

Analys av parathormon och joniserat kalcium i blod hos hund

Emma Cegrell

Handledare: Astrid Hoppe
Institutionen för kirurgi och medicin, smådjur

Biträdande handledare: Mats Forsberg
Institutionen för klinisk kemi

Examensarbete 2004:18
Veterinärprogrammet
Veterinärmedicinska fakulteten
SLU
ISSN 1650-7045
Uppsala 2004

Innehållsförteckning

Sammanfattning	3
Inledning	4
Syfte	4
Bakgrund	4
Kalcium	4
Kalciumregleringen	5
Mätning av kalcium i blodet	5
Hyperkalcemi	5
Hypokalcemi	7
Paratyreoidea	7
Parathormon	7
<i>Syntes och nedbrytning</i>	7
<i>Reglering</i>	8
<i>Effekt</i>	8
Mätning av PTH i blodet	9
Hyperparatyreoidism	10
<i>Nutritionell sekundär hyperparatyreoidism</i>	10
<i>Renal sekundär hyperparatyreoidism</i>	11
Hypoparatyreoidism	11
Material och metoder	12
Analysmetoder	12
<i>Analys 1: IMMULITE Intact PTH</i>	12
<i>Analys 2. Cout-A-Count Intact PTH IRMA</i>	13
<i>iSTAT för mätning av Ca²⁺</i>	13
Djurgrupper	14
<i>Referensgrupp 1</i>	14
<i>Referensgrupp 2, en pilotstudie</i>	14
<i>Referensgrupp 3</i>	15
Statistik	17
Resultat	17
Analys 1 samt pilotstudien	17
Analys 2 samt iSTAT	17
Diskussion	18
Summary	22
Referenser	23

Sammanfattning

Kalciumbalansen i kroppen är normalt strikt reglerad så att halten av kalcium i blodet hålls relativt konstant. Regleringen av kalcium sköts framförallt av parathormon som syntetiseras i paratyreoideas huvudceller. Att kalciumhomeostasen sätts ur spel är ett inte alltför ovanligt scenario vid olika sjukdomstillstånd. Detta kan antingen bero på en dysfunktion av själva paratyreoidea eller ha helt andra orsaker. För att veta vilket som är fallet hos den enskilda patienten kan man mäta andelen joniserat kalcium och andelen parathormon (PTH) i blodet. Olika analysmetoder för parathormon finns framtagna för humant bruk. En del av dessa är applicerbara på hund.

I detta försök har ett antal friska hundar provtagits för att ingå som referensmaterial vid introduktion av en parathormon-analys vid Institutionen för klinisk kemi, SLU, Uppsala. Hundarna har även analyserats med avseende på joniserat kalcium. En sk. "two-site PTH assay" har använts (Coat-A-Count Intact PTH IRMA, från DPC, Los Angeles, USA) och parathormon (PTH) har analyserats från såväl serum som plasma. Vid analys av joniserat kalcium (Ca^{2+}) har en blodanalysapparat i mikroformat framtagen för human akutsjukvård använts (iSTAT). Denna apparat har lånats från distributören (Abbott Scandinavia AB, Solna) för att användas i projektet.

Referensvärden för parathormon i serum och plasma är framtagna, samt även referensvärden för joniserat kalcium analyserat med iSTAT. För analys av PTH krävs en viss hantering av blodproverna. Analysen är dessutom ganska krånglig i sitt utförande samt än så länge mycket kostsam. Frågan är därför vilken genomslagskraft en sådan analys kan få och om det är lönsamt att sätta upp en sådan analys som rutin på ett laboratorium. Analys av joniserat kalcium kräver specifik apparatur och analysen har tills nu inte funnits tillgänglig vid ovan nämnda institution. Från vintern 03/04 kommer det dock vara möjligt att analysera Ca^{2+} som rutin vid Institutionen för klinisk kemi då nödvändig utrustning för denna analys har beställts.

Inledning

Det finns en rad olika sjukdomar och sjukdomskomplex inom smådjursmedicinen som påverkar kalciumomsättningen i kroppen. En del av dessa har en hypo- eller hyperfunktion av paratyreoidea som bakomliggande orsak, men långt ifrån alla kalciumrubbningsoraker har en sådan enkel förklaring. Ett värdefullt led i utredningsgången av en hypo- eller hyperkalcemi vore att på ett enkelt sätt kunna mäta nivån av parathormon (PTH) i ett blodprov. Biokemiföretag världen över har under många år jobbat för att få fram analysmetoder för PTH i blod hos människa. Ett antal försök har även gjorts för att få dessa metoder applicerbara på djur. I dagsläget finns olika typer av immunologiska metoder för att analysera parathormon. En del av dessa fungerar även på hund.

Syfte

Syftet med detta projekt är främst att ta fram referensvärden för parathormon och joniserat kalcium i blod hos friska hundar. Dessa värden är tänkta att kunna användas i fungerande rutinanalyser för nämnda parametrar vid Institutionen för klinisk kemi, SLU, Uppsala. Sådana analyser skulle väsentligt förändra och förbättra de diagnostiska och även terapeutiska möjligheterna för stora patientgrupper inom smådjursmedicinen.

Bakgrund

Kalcium

Det dagliga intaget av kalcium via födan, hos en 20 kilos hund uppgår till ca 600 mg. Kalcium absorberas sedan i duodenum och jejunum. Absorptionen i tarmen är en aktiv transport som i sin tur är beroende av vitamin D (calcitriol).⁽⁶⁾

Den fysiologiska betydelsen av kalcium kan i stort delas in i två kategorier. Kalciumsalterna i benvävnad bidrar till *skelettets strukturella uppbyggnad*. Kalciumjonerna i cellerna och i den extracellulära vätskan är nödvändiga för en rad *biokemiska processer* såsom blodkoagulationen, enzymreglering, muskelkontraktilt arbete och nervimpulsöverföring. För att dessa processer ska fungera optimalt krävs att koncentrationen av kalcium i extracellulärvätskan hålls konstant (se kalciumregleringen nedan).^(6, 9)

Nästan 99 % av kroppens totala kalciumhalt hittas i skelettet, ca 1 % finns i andra vävnader och endast 0,1 % finns i den extracellulära vätskan. Det kalcium som finns i serum är i sin tur uppdelat i tre fraktioner; 50 % föreligger i så kallad joniserad form (Ca^{2+}) och är den del som är metaboliskt aktivt. Fyrtio procent av kalciumet är proteinbundet, framförallt till albumin, och 10 % befinner sig i komplex med citrat och fosfat.^(6, 11)

