jergens o.fl. (31) viser at skade på GI-mukosa stimulerer til økt produksjon av CRP, og at lokalisasjon og utberedelsesgrad påvirker konsentrasjonsøkningen. Bakteriell enteritt og tarmobstruksjon har vist seg å gi konsentrasjonsøkning av CRP, en tendens man ikke ser ved anaerob bakteriell overvekst (4). Ved inflammatory bowel disease (IBD) er det også vist en sterk korrelasjon mellom

sykdomsaktivitet og nivået av CRP, som Jergens o.fl mener kan brukes som indikator for behandlingsrespons (31).

Akutt pankreatitt forårsaket av bakteriell translokasjon fra tarm, og nekrose av parenkymet vil gi en økning i CRP (4,37), noe som ikke er observert ved eksokrin pankreas insuffisiens (EPI) (4).

Inflammasjon kan ha ikke-infeksiøst opphav, deriblant immunmedierte lidelser. Ved leddbetennelse hos hund er det vanlig å dele de etiologiske årsakene i to hovedkategorier, infeksiøst og ikke-infeksiøst. Av de ikke-infeksiøse og immunmedierte leddbetennelsene vil idiopatisk polyartritt (IPA) gi markert økning i CRP-konsentrasjonen, noe som ikke er vist ved reumatoid artitt (4,38). Ohno o.fl. (38) belyser mulighetene til å bruke CRP diagnostisk ved halthetsutredning, om differensial diagnosene er immunmediert polyartritt, inkludert IPA, degenerative leddlidelser og diskus prolaps. IPA gir konsentrasjonsøkning av CRP, noe man ikke observerer ved diskus prolaps (29). Med tanke på degenerative leddlidelser, kjenner vi ikke til noen studier som undersøker sammenhengen mellom disse og CRP. Men som Ohno o.fl. påpeker, vil det være nyttig med en slik kunnskap i halthetsdiagnostikken (38).

Andre immun-medierte lidelser hvor det er påvist forhøyet CRP-konsentrasjon er nodulær steril pannikulitt, immunmediert trombocytopeni og immunmediert hemolytisk anemi (IMHA) (29).

Andre lidelser som ble funnet med forøket CRP i vår studie som ikke allerede er nevnt var cystitt med ensidig pyelonefritt (n=1), discusspondylitt (n=1), huggormbitt (n=2), mastitt (n=2) og AV-klaff insuffisiens, med nedsatt allmenntilstand og hoste (n=2). De to siste ble

inkludert i studien i den tro at det dreide seg om kliniske symptomer på venstresidig hjertesvikt. Nakamura o.fl. (29) fant ikke forøket CRP hos 10 pasienter med mitralis insufficiens. Det kan være at journalen er blitt feiltolket og at disse to er inkludert i studien på tross av at de har to sammenfallende lidelser.

Neoplastiske lidelser

Noen neoplastiske lidelser kan indusere inflammasjon som følge av vevsinvasjon og destruksjon (4,20,29), andre ved frigjøring av proinflammatoriske mediatorer (1). I vår studie ble det i kategorien neoplasi funnet den høyest medianverdien av alle sykdomskategoriene. Dette kan skyldes tilfeldigheter da det var få hunder i denne kategorien, men det er rimelig å tro at lidelsens art og forløp kan ha påvirket forskjellene i CRP-konsentrasjon, da diagnosene var mastcelletumor med metastaser, lymfosarkom og hemangiosarkomer. På samme måte som for infeksjon og inflammasjon er det bevist at utbredelsesgraden av en tumor (lokal vs. infiltrativ vs. systemisk) kan være med på å bestemme CRP-konsentrasjonen (29). Lokale tumorer gir i de fleste tilfellene ingen signifikant økning i CRP (20,29) mens systemiske neoplastiske lidelser har vist signifikant økning (29). Eksempler på dette er høygradig multisentrisk melanom, lymfosarkom, leukemi, multippelt myelom og hemangiosarkom (29,39). Caspi o.fl. (19) har undersøkt hunder med mammaetumorer, der det er indikert at disseminerte tumorer gav høyere CRP-konsentrasjoner enn benigne og lokale, primære maligne tumorer (19).