Kalciumregleringen

Kalciumnivån i blodet är beroende av tre parametrar; parathormon (PTH), calcitriol (1,25(OH)₂-vitamin D₃, den aktiva formen av vitamin D₃) och calcitonin. Parathormonets effekt är att höja Ca²⁺ koncentrationen i extracellulärvätskan. Detta sker genom en ökad benresorption, ökad absorption av kalcium från njurar och tarm, samt en ökad calcitriolbildning i njurarna (se mer avsnittet PTH effekt). Calcitriolet har en stark stimulerande effekt på transporten av kalciumjoner från tarmen till blodet. Vidare är calcitriol nödvändigt för osteoblasternas och osteoclasternas normala funktion och är därmed viktigt för benresorptionen. Calcitonin däremot, reducerar hastigheten av benresorptionen samt ökar urinutsöndringen av kalcium och arbetar därmed som en antagonist till PTH och calcitriol. ⁽¹⁶⁾

Mätning av kalcium i blodet

Som nämnts tidigare är en stor del av kalcium i serum (40 %) bundet till protein, framför allt albumin. Förändringar i albumin eller proteinkoncentrationen (dehydrering, blodförlust osv.) kan därför förändra totalkalciumnivån medan andelen joniserat kalcium fortfarande är konstant. Man kan korrigera kalciumvärdet med avseende på albuminhalt för att få ett mer sant värde av serumets totalkalciumhalt. Detta görs med hjälp av formeln:

$$\text{korrigerat Ca (mg/dl)} = \text{totalCa (mg/dl)} - \text{albumin (g/dl)} + 3,5 \quad (6, 7, 8)$$

Eller:

$$\text{korrigerat Ca(mg/dl)} = \text{totalCa(mg/dl)} - (0,4 \times \text{totalprotein(g/dl)}) + 3,3 \quad (8, 13, 21)$$

Bindningen av kalcium till albumin är pH-beroende. Vid en akut acidosis minskar den bundna delen och andelen joniserat kalcium ökar. Vid en alkalos sker det omvända. Vid tolkning av den totala kalciumnivån i ett blodprov bör man därför alltid ta hänsyn till albuminhalt och eventuell syra-bas-rubbning. ⁽⁹⁾

Bestämning av andelen joniserat kalcium vore naturligtvis att föredra vid all sorts analys, då detta är den fraktion som är metaboliskt aktivt. Analys av joniserat kalcium kräver dock speciell apparatur och är som regel mer kostsam. ⁽⁶⁾

Hyperkalcemi

Koncentrationen av joniserat kalcium i blodet hålls normalt inom en mycket snäv gräns. Eftersom olika laboratorier har olika referensvärden, är det svårt att ange ett fixt värde som indikerar hyperkalcemi. Det man däremot kan säga är att normalt fluktuerar andelen joniserat kalcium inte mer än 0,1 mg/dl eller 0,025 mmol/l åt något håll, utan att det anses onormalt. ⁽⁸⁾

Vid Inst. för klinisk kemi, SLU, Uppsala, har man satt gränsvärdet för totalt kalcium i serum till: 2,2 – 2,9 mmol/l. Hos unga, växande valpar kan man dock

tolerera ett något högre värde. Detta förutsatt att hunden samtidigt har en lindrig förhöjning av alkaliskt fosfat (ALP) till följd av hög osteoclastaktivitet hos växande djur, samt är kliniskt frisk och har normalt kreatininvärde.⁽¹⁰⁾

Det finns olika differentialdiagnoser hos hund som leder till hyperkalcemi. Primär hyperparatyreoidism är en diagnos (se vidare separat kapitel). Övriga differentialdiagnoser är;

- hyperkalcemi med malignitetsbakgrund (lymfom, analsäckscarcinom, juvertumörer, tyreoidcarcinom, malignt melanom, multipelt myelom)
- hypoadrenocorticism
- kronisk njursvikt
- hypervitaminos D

(14, 18)

Hyperkalcemi ses hos så många som 10 - 40 % av alla hundar med lymfom. Symtomen utgörs av varierande grad av polyuri, polydipsi, anorexi, illamående, kräkningar, dehydrering och koma. Symtomen från hyperkalcemin kan vara mycket besvärande och blir oftast det största problemet för dessa patienter. Mekanismen bakom hyperkalcemi vid många tumörsjukdomar, t.ex. malignt lymfom, är att tumörcellerna frisätter ämnen som liknar parathormon, så kallade PTH-relaterade protein (PTHrP). Dessa molekyler är större än parathormonet, men har strukturella likheter med PTH:ts aktiva yta och kan därmed efterlikna PTH så pass att de binder in till samma receptorer (pseudohyperparatyreoidism).⁽¹²⁾

PTHrP har även detekteras med hjälp av immunohistokemisk färgning i en rad olika *normala* vävnader. Man anser att dessa peptider har en viktig funktion i normal juver- och tandutveckling samt spelar roll i kalciumhomeostasen under laktation.⁽¹⁴⁾ PTHrP kan inducera benresorption och orsaka minskad utsöndring av kalcium via njurarna, men anses inte kunna stimulera njurarnas syntes av calcitriol. PTHrP är så pass olik PTH att det inte sker någon korsreaktion vid blodanalys avseende PTH såvida man använder en analysmetod avsedd för mätning av intakt PTH sk. "two-site-PTH-assay".⁽¹⁸⁾

Vid andra typer av tumörsjukdomar, t.ex. multipelt myelom, producerar tumörcellerna lokala osteoclastaktiverande faktorer och det är dem som i dessa fall orsakar hyperkalcemin.⁽¹⁸⁾

Vid all typ av hyperkalcemi med malignitetsbakgrund genomgår paratyreoidea atrofi som svar på den höga kalciumnivån i blodet. Detta gör att nivån av riktigt PTH sjunker.⁽²⁾

Hyperkalcemi vid hypoadrenocorticism (Addisons sjukdom) är oftast mild och övergående med rätt terapi mot den underliggande sjukdomen. Hyperkalcemi associerad till hypervitaminos D kan uppkomma som komplikation vid alltför lång och intensiv behandling med vitamin D hos hypoparatyreoidea patienter. Hyperkalcemin i dessa fall ses oftast tillsammans med hyperfosfatemi, eftersom vitamin D ökar upptaget av både kalcium och fosfat från tarmen.^(8, 18)

Hypokalcemi

Den vanligaste orsaken till att hypokalcemi ses på ett blodprov från hund är hypoalbuminemi. Hypoalbuminemi orsakar ett falskt lågt värde av kalcium och dessa djur har inga kliniska symtom på hypokalcemi. Därför är det viktigt att vid hypoalbuminemi korrigera kalciumvärdet med avseende på albumin.