Sykdommer som ikke påvirker CRP-konsentrasjonen

Ikke alle hunder som ble kategorisert som *syk* i vår studie, hadde CRP-konsentrasjoner over referanseverdi. Dette kan skyldes at ikke alle sykdommer induserer en inflammasjon (29) eller at inflammasjonen var mild og/eller lokalisert (20,29,31). I vår studie ble det ikke funnet

forøket CRP ved flere neurologiske lidelser, deriblant pasienter med cauda equina syndrom (n=3), lesjon i C5-C6 region med tetraparese (n=1), ryggmargsblødning (n=1) og degenerativ radiculomyopati (n=1). Videre ble det heller ikke funnet forøket CRP ved infeksjøs cystitter (n=2), discuspondylitt (n=1), bronkitt (n=1), kronisk prostatitt (n=1), mild katarralsk gastroenteritt (n=2, den ene som følge av å ha spist tannpirkere), epulides/ameloblastom (n=1) og hypothyreose (n=1). Mange av disse hundene ble allokert til sykdomskategorien andre sykdommer, noe som nok har bidratt til å gi denne gruppen den laveste median for CRP-konsentrasjon av alle sykdomskategoriene. Liknende resultater ble funnet i en stor klinisk studie i Japan med uforandrede CRP-konsentrasjon ved nevrologiske sykdommer som epilepsi, atlantoaksial sublaksasjon, hydrocephalus, nekrotiserende meningoencephalitt; endokrine lidelser som hypothyroidisme, hyperadrenokortikoidisme, diabetes mellitus; urinstein, trakeal kollaps, hjernetumores, diskus prolaps, rhinitt, mitralis insuffisiens, portosystemisk shunt, bronkitt, megaeosophagus og leiomyosarkom (29).

CRP til monitorering av sykdom og behandling

I vår studie ble ikke pasientene fulgt opp over tid etter initiert behandling, men det er vist at CRP kan brukes i forbindelse med oppfølging av pasienter når det gjelder respons på behandling av en rekke lidelser med en inflammatorisk aktivitet (2,4,5,7,20,26,29,31,40). Vellykket respons på behandling vil gi en rask nedgang i CRP-konsentrasjon, mens persisterende høy konsentrasjon eller økning etter seponert behandling tyder på at behandlingen ikke har fungert eller tilbakefall av sykdom (2,20,41).

Selv om CRP-konsentrasjonen er avhengig av grad av inflammatorisk stimuli, er det ikke funnet holdepunkter for å bruke CRP som en prognostisk faktor for dyrets sykdomstilstand. Studier av CRP hos kritisk syke hunder med primær immunmediert hemolytisk anemi (IMHA) og systemisk inflammatorisk respons syndrom (SIRS) viste ingen assosiasjon

mellom CRP-konsentrasjon og overlevelse (40,42,43). Det ble likevel funnet sammenheng mellom overlevelse og mangel på reduksjon i CRP-konsentrasjonen innen 2-3 dager etter initiert behandling hos hundene med SIRS (40). Den samme prognostiske *indicium* har blitt funnet hos hunder med pankreatitt (44).

Et kirurgisk inngrep innebærer en kortvarig inflammatorisk stimulus (8,10,18,25). Det er funnet en sterk sammenheng mellom størrelsen på inngrepet og CRP-konsentrasjon hos hund (2). Post-operativt vil man få en raskere nedgang i CRP enn leukocytter, noe som gjør at CRP kan brukes til monitorering av den post-operative tilstanden til dyret og at det ikke utvikles komplikasjoner etter inngrepet (4,45). Uten komplikasjoner post-operativt vil CRP-konsentrasjonen få en klokkeformet responskurve (5). Hvis CRP ikke begynner å synke etter 24-27 timer bør man søke årsak til dette, og dersom behov, initiere behandling (2).

Det er allikevel flere begrensninger ved bruk av akutfaseproteiner i monitorering av behandling. CRP har lav spesifisitet og vil kunne gi misledende informasjon dersom det foreligger andre samtidige tilstander som opprettholder nivået, eller ved utvikling av nye inflammatoriske tilstander hos dyret (4).

Sammenligning av to metoder for bestemmelse av CRP-konsentrasjonen i blod

LifeAssays®Vet Readers metode er en magnetisk permeabilitetsbaserert metode, og er den første kommersielt tilgjengelige metoden for hund (3). Sentrallaboratoriet bruker et kommersielt turbidometrisk immunassay for mennesker som har blitt kalibrert for å kunne bestemme CRP-konsentrasjonen i hundeserum (14). Når vi i vår studie sammenliknet CRP-konsentrasjonene målt på samme prøve eller på 2 prøver tatt ved samme prøvetakingstidspunkt, ved henholdsvis Sentrallaboratoriet og ved bruk av LifeAssays®Vet

Readers, fant vi en relativt stor differanse i absoluttverdier mellom de to testene. I ett tilfelle var variasjonen så stor at den pasientnære metoden viste en CRP nære normalområdet, mens referanselaboratoriets metode viste en kraftig forøket CRP. Kjelgaard-Hansen o.fl (14) har tidligere sammenlignet de samme to metodene og konkludert med at det er et samsvar mellom konsentrasjonene målt med de to metodene. Dette til tross for at han fant opptil 18 av 40 observasjoner med avvik i absoluttverdier, utover hva som kan forklares med begge testers kombinerte upresisjon (14). Sentrallaboratoriets metode har vist intra- og interassay variasjonskoeffisienter på henholdsvis 5,2 % til 10,8 % og 3,0 % til 10,2 % (14), mens LifeAssays® Vet Reader har en intra- og interassay variasjonskoeffisient på henholdsvis 5,0 % til 13,6 % og 4,5 % til 16,7 % (14). Videre fant Kjelgaard-Hansen ved testing av kjente CRP-konsentrasjoner, at deteksjon av rett konsentrasjon ved bruk av LifeAssays® Vet Readers metode, kunne være uakseptabelt lav (60 %) ved lave konsentrasjoner (14). Våre resultater ser ut til å samsvare godt med disse funn, med en større spredning av observasjonene gjort med den pasientnære metoden, enn med Sentrallaboratoriets metode innenfor normalområdene. Kjelgaard-Hansens konklusjon var at man likevel vil skille frisk fra syk ved begge metodene, men at sammenlikning av absolutte verdier på tvers av CRP-analysemetode ikke bør gjøres (3). I vårt studie hadde en hund CRP-konsentrasjoner (LifeAssay® VetReader) utenfor normalområdet for metoden. Dette var en hund som ved klinisk undersøkelse og ut fra eierinformasjon, ble ansett som frisk. Referanseverdier for en test vil være basert på en populasjon av friske individer, men det vil alltid være individer som har normalverdier utenfor disse referansene, uten å være syk (46). Avviket hos denne ene hunden var marginalt, og det er grunn til å tro at de fleste klinikere ville tolke et slikt resultat med forsiktighet. Sentrallaboratoriets metode framstår som en mer presis metode.

Senkningsreaksjon

Våre resultater viser at senkningsreaksjonen er en mindre sensitiv metode for deteksjon av sykdom, enn CRP-konsentrasjon i blod, noe som også støttes i litteraturen (5,41,47). Noe av årsaken til dette kan være at senkningen er en test som indirekte måler virkningen man får ved økning av fibrinogen, men også immunoglobuliner. CRP-analysen måler til motsetning direkte konsentrasjonen av akutfaseproteinet CRP. Selv om fibrinogen er et positivt akutfaseprotein, regnes det som svakt til intermediært (3), og får en konsentrasjonsøkning seint i inflammasjonsprosessen. Selv ved kraftig vedvarende stimuli tar det dager før maksimal senkning oppnås, videre tar det uker før senkningen normaliseres igjen (5) (figur 10).

I vår studie ble det funnet forøket senkningsreaksjon hos fire pasienter som ikke hadde forøket CRP. Disse hadde diagnosene hypothyreose, cystitt, degenerativ radiculomyelopati, og en pasient var klassifisert som frisk (se beskrivelse av kasus i teksten over). Disse fire hadde senkning på henholdsvis 40, 28, 65 og 24 mm etter 2 timer og må derfor anses som reelle senkninger. Den “friske pasienten” hadde en forhistorie med luftveisinfeksjon som kanskje kan forklare den økte senkningen. Det kan være at de andre tre pasientene på prøvetakingstidspunkt ikke hadde en inflammatorisk stimulus kraftig nok til å gi forøket CRP, men at de må ha vært utsatt for en slik stimulus tidligere. Hvorvidt denne var relatert til samme sykehistorie eller ikke var ikke mulig å lese ut fra journalen.

Det er flere andre faktorer enn inflammasjon som påvirker erytrocyttenes sammenklumpningsevne, og dermed senkningen. Senkningen er inverst korrelert med mengde erytrocytter i blodet, slik at hemolyse (uavhengig om den skyldes preanalytiske feilkilder eller patologi), og anemi vil gi en økt senkningsreaksjon (48). Det er utviklet en korrigeringsstabell

for senkning hvor man tar hensyn til hematokrit (16,49) (figur 2). Denne tabellen er utviklet til korreksjon ved bruk av Wintrobe senkningsreaksjon og ikke modifisert Westergrens metode, som brukes og undervises i på Norges Veterinærhøgskole. Tabellen brukes likevel som en rettesnor for å foreta en viss korrigerings av senkningen i forhold til hematokrit, og ble bruk i vår pilotstudie. Erytrocyttenes form vil også påvirke senkningen (48), hvor microcyttære erytrocytter gir redusert senkning (49,50), mens makrocytose gir økt sedimentasjon (49). Preanalytiske faktorer kan også påvirke senkningen, da feil blandeforhold, og forsinket eller utilstrekkelig blanding av blod og antikoagulas, kan føre til celledvelling eller koagulering, noe som igjen påvirker senkningen (46). Det ble ikke laget blodutstryk fra pasientene i vår studie, så preanalytiske feilkilder basert på erytrocyttenes morfologi kan ikke utelukkes.