Kraftig hypokalcemi, utan samtidig hypoalbuminemi är oftast orsakad av eklampsi eller hypoparatyroidism (se nedan). Mild, vanligen asymtomatisk hypokalcemi kan ses vid akut och kronisk njursvikt och akut pancreatit. ⁽²¹⁾

Paratyreoidea

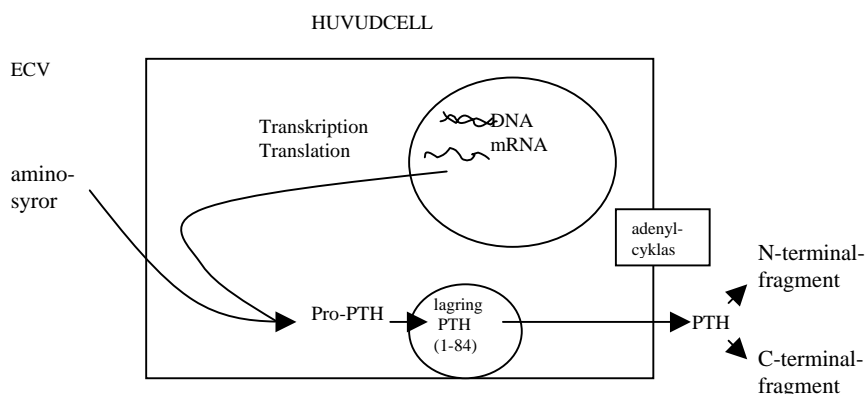
Paratyreoidea hos hund består av fyra körtlar. De externa körtlarna (2st) är ovala och mäter ca. 2 - 5 mm i längd och 0,5 - 1,0 mm i bredd. Dessa ligger inbäddade i den lösa bindväven kranialt och dorsolateralt om den främre poolen av tyreoidea. De inre körtlarna (2st), är mindre och mer platta i sin struktur än de externa parat. Dessa ligger på tyreoideas dorsala yta, innanför tyreoideas fibrösa kapsel. ^(6, 16,17)

Paratyreoidea består av två celltyper; huvudceller och så kallade oxyphila celler. Det är huvudcellerna som står för syntes och sekretion av parathormon (PTH) medan de oxyphila cellerna är biologiskt inaktiva. Funktionen av dessa celler är ännu inte klarlagd, dock ökar de i antal med stigande ålder. ^(6, 11, 17)

Parathormon

Syntes och nedbrytning

Parathormon (PTH), är en polypeptid bestående av 84 aminosyror ordnade i en enkel kedja utan disulfidbryggor. Molekylvikten är ungefär 9500 daltons. Parathormon syntetiseras av huvudcellerna som ett 115 aminosyror långt *proPTH*. En proteolytisk klyvning vid NH₂-terminalen genererar ett *proPTH* (90 aminosyror). Innan sekretion förändras polypeptiden igen och ytterligare sex aminosyror klyvs bort. Detta genererar slutprodukten, det biologiskt aktiva parathormonet. Aktivt PTH kan antingen utsöndras direkt, om blodets Ca²⁺-nivå är för låg, eller lagras i sekretoriska granula i huvudcellerna, se figur 1. ^(2, 6, 17)



Figur 1. Syntes och lagring av PTH i parathyroideas huvudceller⁽⁶⁾

Nedbrytning av PTH sker framförallt i lever och njure. Halveringstiden för hormonet är kort, i genomsnitt 20 minuter hos de flesta djurarter.⁽⁶⁾ Nedbrytningen genererar ett N-terminalfragment samt de mer långlivade C-terminal- och mittregionfragmenten. N-terminalfragmentet är den del som innehåller den biologiska aktiviteten.⁽⁴⁾ Nedbrytningsprodukterna lämnar kroppen via urinen. Beroende på den glomerulära filtrationen i njurarna kan vid njursjukdom vissa fragment av PTH kvarstå i blodomloppet en längre tid än normalt. Denna förhöjda nivå av PTH fragment i blodet speglar ej en funktionsrubbnig av paratyreoidea (hyperparatyroidism), utan är istället en indikation på en försämrad njurfunktion. Detta har tidigare ställt till bekymmer vid analys av PTH i blod, då man inte kunnat specificera analysmetoderna för mätning av intakt PTH utan att få med de olika metaboliterna.^(4, 19, 20, 21)

Reglering

Jämfört med andra endokrina system i kroppen, har paratyreoidea ett unikt feedbackkontrollsystem baserat framförallt på blodkoncentrationen av joniserat kalcium (Ca^{2+}). Låga koncentrationer av Ca^{2+} i blodet stimulerar till syntes och frisättning av PTH, medan höga koncentrationer inhiberar. En förändrad Ca^{2+} -nivå i plasma ger effekt på PTH-sekretionen inom bara några minuter. Ca^{2+} -koncentrationen i blodet påverkar inte bara sekretion och syntes av PTH, utan även andra intracellulära och metaboliska processer i paratyreoideas huvudceller.^(2, 15)

Effekt

Parathormon binder till sina specifika receptorer i målorganen, framför allt njurar och benvävnad. Detta leder till en ökning av cykliskt AMP (cAMP) i cellerna. cAMP fungerar som en "second messenger" och startar en kaskadreaktion inuti cellerna. I njurarna leder denna reaktion till;

- ökad reabsorption av kalcium från det glomerulära filtratet
- ökad sekretion av fosfat

- aktivering av 1- α -hydroxylas, det enzym som katalyserar calcitriolbildningen ⁽¹⁵⁾

PTH mobiliserar kalcium, och även fosfor, från benvävnad. Den omedelbara effekten av PTH involverar "osteocyt-osteoblast-pumpen" som förflyttar kalcium från benvävnaden till den extracellulära vätskan. En konstant förhöjd PTH nivå, som vid hyperparatyreoidism, ger mer långsiktiga förändringar i skelettet. Dessa förändringar innebär en ökad osteolys till följd av osteoclastaktivering. Paradoxalt nog orsakar PTH även en ökning av antalet osteoblaster vilket bidrar till nybildning av ben. De nedbrytande processerna går dock oftast fortare än de uppbyggande varför detta i slutänden leder till en demineralisering av benvävnaden. ⁽¹⁸⁾ Då mineralerna försvinner från skelettet ersätts dessa av omogen fibrös bindväv. Detta tillstånd kallas *osteodystrofia fibrosa* och ses vid uttalad hyperparatyreoidism. ⁽²⁾

Mätning av PTH i blodet

Som nämnts tidigare, finns det olika former av PTH cirkulerande i blodet. Det är dels det intakta parathormonet, och dels de olika metaboliterna (C-terminal, N-terminal, mittfragment). Metaboliterna utsöndras via njurarna. C-terminalfragmentet, som har mycket längre halveringstid än de övriga fragmenten, ackumuleras därför vid njurskada. ^(4, 18)

De första metoderna för att mäta PTH i blod var utformade så att de specifikt mätte halten C-terminal- eller mittfragment i blodet. På så sätt fick man en mätning både av det intakta hormonet och dess metaboliter. Detta gav naturligtvis inget bra värde på paratyreoidernas funktion. Utvecklingen har dock gått framåt och en "two-site" mätmetod har utvecklats, vilket innebär att antikroppar binder både till C-terminalen och N-terminalen av parathormonet och på så sätt kommer endast det intakta PTH:t att mätas. Den här typen av analysmetod framtoogs först för humant bruk. Den är dock även utprovad för att fungera på hundar. För att underlätta differentialdiagnostiken vid hyperkalcemi, rekommenderar man att PTH-analyserna körs parallellt med analys av antingen totalkalcium eller joniserat kalcium, se figur 2. ^(4, 5, 7, 18, 20)

Ca ²⁺ -nivå	PTH-nivå	Tolkning
normal	normal	Kalciumregleringen fungerar optimalt.
låg	hög	PTH svarar korrekt, andra test krävs för att få veta varför hypokalcemi föreligger.
låg	normal/låg	PTH svarar inte korrekt. Har troligen hypoparatyreoidism.
hög	hög	Paratyreoiderna producerar för mkt PTH. Någon form av hyperparatyreoidism.
hög	låg	PTH svarar korrekt. Andra tester krävs för att få veta varför hyperkalcemi föreligger.