Senkningsreaksjonen kan også variere med metode og type antikoagulas. Ved klinikklaboratoriet på NVH brukes en modifisert Westergrensmetode hvor blodet er tilsatt EDTA. Ved bruk av denne metoden i humanmedisinen, har EDTA-blod vist seg å være anvendelig (51). Tolkning av resultatene ved senkning kan være utfordrende. Feilaktige referanseverdier kan være en årsak til feilkategorisering av syk og frisk. De oppgitte referanseverdiene er 0-5 mm ved 1, 2 og 24 timers avlesning. Kilden til disse verdiene er veldig gamle (Schalm (1971) (16) og Roswell (1969) (49)) og det er sannsynlig at både metode og utstyr har blitt endret siden. Det er kjent at senkningen er påvirket av metode (52), og dette gjør det viktig å bruke referanseverdier beregnet for den gitte metode.

Da blodcellene ikke synker i et konstant tempo er det viktig med standardisert avlesning. I vårt materiale hadde vi flere prøver med stort avvik mellom første avlesning (under referanseverdi) og andre avlesning (over referanseverdi), som viser betydningen av begge

avlesninger. I tillegg var det flere prøver som kun lå over referanseverdi ved tredje avlesning (24 timer). Våre resultater viste korrelasjon mellom gruppene syk og frisk kun ved 1 og 2 timers avlesning. Årsakene til seint igangsettende senkning er ikke oppgitt i litteratur, og betydningen av resultatet er uvisst.

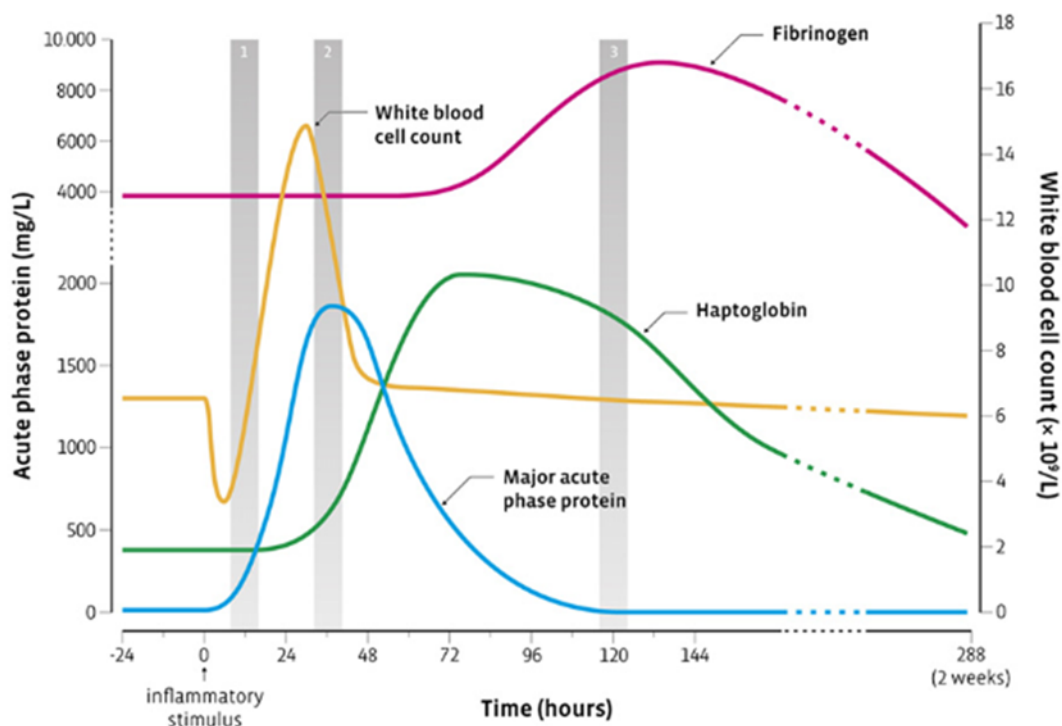
Sammenlikning av CRP og andre generelle sykdomsparametere

CRP er en direkte test som måler grad av inflammasjon, da konsentrasjonen av CRP i blodet i all hovedsak er en konsekvens av grad av inflammatorisk stimuli. Immunologisk umodenhet (< 3 måneders alder) (28) og endestadiums leverlidelse er faktorer som er vist å påvirke CRP-konsentrasjonen i blod (4). Senkningsreaksjonen er en indirekte måling av grad av inflammasjon. Senkningsreaksjonen er mediert av fibrinogen og immunglobuliner, men er påvirket av en lang rekke faktorer utover betennelsesaktiviteten, som mengde, størrelse og form på erytrocyttene, drektighet, lagringstid, romtemperatur, metode og avlesningstidspunkt (16). Antall leukocytter er også påvirket av stress, iatrogene og endogene glukokortikoider (53,54). Akutfaseproteiner får en raskere økning i konsentrasjonen enn antall leukocytter. Dette fordi nye leukocytter må produseres i beinmargen først (4). Rektal temperatur er en lite sensitiv parameter, da den påvirkes av stress, temperatur i omgivelsene (55) og medisinsk behandling med NSAID og immunsuppressive stoffer (4).

I tillegg til ikke-inflammatoriske faktorerers påvirkning på parametrene, vil også deres kinetikk være viktig for resultatene (figur 10). I utgangspunktet er konsentrasjonen av CRP svært lav hos friske individer, den øker kun timer etter inflammatorisk stimulus og når maksimalkonsentrasjon etter litt over et døgn (2,5,8). CRP vil så raskt falle i konsentrasjon når inflammatorisk aktivitet avtar (2,5). Svake akutfaseproteiner, som fibrinogen, har en moderat økning i konsentrasjon som svar på inflammasjon (5). Det tar 5-7 dager før man når

maksimal konsentrasjoner og det kan ta flere uker før konsentrasjonen når normalnivåer igjen etter opphør av inflammasjonsstimulus (5). Leukocytene vil initialt minke som følge av initial økning av leukocytter i ”marginal pool”, deretter får man en cytokin-indusert leukocytose (46). Dette gjør at tidspunkt for prøvetaking er viktig med hensyn på hvilke verdiene av de forskjellige parameterne.

Figur 10: Grafen viser konsentrasjoner av akutfaseproteiner og hvite blodceller (WBC) i forhold til en tidsakse. Major acute phase proteiner (sterke AFP) inkluderer CRP, serum amyloid A og haptoglobin.



Vår pilotstudie viste at CRP var den mest sensitive generelle sykdomsindikatoren sammenliknet med senkning, antallet nøytrofile granulocytter og rektal temperatur. Dette funnet er i tråd med en stor klinisk undersøkelse, der 928 kliniske pasienter med en rekke forskjellige lidelser ble studert med tanke på akutfaserespons i form av CRP-konsentrasjoner, antall leukocytter, rektal temperatur og albuminkonsentrasjon (8). Siden både senkning, antall leukocytter og rektal temperatur kan påvirkes av en rekke andre faktorer annet enn inflammatoriske stimuli, framstår CRP også som den mest spesifikke sykdomsmarkøren.

Vi fant ingen sammenheng mellom CRP-konsentrasjonen og grad av senkning, noe som er forenelig med studien utført av Nakamura o.fl (29). Av 16 hunder med forøket senkningsreaksjon (1 og/eller 2 timer), hadde 12 hunder også forøket CRP-konsentrasjon. Positive utslag på begge analysene vil illustrere en aktiv tilstand som har vart noen dager, eventuelt at det foreligger to uavhengige sykdomsprosesser. Kun positive utslag på CRP kan skyldes at man er for tidlig i sykdomsforløpet til å ha en forøket senkningsreaksjon. Kun positive utslag på senkning kan skyldes at inflammasjonen er avsluttet, men at fibrinogen eller immunoglobulinnivåene fortsatt er høye nok til å indusere senkning. Men det kan også komme av falske positive senkninger som følge av senkningens mange påvirkningsfaktorer, eller en falsk negativ CRP.

På et humant undervisningssykehus ble 5777 pasienter studert med tanke på sammenheng mellom samtidig måling av CRP og senkningsreaksjon (56). De fant at ca. 30 % hadde forøket senkning uten å ha forøket CRP. Av disse hadde 32 % ikke lenger en inflammatorisk lidelse, 28 % var falske-positive senkninger, 32 % var uforklarlige avvik og 8 % hadde en aktiv inflammasjon (falske negative CRP) (56).

I vår studie så vi en tilsynelatende sammenheng mellom CRP-konsentrasjonen og leukocytter. Også Céron o.fl. (4) har vist en positiv korrelasjon mellom CRP, leukocytter og nøytrofile granulocytter . Allikevel har CRP høyere diagnostisk sensitivitet. For eksempel vil myelosuppresjon enten det skyldes kjemoterapeutika eller leukemi, ikke gi økning i antall hvite blodceller (57), men gi økt CRP-konsentrasjon. Antall leukocytter er også påvirket av stress, og iatrogene og endogene glukokortikoider. CRP har også lengre analytisk stabilitet enn cellulære komponenter i blod, da man kan fryse eller kjøle ned serum og fremdeles få et korrekt prøvesvar med henhold til CRP (4). Videre er det vist at leukocytose persisterer lengre

enn CRP ved visse tilstander, og CRP er dermed mer anvendelig for å si noe om respons av behandling (38).