Figur 2. Tolkning av Ca²⁺-nivå i kombination med PTH-nivå ⁽²⁰⁾

Hyperparatyreoidism

Hyperparatyreoidism är det patologiska tillstånd då det finns för mycket parathormon i cirkulationen. Hyperparatyreoidism kan vara antingen *primär* eller *sekundär*. Den primära formen beror på en hypersekretion av PTH från huvudcellerna i paratyreoidea. Denna hypersekretion beror i sin tur oftast på en solitär, funktionell adenombildning av huvudceller, men kan även vara orsakad av hyperplasi av en eller flera av körtlarna. Det är ytterst sällsynt att sjukdomen orsakas av ett carcinom i paratyreoidea. ^(1, 3, 15)

De kliniska manifestationerna av primär hyperparatyreoidism beror på att PTH orsakar en hyperkalcemi. Sjukdomen kan vara helt asymtomatisk eller leda till allt ifrån milda till svåra systemiska symtom i form av anorexi, kräkningar, depression, polyuri, polydipsi och muskelsvaghet. ⁽¹⁵⁾ Hundar med hyperkalcemi kommer oftast till veterinär på grund av trötthet och PU/PD. Vid undersökning är det inte ovanligt att hjärtarytmier upptäcks till följd av hyperkalcemin. Symtomens svårighet och intensitet är dock inte korrelerad till graden av hyperkalcemi. ⁽⁶⁾

Den ökade utsöndringen av kalcium via njurarna kan predisponera för urinstensbildning och sekundära urinvägsinfektioner. I ett senare skede av sjukdomen utvecklas nefrokalcinos och därmed så småningom njursvikt. ^(1, 2, 3, 7)

Den sekundära formen av hyperparatyreoidism är en adaptiv ökning av PTH insöndringen, som ej är relaterat till patologiska tillstånd i själva paratyreoidea. Den ökade PTH insöndringen i detta fall beror på en kroniskt låg plasmakoncentration av joniserat kalcium (Ca^{2+}). Flera olika tillstånd kan leda till hypokalcemi, men hos hund finns egentligen bara två, där man ser kliniska symtom i form av sekundär hyperparatyreoidism. Dessa sjukdomstillstånd är nutritionell kalciumbrist och kronisk njursvikt. ⁽¹⁵⁾

Nutritionell sekundär hyperparatyreoidism

Nutritionell kalciumbrist ses inte så ofta längre. Detta beror troligen på en allt bättre kunskap vad gäller utfodring av hundar. När sjukdomen uppträder, är det framförallt på unga, snabbväxande individer som enbart utfodras med animalisk föda. Den låga kalciumhalten i blodet stimulerar till PTH frisättning. Eftersom inget kalcium finns att tillgå från tarmen, sker kalciummobiliseringen från skelettet. Detta leder till en demineralisering av skelettet vilket är mycket ödesdigert för unga växande individer. Symtom som ses är smärta från extremiteterna, hälta, ovilja till rörelse, patologiska frakturer mm. För att bota detta tillstånd krävs total immobilisering (bur) i flera veckor, samt naturligtvis en förändrad diet. Mycket dåliga patienter kan behandlas med intravenöst kalciumglukonat samt smärtlindring. Prognosen är generellt bra såvida inte tillståndet kompliceras av svåra patologiska frakturer och deformationer i skelettet. ^(7, 18)

Renal sekundär hyperparatyroidism

Vid progressiva njursjukdomar, reduceras den glomerulära filtrationen och man får därmed en dålig sekretion av fosfat samt en dålig reabsorption av kalcium. Detta i kombination med en minskad produktion av calcitriol i njurarna, och därmed ett minskat upptag av kalcium i tarmen, leder till utveckling av hypokalcemi. Hypokalcemin stimulerar PTH sekretionen och leder vanligen till en hypertofi av paratyreoidea. De kliniska symtomen är anorexi, kräkningar, polyuri, polydipsi, det vill säga symtom på kronisk njursjukdom. Först vid långt gångna fall börjar man se symtom på sekundär hyperparatyroidism. Detta ses som förändringar i skelettet. Förändringarna kan vara allt ifrån milda till kraftiga i form av fibrös osteodystrofi. Urkalkningen av skelettet är oftast mest uttalad i ansiktets ben. Käkarna kan bli så urkalkade att de till och med blir böjbara ("rubber jaw") och djuret får svårt att stänga munnen. Tänderna kan också lossna från sina infästningar.^(15, 18) Dessa kraftiga symtom på sekundär hyperparatyroidism är ovanliga, men kan ses framförallt på unga hundar med medfödda njurdefekter. Äldre djur som utvecklar njursjukdom lever oftast inte tillräckligt länge för att dessa symtom ska hinna inträda.⁽¹⁸⁾

Generellt sett är prognosen alltid dålig vid kroniska njursjukdomar. Faktorer som inverkar är bland annat;

- graden av kliniska symtom
- möjligheten för njurarna att i det enskilda fallet förbättra sin funktion
- hastighet av sjukdomsförloppet med och utan terapi
- djurets ålder⁽⁷⁾

Det viktigaste sättet att behandla eller förhindra utvecklingen av renal osteodystrofi är att minska halten fosfor i blodet. Detta görs dels genom ett minskat intag av fosfor via födan, och dels genom att i möjligaste mån förhindra absorption av fosfor i mag-tarmkanalen. Aluminium- och kalciuminnehållande fosfatbindare finns att tillgå och kan ges via födan. Man kan också administrera kalcium- och vitamin D tillskott för att korrigera kalcium/fosfor balansen.⁽¹⁸⁾

Hypoparatyroidism

Hypoparatyroidism är en ovanlig endokrin sjukdom. Tillståndet beror antingen på en minskad PTH-sekretion eller en minskad funktion av hormonet. Det senare kan bero på utsöndring av biologiskt inaktivt hormon eller på dåligt svar hos målcellerna (pseudohypoparatyroidism). Detta har dock hittills aldrig setts hos hund vilket gör att man anser att hypoparatyroidism är orsakat av en alltför låg eller totalt utebliven PTH insöndring.^(15, 18)

Det finns i princip två bakomliggande orsaker till PTH-brist. Dessa är radikal kirurgi i området för paratyreoidea (oftast vid extirpation av tyreoidea eller vid kirurgisk terapi av primär hyperparatyroidism), eller idiopatisk sjukdom.⁽¹⁵⁾

Den idiopatiska formen drabbar medelålders till vuxna djur och är oftast ett resultat av en initial, diffus infiltration av lymfocyter och plasmaceller i paratyreoidea. Det funktionella parenkymet ersätts successivt med fibrös bindväv.
(6, 18)

Symtom på hypokalcemi kan uppträda mycket snabbt. Dessa symtom är framför allt neurologiska och neuromuskulära störningar som yttrar sig i form av kramper och krampliknande tillstånd. Den första diagnosen blir därför oftast felaktigt idiopatisk epilepsi, och många av dessa patienter behandlas med antikonvulsiva innan rätt diagnos ställts. Symtomen kan även vara mildare och inkludera ataxi, depression, svaghet, inappetenz, kräkningar och diarré.⁽⁸⁾

Det snabbaste och lättaste sättet att diagnosticera hypoparatyreoidism är genom ett blodprov. Där förväntar man sig hitta en låg/subnormal PTH-nivå och lågt kalcium, se figur 2. En biopsi av paratyreoidea kan visa på lymfocytär paratyreoidit eller fibrös atrofi, men det bör tilläggas att en atrofisk paratyreoidea kan vara omöjlig att hitta.^(6, 8, 15)

Material och metoder

Analysmetoder

Analys 1: IMMULITE Intact PTH

Detta är en immunologiskt uppbyggd analysmetod för kvantitativ mätning av intakt parathormon i serum och plasma hos människa. Antikroppar riktade mot specifika delar av parathormonet binder hormonet i små glasbehållare, sk. testenheter. Därefter tillsätts enzyminmärkta antikroppar riktade mot en annan specifik del av hormonet. Andelen hormon i provet avläses sedan med hjälp av luminiscens. Att antikropparna binder till två olika ställen på molekylen ("two-site") gör att endast det intakta PTH:t kommer att mätas.

Provet bör vara fastprov taget på morgonen. Blod tas i serumrör eller EDTArör. Både serum och plasma skall separeras från cellfraktionen så fort som möjligt. För serum gäller att centrifugering skall ske i kyla. För EDTA gäller att provet under hela tiden skall hanteras i kyla (2 – 8°C), detta gäller såväl vid provtagningen som vid centrifugering.

Proverna (både serum och plasma) är, efter centrifugering, hållbara i upp till 8 timmar i kyla (2 - 8°C). För längre förvaring måste proverna frysas (- 20°C) och är då hållbara i upp till två månader.

Kalibreringsområdet för analysen är upp till 2500 pg/ml (263 pmol/l) och den analytiska sensitiviteten är 1 pg/ml (0,1 pmol/l). DPC:s (Diagnostic Products Corporation) egna referensvärden för PTH hos människa uppmätt med denna

metod är 7 - 53 pg/ml eller 0,7 - 5,6 pmol/l. Man rekommenderar dock att varje laboratorium tar fram sina egna referensvärden. ⁽⁵⁾

Analys 2: Coat-A-Count Intact PTH IRMA

Coat-A-Count Intact PTH IRMA (immunoradiometric assay) är en analysmetod framtagen för kvantitativ mätning av intakt parathormon i serum från människa. I korthet går metoden ut på att man med hjälp av fasta antikroppar (i förcoatade provrör) mot PTH fångar upp det intakta PTH:t i provet. Därefter tillsätts ytterligare antikroppar, denna gång radioaktivt inmärkt sådana (¹²⁵I). De radioaktiva antikropparna fäster till de uppfångade PTH molekylerna. Överskottet av radioaktiva antikroppar tvättas sedan bort med en buffrad lösning. PTH koncentrationen i provet är direkt proportionell mot radioaktiviteten som finns kvar i de förcoatade rören efter tvätt. Radioaktiviteten mäts med en gammarräknare och koncentrationen av PTH räknas ut genom att jämföra provets count-per-minute (CPM) med kända koncentrationer i standardlösningar.

Man har sett en stegring av PTH nivån under natten och rekommenderar därför att provet tas efter kl. 07:00 på morgonen och helst efter en fastande natt. Blodet skall tas genom venpunktion och samlas upp i serumrör alternativt EDTA rör, det är då mycket viktigt att det inte blir hemolys i provet.

För serumprover gäller sedan att provet skall sedimentera och koagulera vid en temperatur av 2 - 8°C. Därefter separeras serumet från cellfraktionen. Om centrifugering sker skall denna ske i kyla. Serumet är sedan hållbart vid 2 - 8°C i upp till 8 timmar och vid - 20°C i upp till 2 månader.

För EDTA prover har studier visat att intakt PTH hålls stabilt i helblod i upp till 72 timmar vid en temperatur av 15 - 28°C (rumstemperatur) förutsatt att ingen hemolys skett. Plasma (EDTA) är hållbart i - 20° i upp till två månader.

Kalibreringsområdet för analysen är 15 - 3000 pg/ml (1,6 - 315,9 pmol/l) och den analytiska sensitiviteten är 1,0 pg/ml (0,1 pmol/l). DPC:s egna referensvärden för PTH hos människa uppmätt med denna metod är 12 - 72 pg/ml eller 1,3 - 7,6 pmol/l. Man rekommenderar dock att varje laboratorium tar fram sina egna referensvärden. ⁽⁴⁾

iSTAT för mätning av Ca²⁺

iSTAT är en blodanalysapparat i mikroformat som bygger på mikrofabricerade tunna filmelektroder. I analysarbetet använder man sig av små kassetter för engångsbruk. Dessa laddas med aktuellt blodprov och sätts sedan in i den portabla avläsningsmaskinen. I kassetterna finns allt det material som behövs för de olika biokemiska reaktionerna i analyserna. Blod och kalibreringsvätskor förblir under hela analysarbetet inneslutna i kassetten och det är även i kassetten som själva sensorn sitter.

iSTAT används för analys av elektrolyter, blodgaser och hematologi. Olika kassetter används för olika typer av parametrar. För analys av elektrolyter används en kassett som heter CG8+. Denna kassett mäter, förutom Ca^{2+} , även pH, Na^+ , K^+ , Htk, Hb, Glukos, Base excess, syremättnad, PCO_2 och PO_2 . Elektrolytkoncentrationen mäts med hjälp av en jonselektiv elektrod.

Enligt bruksanvisningen för iSTAT (utfärdad av Abbott Scandinavia AB, Solna) skall kassetterna långtidsförvaras i kyla. Kassetterna bör ha antagit rumstemperatur innan användandet, detta beräknas ta 5 minuter. Blod som kan användas är ven-, artär- eller kapillärblod. Vid analys av joniserat kalcium skall balanserat heparin användas som antikoagulantia. Abbott marknadsför särskilda kapillärrör med balanserat heparin i. I detta projekt har dessa kapillärrör använts och jämförts med andra blodberedningar vid analys av Ca^{2+} i iSTAT, se resultat nedan. ⁽²²⁾

Djurgrupper

Referensgrupp 1

Blodprov från 14 kliniskt friska hundar av olika ras och ålder togs för att få ett referensunderlag för analys 1. Från varje hund togs två serumrör. Vid provtagningen användes vacutainerteknik och blod togs från vena cephalica i höger eller vänster framben. Analysen skedde direkt efter provtagningen (<8 timmar).