Våre resultater samsvarte med studien til Nakamura o.fl. (29), hvor det ikke ble funnet korrelasjon mellom kroppstemperatur og konsentrasjon av CRP. Likevel var det signifikant høyere CRP-konsentrasjon blant de hundene med pyreksi (29). Rektaltemperatur er en lite sensitiv parameter, da den påvirkes av stress og medisinsk behandling som NSAID og immunosuppressive stoffer (4).

Konklusjon

Resultatene fra vår pilotstudie, sammen med resultater fra publiserte artikler, har vist at CRP er en uspesifikk sykdomsparameter det kan være nyttig å anvende i klinisk diagnostikk på hund. Akutfaseproteinet har flere egenskaper og kvaliteter som gjør den til en ekte "real-time"-markør på inflammasjon, noe som gjør at CRP kan brukes både diagnostisk og for å se på effekt av behandling.

Fram til de siste ti årene er det indirekte måling av fibrinogen, ved bruk av senkningsreaksjonen, som har vært standard for å si noe om graden av inflammasjon. Denne metoden har mange potensielt innvirkende faktorer som gjør den uspesifikk og vanskelig å tolke.

Ser man på CRP sammenliknet med andre uspesifikke sykdomsparametere (leukocytter, nøytrofile granulocytter og rektal temperatur) er sensitiviteten og spesifisiteten ved deteksjon av inflammasjon, betraktelig bedre.

Analysemetodene som måler CRP-konsentrasjonen har fram til nå vært mange, men samtidig lite tilgjengelige for veterinærer i klinisk praksis. Kjelgaard-Hansen, som har publisert en rekke artikler om analyse av CRP og validering av metoder, har uttalt at man ikke bør sammenligne absolutte verdier på tvers av ulike analysemetoder. Man bør bruke referanseverdier oppgitt for metoden.

CRP har styrket sin anvendbarhet siden 2009, da klinikere i smådyrpraksis nå både har mulighet til å sende inn serum til Sentrallaboratoriet for analyse av CRP, eller å gå til anskaffelse av en nylig markedsført pasientnær analysemaskin, LifeAssays® Vet Reader.

Takk til bidragsytere

Vi vil gjerne få takke vår fantastiske veileder og samarbeidspartner, Anita Haug Haaland. Hun har vært utrolig engasjerende og inspirerende i hvert steg av prosessen.

Vi vil også få rette en stor takk til Lotte Poulsen og Odd Skaret, for god hjelp ved prøveuttak og analyse.

Videre vil vi takke Sentrallaboratoriet for godt samarbeid og alle klinikkveterinærer ved smådyrseksjonen på NVH, som har bidratt med å sende inn prøvemateriale, samt Ane Nødtvedt og Eystein Skjerve for deltakelse i statistiske analyser.

Summary

Title: C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate as diagnostic tools in canine veterinary practice.

Authors: Monica Jørgensen, Stine Jevnehagen Moe

Supervisor: Anita Haug Haaland, Institutt for sport- og familiedyrmedisin, Seksjon for smådyrsykdommer.

The assignment is based on a two-pilot study designed and conducted by the authors. The first part includes a study of C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR), as well as neutrophile granulocytes and rectal temperature in healthy and sick dogs that were patients at the Small Animal Clinic at The Norwegian School of Veterinary Science. The aim was to study the relationship between unspecific disease parameters, with special emphasis on CRP and ESR, and to observe if there were positive or negative correlation between different unspesific indicators of sickness. The results were used as the basis for a literature study on the use of CRP and ESR of dog. In the second part of the study, measurments of CRP in blood were compared with the use of two different analyzing machines, an in-house machine(LifeAssays ® Vet Reader), with measurements analyzed at a reference laboratory (Sentrallaboratoriet).

Our results showed that CRP in general is a more useful parameter in detecting inflammatory conditions in dogs, than ESR, the number of neutrophile granulocytes and rectal temperature. Despite the fact that we included few individuals in our study, the findings, according to CRP concentration and disease states, shows good correlation with the results previously published. The avaliability of CRP-analysis for clinicans has recently been improved. In addition to submitting the samples to a reference laboratory (Sentrallaboratoriet from 2009), there is also

recently marketed an in-house analysis machine (LifeAssays ® Vet Reader) for use on canine bloodsamples. CRP appears to be a useful diagnostic tool, which increasingly should be used in clinical diagnostics.