Referensgrupp 2, en pilotstudie

Fyra kliniskt friska hundar av olika ras och ålder (tabell 1) användes för kontroll av analys 2, för kontroll av iSTAT Ca^{2+} - analysen samt för hållbarhetsstudier på EDTA-blodet utan centrifugering vid analys 2.

Tabell 1. Referensgrupp 2, en pilotstudie

Ras	Kön	Ålder (år)	Faste- prov ja/nej	PTH (pmol/l) Serum 2003-06- 02	PTH (pmol/l) plasma (EDTA) 2003-06- 02	PTH (pmol/l) plasma (EDTA) 72h förvaring	PTH (pmol/l) infrys- t serum 2003-09- 18	Ca^{2+} (mmol/l) balanserat hep. 2003-06-02
Lab. retr.	hane	2	ja	2,5	2,4	1,6	3	1,47
Gordon- setter	hane	11	ja	2,6	3,6	2,1	3,2	inget värde
Briard	hane	7	ja	2	2,3	1,7	inget värde	inget värde
Schäfer	hane	8	ja	5	4,8	4,7	6,2	1,27

Provtagningstekniken var densamma som för referensgrupp 1. Från varje hund togs ett serumrör och två EDTArör. Direkt efter provtagningen analyserades Ca^{2+} med hjälp av iSTAT analysen från helblod utan tillsats (serumrör). Helblod sögs upp med hjälp av ett kapillärrör innehållande balanserat heparin som antikoagulantia. Serumet användes därefter även till PTH analysen (analys 2)

direkt efter provtagning samt efter frysförvaring i cirka 3 månader vid en temperatur av - 20°C. Det ena EDTA röret analyserades direkt efter provtagning med avseende på PTH i plasma medan det andra förvarades i rumstemperatur, utan centrifugering, i 72 timmar innan plasman analyserades. Samtliga PTH-analyser är körda i parprov. I de fall värdena avvikit från varandra är ett medelvärde angivet.

Referensgrupp 3

Blodprov från 15 kliniskt friska hundar i olika åldrar, alla av rasen beagle, togs för att få ett referensunderlag för analys 2 samt för utvärdering av användande av olika blodberedningar i iSTAT Ca²⁺ -analysen (tabell 2). Från varje hund togs ett serumrör, ett heparinrör och ett EDTArör. Provtagningstekniken var densamma som för de tidigare grupperna.

Direkt efter provtagning analyserades Ca²⁺ med hjälp av iSTAT analysen från helblod utan tillsats (serumrör). Helblodet sögs upp med hjälp av ett specifikt kapillärrör med balanserat heparin som antikoagulantia (bal.hep). Därefter analyserades Ca²⁺ med samma apparatur men från heparinblod (hep). Denna gång användes vanlig spruta och kanyl för att suga upp blod och applicera detta i kassetten. Från sex av hundarna analyserades ytterligare ett heparinprov med avseende på Ca²⁺. Denna gång användes heparinblodet uppdraget i ett kapillärrör med balanserat heparin i (hep+bal.hep). Från samtliga 15 hundar analyserades även totalcalcium, totalprotein samt albumin. Dessa prover analyserades enligt sedvanliga metoder vid Inst. för klinisk kemi, SLU.

Från samtliga 15 hundar i denna grupp frystes proverna för PTH in (serum och EDTA-plasma) och förvarades frysta, vid en temperatur av - 20°C, i fem veckor innan analys. Samtliga PTH-analyser är körda i parprov. I de fall värdena avvikit från varandra är ett medelvärde angivet.

Tabell 2. Referensgrupp 3 (samtliga hundar är av rasen beagle, samtliga prov är fasteprover)

hund nr.	Kön	Ålder (år)	totCa (mmol/l) plasma (EDTA)	totCa (mmol/l) Serum	albumin (g/l) serum	protein (g/l) serum	korrt. totCa (mmol/l) (*)	Ca ²⁺ (mmol/l) bal.heparin	Ca ²⁺ (mmol/l) heparin	Ca ²⁺ (mmol/l) hep.+bal.hep	PTH (pmol/l) serum	PTH (pmol/l) plasma (EDTA)
1a	Hane	8	2,8	2,7	34	65	2,73	inget värde	1,33	ej mätt	3,9	3,5
2a	Hane	5	2,7	2,6	30	59	2,73	1,32	1,35	ej mätt	2,7	1,8
3a	Tik	6	2,6	2,6	30	63	2,73	1,25	1,29	ej mätt	3	2,4
4a	Tik	4	2,6	2,6	28	55	2,78	1,32	1,33	ej mätt	3,5	2,8
5a	Hane	4	2,7	2,7	34	65	2,73	1,28	1,32	ej mätt	2,7	1,6
6a	Hane	5	2,7	2,7	31	59	2,80	1,27	inget värde	ej mätt	4,2	1,9
7a	Tik	7	2,9	2,7	29	60	2,85	1,26	1,29	ej mätt	1,9	1,8
8a	Tik	4	2,8	2,7	31	60	2,80	1,28	1,32	ej mätt	4,1	2,7
9a	Tik	5	2,8	2,7	30	65	2,83	1,35	1,35	ej mätt	4,4	2,2
10a	Tik	5	2,7	2,6	34	61	2,63	inget värde	1,43	1,28	4,5	2,8
11a	Tik	5	2,7	2,5	31	60	2,60	1,27	1,36	1,27	2,3	2
12a	Hane	4	2,8	2,7	31	69	2,80	1,39	1,4	1,3	1,6	1
13a	Hane	6	2,6	2,5	32	58	2,58	1,22	1,27	1,2	1,7	1,9
14a	Hane	6	2,6	2,5	32	59	2,58	1,29	1,32	1,21	3,1	1,6
15a	Hane	4	2,7	2,7	33	61	2,75	1,3	1,36	1,26	3,2	3,5

* Enligt formeln: korrigerat Ca (mg/dl) = totCa (mg/dl) - albumin (g/dl) + 3,5

för att få enheten mmol/l används följande formel:

$$\text{Korrigerat Ca (mmol/l)} = [(\text{totCa (mmol/l)} \times 4) - (\text{albumin (g/l)} \times 0,1) + 3,5] \times 0,25 \quad (18)$$

Statistik

För statistiska beräkningar har STATA version 8 använts. Statistik är utförd i jämförande t-test mellan de olika blodberedningarnas analysresultat (serum resp. plasma och heparin resp. balanserat heparin) samt för att räkna fram konfidensintervall som utgör referensområden för de olika analyserna. Signifikans räknas vid $p < 0,05$.