Referanser

- (1) Tizard IR. Veterinary Immunology - An introduction. Second ed. USA: Evolve; 2004.
- (2) Kjelgaard-Hansen M. Anvendelse af hundens C-reaktivt protein i klinisk praksis. Norsk veterinær tidsskrift 2009(6):531-535.
- (3) M. Kjelgaard-Hansen. Canine C-reactive protein - a study on the applicability of canine serum C-reactive protein. Fredriksberg, Danmark: The Royal Veterinary and Agricultural University; 2004.
- (4) Ceron JJ, Eckersall PD, Martynez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. Vet Clin Pathol 2005 Jun;34(2):85-99.
- (5) Kjelgaard-Hansen M, Jacobsen S. Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. Clin Lab Med 2011 Mar;31(1):51-70.
- (6) Kjelgaard-Hansen M, Mikkelsen L, Kristensen AT, Jensen AL. Study on biological variability of five acute-phase reactants in dogs. Comparative Clinical Pathology 2003;12(2):69.
- (7) Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. Vet J 2004 Jul;168(1):28-40.
- (8) Yamamoto S, Shida T, Miyaji S, Santsuka H, Fujise H, Mukawa K, et al. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. Vet Res Commun 1993;17(2):85-93.
- (9) Sjaastad ØV. Physiology of Domestic Animals. First ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press; 2003.
- (10) Conner JG, Eckersall PD, Ferguson J, Douglas TA. Acute phase response in the dog following surgical trauma. Res Vet Sci 1988 Jul;45(1):107-110.
- (11) Yamamoto S, Tagata K, Nagahata H, Ishikawa Y, Morimatsu M, Naiki M. Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its properties. Vet Immunol Immunopathol 1992 Jan 31;30(4):329-339.
- (12) Sentrallaboratoriet. Referanseverdier. 2011; Available at: www.sentrallaboratoriet.no.
- (13) LifeAssay AB. Canine C-reactive protein - a clinical guide. 2011. (14) Kjelgaard-Hansen M, Jensen AL, Kristensen AT. Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. Vet Clin Pathol 2003;32(2):81-87.
- (14) Kjelgaard-Hansen M, Jensen AL, Kristensen AT. Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. Vet Clin Pathol 2003;32(2):81-87.

- (15) Erythrocyte Sedimentation Rate Dispette 2 Modified Westergren Method. Medical Unit Laboratory 2009. (16) Schalm OW. Schalm's Veterinary Hematology. ; 1986.
- (16) Schalm OW. Schalm's Veterinary Hematology. ; 1986.
- (17) Altman DG. Practical Statistics for Medical Research. London: Folly Chapman & Hall; 1999. p. 396-403.
- (18) Caspi D, Baltz ML, Snel F, Gruys E, Niv D, Batt RM, et al. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology* 1984 Oct;53(2):307-313.
- (19) Caspi D, Snel FW, Batt RM, Bennett D, Rutteman GR, Hartman EG, et al. C-reactive protein in dogs. *Am J Vet Res* 1987 Jun;48(6):919-921.
- (20) Tecles F, Spiranelli E, Bonfanti U, Ceron JJ, Paltrinieri S. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *J Vet Intern Med* 2005 Nov-Dec;19(6):865-870.
- (21) Kuribayashi T, Shimada T, Matsumoto M, Kawato K, Honjyo T, Fukuyama M, et al. Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. *Exp Anim* 2003 Oct;52(5):387-390.
- (22) Ulutas PA, Musal B, Kiral F, Bildik A. Acute phase protein levels in pregnancy and oestrus cycle in bitches. *Res Vet Sci* 2009 Jun;86(3):373-376.
- (23) Borer LR, Peel JE, Seewald W, Schawalder P, Spreng DE. Effect of carprofen, etodolac, meloxicam, or butorphanol in dogs with induced acute synovitis. *Am J Vet Res* 2003 Nov;64(11):1429-1437.
- (24) Martinez-Subiela S, Ginel PJ, Ceron JJ. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Vet Rec* 2004 Jun 26;154(26):814-817.
- (25) Martinez-Subiela S, Tecles F, Ceron JJ. Critical differences of acute phase proteins in canine serum samples. *Vet J* 2003 Nov;166(3):233-237.
- (26) Nielsen L, Toft N, Eckersall PD, Mellor DJ, Morris JS. Serum C-reactive protein concentration as an indicator of remission status in dogs with multicentric lymphoma. *J Vet Intern Med* 2007 Nov-Dec;21(6):1231-1236.
- (27) Yamamoto S, Shida T, Okimura T, Otabe K, Honda M, Ashida Y, et al. Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test. *Vet Q* 1994 Jul;16(2):74-77.
- (28) Hayashi S, Jinbo T, Iguchi K, Shimizu M, Shimada T, Nomura M, et al. A comparison of the concentrations of C-reactive protein and alpha1-acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. *Vet Res Commun* 2001 Feb;25(2):117-126.
- (29) Nakamura M, Takahashi M, Ohno K, Koshino A, Nakashima K, Setoguchi A, et al. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci* 2008 Feb;70(2):127-131.