Resultat

Analys 1 samt pilotstudie

Resultaten från analys 1 visade för samtliga prover ett PTH-värde som var $< 0,1$ pmol/l, vilket innebar mindre än analysens känslighetsområde, dvs. ej mätbara nivåer. Därför förkastades analys 1 i ett relativt tidigt stadium av projektet.

En pilotstudie för att testa analys 2 samt iSTAT-analysen inleddes istället. Vid denna studie användes endast 4 hundar, vilket är ett för litet material för att använda som referensunderlag. Resultaten från pilotstudien (tabell 1) lärde oss att hantera proverna adekvat samt gav oss en inblick i hur analys 2 och iSTAT-analysen var uppbyggda.

I pilotstudien ingick även ett hållbarhetstest av EDTA-blodet för att se om, och eventuellt hur mycket PTH-nivån förändrades vid en förvaring av helblod i rumstemperatur i 72 timmar innan centrifugering. Resultaten visade att hos samtliga hundar sjönk PTH-nivån vid förvaring i 72 timmar jämfört med analys direkt efter provtagning. Hos en av hundarna sjönk PTH-värdet med mer än en enhet (1,5 pmol/l). Även här var materialet för litet för att man skall kunna dra några statistiska slutsatser.

Analys 2 samt iSTAT

Från referensgrupp 3 erhöles PTH-värden både från serum och EDTA-blod (plasma) från samtliga hundar (tabell 2). Däremot erhöles ej Ca^{2+} -värden från alla. Både serum och plasma hade varit fryst i fem veckor innan analys, vilket inte ska påverka analysresultatet enligt DPC (Diagnostic Products Corporation). Som framgår av tabell 2 var det tydliga skillnader i PTH-värdena uppmätta i serum respektive plasma (EDTA). Vid ett jämförande t-test mellan serum-PTH och plasma (EDTA)-PTH för varje enskilt prov framgår en statistisk signifikans; $p = 0,0008$.

Eftersom resultaten visar en signifikant (***) skillnad mellan PTH analyserat i serum respektive plasma (EDTA), bör man ange två olika referensområden för dessa blodberedningar. Referensvärdena i detta fall anges som det 95%-iga konfidensintervallet.

Referensvärden för PTH:
serum-PTH **2,6 – 3,7 pmol/l**
plasma (EDTA)-PTH **1,8 – 2,6 pmol/l**

Genom iSTAT metoden analyserades Ca^{2+} från helblod utan tillsats (serumrör), uppdraget i kapillärrör innehållande balanserat heparin som antikoagulantia. Resultat erhöles från 13 av 15 analyserade hundar (tabell 2). Från heparinblod uppdraget med spruta och kanyl erhöles värden från 14 av 15 analyserade hundar (tabell 2). Från 6 av hundarna analyserades även Ca^{2+} i heparinblod uppdraget med ovan nämnda kapillärrör. Vid denna analys erhöles värden från samtliga 6 analyserade hundar (tabell 2 "hep. + bal.hep").

Efter analys såg det ut som att värdena skiljde sig åt mellan proverna. Ett jämförande t-test utfördes därför för att kontrollera signifikans. Endast balanserat heparin- Ca^{2+} (bal.hep) och heparin Ca^{2+} är jämfört då dessa metoder är de som har klinisk relevans. Signifikans uppmättes, dock var standardavvikelsen mycket liten, vilket gör att biologisk signifikans inte är troligt i detta fall. Värdena ansågs ligga så nära varandra att ett gemensamt 95 %-igt konfidensintervall för värdena uppmätta i balanserat heparin (bal.hep.) och heparin får utgöra våra referensvärden för Ca^{2+} . Det 95 %-iga konfidensintervallet blir i detta fall (27 observationer medräknade) 1,30 mmol/l – 1,33 mmol/l. Detta är ett mycket snävt intervall vilket beror på att standardavvikelsen för mätvärdena är väldigt liten. Därför anges här även medelvärde för observationerna samt min- och maxvärden.

Referensvärden för Ca^{2+} analyserat med iSTAT:
balanserat heparin eller heparin: **1,30 – 1,33 mmol/l**
medelvärde: 1,32 mmol/l min: 1,22 mmol/l max: 1,43 mmol/l

Hundarna i referensgrupp 3 analyserades också med avseende på totalcalcium (totCa) i såväl serum som plasma, serumalbumin och serumprotein. Detta för att kunna räkna ut andelen korriberat kalcium i varje prov. Skulle någon hund ha avvikit markant i någon av dessa parametrar, hade hunden utgått ur försöket. Alla hundar låg dock inom referensområdet och ansågs därför ha en normal total kalciumnivå i blodet vid tidpunkten för provtagningen.

Diskussion

Att en fungerande analys för parathormon i blod hos hundar är av stort medicinskt värde, råder det ingen tvekan om. Vid allt analysarbete som innebär applicering från humanmedicin till veterinärmedicin, krävs det dock noggrann kontroll och kritiskt granskande av metoderna innan man kan anse att dessa verkligen är applicerbara på det aktuella djurslaget.

I det här försöket har metoder som redan är utprovade på djurslaget hund använts, och syftet har främst varit att få fram referensvärden för det aktuella laboratoriet.

För att en analysmetod inom veterinärmedicinen ska få genomslagskraft bör den vara någorlunda lätt att genomföra, ha en relevant kostnad, ge ett snabbt och pålitligt analys svar samt ha god klinisk relevans. Om analys 1 (IMMULITE Intact PTH) hade fungerat optimalt hade vi uppnått dessa mål. Att analysen inte fungerade i vår studie har vi inte något svar på. Man har tidigare, vid samma laboratorium på Inst. för klinisk kemi, lyckats analysera prover innehållande mycket höga nivåer av PTH från hund med denna metod, men aldrig provat analysen på friska djur. Vår hypotes var därför till en början att våra friska hundar aldrig når upp till de nivåer av PTH som maskinen kräver för att kunna detektera dem. Tillverkaren av metoden, DPC, har angivit referensvärden gällande för människa (0,7 – 5,6 pmol/l) framtagna med denna analys, och dessa torde inte ligga långt ifrån förväntade värden hos friska hundar (vi uppmätte med analys 2: 2,6 - 3,7 pmol/l i serum). Vår nuvarande hypotes varför analysen inte fungerar är istället att antikropparna inte binder tillräckligt till hund-PTH, och att vi därför inte får några mätvärden. Vidare studier för att ta reda på om så är fallet vore mycket intressant.

I vår pilotstudie av analys 2 (Coat-A-Count Intact PTH IRMA) såg vi tendenser till att PTH-nivån sjönk ganska drastiskt under 72 timmars förvaring vid 24°C av EDTA-blod. Detta är dock inte konfirmerat statistiskt då provmaterialet anses för litet för att dra slutsatser ifrån. DPC ger i sina anvisningar avseende analysen (för humant bruk), upplysningen att ingen förändring i PTH-nivå skall ske under förvaring av EDTA-blod i upp till 72 timmar, detta förutsatt att ingen hemolys sker. I våra prover skedde ingen hemolys. Enligt Torrance & Nachreiner (1989a) minskar PTH-nivån i hundblod med 15 % under förvaring vid 24°C i 2 - 24 timmar, dessa siffror gäller såväl serum som EDTA-blod. Hur DPC hanterat sina prover och varifrån de fått hållbarhetsstudien framgår inte av analysmanualen. Det kan till och med vara så enkelt att humant PTH är hållbart i upp till 72 timmar, medan hund PTH är mer känsligt och kräver kyld hantering.