- (30) Prestegård E. The Future of Point-of-Care Testing Using C-reactive Protein - An Ideal Tool for Diagnosis, Prognosis and Therapy Management. 2006.
- (31) Jergens AE, Schreiner CA, Frank DE, Niyo Y, Ahrens FE, Eckersall PD, et al. A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med* 2003 May-Jun;17(3):291-297.
- (32) Matijatko V, Mrljak V, Kis I, Kucer N, Forsek J, Zivicnjak T, et al. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet Parasitol* 2007 Mar 31;144(3-4):242-250.
- (33) Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I, Iqbal Z, Kociba G, Mott J, et al. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol* 1994 Apr;32(4):912-917.
- (34) Martinez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Ceron JJ. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec* 2002 Feb 23;150(8):241-244.
- (35) Fransson BA, Karlstam E, Bergstrom A, Lagerstedt AS, Park JS, Evans MA, et al. C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004 Sep-Oct;40(5):391-399.
- (36) Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7th ed. United States of America: Saunders Elsevier; 2010.
- (37) Holm J, Rozanski E, Freeman L. C-reactive protein concentration in canine acute pancreatitis. *Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio, Tex.: 2001)* 2004;14(3):183.
- (38) Ohno K, Yokoyama Y, Nakashima K, Setoguchi A, Fujino Y, Tsujimoto H. C-reactive protein concentration in canine idiopathic polyarthritis. *J Vet Med Sci* 2006 Dec;68(12):1275-1279.
- (39) Mischke R, Waterston M, Eckersall PD. Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. *Vet J* 2007 Jul;174(1):188-192.
- (40) Gebhardt C, Hirschberger J, Rau S, Arndt G, Krainer K, Schweigert FJ, et al. Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009 Oct;19(5):450-458.
- (41) Galezowski AM, Snead EC, Kidney BA, Jackson ML. C-reactive protein as a prognostic indicator in dogs with acute abdomen syndrome. *J Vet Diagn Invest* 2010 May;22(3):395-401.
- (42) Griebisch C, Arndt G, Raila J, Schweigert FJ, Kohn B. C-reactive protein concentration in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Vet Clin Pathol* 2009 Dec;38(4):421-425.

- (43) Mitchell KD, Kruth SA, Wood RD, Jefferson B. Serum acute phase protein concentrations in dogs with autoimmune hemolytic anemia. *J Vet Intern Med* 2009 May-Jun;23(3):585-591.
- (44) Mansfield CS, James FE, Robertson ID. Development of a clinical severity index for dogs with acute pancreatitis. *J Am Vet Med Assoc* 2008 Sep 15;233(6):936-944.
- (45) Dabrowski R, Kostro K, Lisiecka U, Szczubial M, Krakowski L. Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. *Theriogenology* 2009 Sep 1;72(4):471-476.
- (46) British Small Animal Veterinary Association. *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. Second ed. Gloucester, England.: BSAVA; 2010.
- (47) Emelike OF. Comparative study of Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) using Trisodium Citrate, Normal Saline and Whole blood in Ethylene Di Amine Tetra Acetic Acid (EDTA). *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 2010;14(1):23.
- (48) Morgan HC. The Value of the Erythrocyte Sedimentation Rate in Veterinary Medicine. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician* 1966(61):463.
- (49) Benedick-Smith J. *A textbook of Veterinary Clinical Pathology*. London: Bailliere, Tindall og Casell; 1969.
- (50) Stokke O. *Klinisk biokjemi og fysiologi*. 2nd ed. Oslo: Gyldendal Akademisk; 2000.
- (51) Plebani M, Piva E. Erythrocyte sedimentation rate: use of fresh blood for quality control. *Am J Clin Pathol* 2002 Apr;117(4):621-626.
- (52) Jain NC, Kono CS. Erythrocyte sedimentation rate in the dog and cat: comparison of two methods and influence of packed cell volume, temperature and storage of blood. *J Small Anim Pract* 1975 Oct;16(10):671-678.
- (53) Maddison J, Page S, Church D. *Small Animal Clinical Pharmacology*. : W. B. Saunders; 2002.
- (54) Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Rang and Dale's Pharmacology*. 6th ed.: Elsevier; 2007.
- (55) Groenink L, Compaan J, van der Gugten J, Zethof T, van der Heyden J, Olivier B. Stress-induced hyperthermia in mice. Pharmacological and endocrinological aspects. *Ann N Y Acad Sci* 1995 Dec 29;771:252-256.
- (56) Colombet I, Pouchot J, Kronz V, Hanras X, Capron L, Durieux P, et al. Agreement between erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in hospital practice. *Am J Med* 2010 Sep;123(9):863.e7-863.13.

(57) Burton SA, Honor DJ, Mackenzie AL, Eckersall PD, Markham RJ, Horney BS. C-reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms. Am J Vet Res 1994 May;55(5):613-618.

Vedlegg

- 1. Klinisk undersøkesskjema**
- 2. Eierskjema**
- 3. Medforfattererklæring**