Vi har inte studerat huruvida förvaring av EDTA-prover enbart som plasma påverkar PTH-nivån. Eftersom det förekommer att ett EDTA-prov i form av helblod som sänds med post genomgår viss hemolys, har vi själva dragit slutsatsen att det borde vara bättre att skicka enbart plasma. Det vill säga, provtagande veterinär ute i landet tar blod i EDTA-rör, centrifugerar ner blodkropparna och skickar enbart plasman för analys (liknande förfarande rekommenderas för alla EDTA-provsanalyser som skickas till Inst. för klinisk kemi).

Vid provtagning av referensgrupp 3, hade det varit önskvärt att kunna analysera PTH från både EDTA-prov (plasma) och serum i direkt anslutning till provtagning samt att sedan jämföra dessa resultat efter en tids infrysning. Detta blev tyvärr inte möjligt då ett fel från huvudleverantören gjorde att vi fick vårt PTH-kit en månad senare än beställt. Detta gjorde att vi frös in samtliga prover (plasma och serum)

direkt efter provtagning. Analys av proverna skedde först fem veckor senare, då analyskittet anlönt. Enligt DPC skall infrysning och upptining inte påverka PTH-nivån, förutsatt att den totala frysförvaringstiden inte överskrider 2 månader. Torrance & Nachreiner (1989a) har i sitt försök visat att det inte sker någon signifikant minskning av PTH-nivån i serum vid upprepad infrysning och upptining. Något liknande försök avseende plasma gjordes inte i deras studie. I samma studie skedde första infrysningen vid en temperatur av - 40°C. Enligt DPC skall dock en temperatur av - 20° vara tillräcklig ⁽⁴⁾.

Inom ramen för projektet skickades en intresseenkät ut till fem stora djursjukhus i Mellansverige. Enkäten innehöll en erbjudan om att kostnadsfritt få delta i studien genom att skicka in prover från hundar med misstänkt rubbad PTH-nivå. Endast ett av fem djursjukhus svarade på enkäten och sade sig vara intresserade av att delta. Några blodprover skickades dock aldrig in. Min egen hypotes kring detta är att djursjukhusen ute i landet idag befinner sig i en sådan tidspressad situation att man inte hinner ta till sig all information som kommer med post. Dessutom misstänker jag att man anser att denna typ av diagnostik är litet för avancerad. Det är kanske inte så ofta man misstänker hyperparatyreoidism men desto oftare har man att göra med en rubbad kalciumhomeostas.

Slutresultatet av PTH analysen är att vi fått fram referensvärden som bör vara pålitliga. De ligger inom samma område som det humana referensvärdet för samma analys, vilket talar för att analysen troligen är känsligast inom detta område. Våra referensintervall för PTH blev relativt snäva jämfört med vad som anges i litteraturen för andra laboratorium. Detta beror med största sannolikhet på att hundarna i vår referensgrupp skiljde sig åt mycket lite i PTH-nivå. Det vill säga; standardavvikelsen och därmed även variansen blir liten vilket i sin tur ger ett snävt konfidensintervall. Skall analysen användas i framtiden kan det vara av betydelse att ta hänsyn till detta vid tolkning av eventuellt höga PTH-nivåer. Det högsta värdet vi uppmätte från referensgrupp 3 var 4,5 pmol/l och trots att detta värde inte ligger inom de nämnda referensintervallen i denna studie, bör värdet ändå betraktas som normalt.

Frågetecken kvarstår huruvida parathormonet hålls stabilt vid förvaring av plasma i rumstemperatur. En hållbarhet på upp till 24 timmar är naturligtvis en förutsättning för att kunna erbjuda analysen till kliniker och djursjukhus ute i landet, såvida inte kyld transport anses aktuellt. Eftersom intresset för analysen ute i landet hittills varit ringa, och den ännu så länge är mycket kostsam kan man starkt ifrågasätta värdet av att sätta upp metoden som rutinanalys vid ett laboratorium.

Vid all analys av joniserat kalcium (Ca^{2+}) har i denna studie den lilla iSTAT-apparaten använts. Detta är en mikroanalysapparat främst framtagen för användning inom human akutsjukvård. iSTAT är mycket lätt att använda och det tar endast ett par minuter innan analysresultatet fås. Några fördjupade studier över analysmetodens säkerhet och applicerbarhet på djurslaget hund är inte utförd i denna studie. iSTAT används rutinmässigt vid KM smådjurs eget

internlaboratorium och man anser där att apparaten fungerar tillfredsställande och ger tillförlitliga värden. Vid analys av just Ca^{2+} rekommenderas att man ska använda specifika kapillär rör innehållande balanserat heparin som antikoagulantia. Detta förfarande är säkert bra inom human vård där man ofta använder sig av kapillärblod för blodanalyser. På våra djur är detta lite mer komplicerat och vi använder istället oftast venöst blod. För att få blodet i kapillär rören måste man således först ta ett vanligt blodprov i ett serumrör och därefter snabbt, innan blodet hinner koagulera, överföra en liten mängd blod i nämnda kapillär rör. Detta förfarande blir krångligt och kräver dessutom att hunden i princip befinner sig bredvid analysapparaten. Vi har därför undersökt skillnaden i Ca^{2+} -nivå beroende på om man analyserar blodet på detta sätt eller om man tar ett blodprov i ett vanligt heparinrör. Analys av vanligt heparinblod såg ut (tabell 2) att ge högre koncentration än analys av det balanserade heparinblodet. Detta var något motsägelsefullt då Abbott's motivering till användande av balanserat heparin var att vanliga heparinrör innehåller för mycket heparin vilket då binder kalciumjonerna och man får ett falskt lågt värde i sin analys. Skillnaden mellan analysresultaten för de olika blodberedningarna var dock mycket liten och vid statistisk undersökning av skillnaden kunde ingen signifikans fastställas.

Vårt referensintervall för Ca^{2+} fick därför utgöras av det 95 %-iga konfidensintervallet från alla prover sammantaget (heparin och bal.hep, totalt 27 prover), vilket gav oss ett intervall av 1,30 – 1,33 mmol/l. Detta intervall stämmer bra överens med referensvärden hämtade från litteraturen (1,12 – 1,42 mmol/l) ⁽²¹⁾, dock är vårt referensintervall väsentligt mycket mindre vilket återigen har att göra med en mycket liten standardavvikelse för våra mätvärden. Vi anser det därmed mer pålitligt att ange våra min- och maxvärden som gräns för vad som kan förmodas vara normalt dvs. 1,22 – 1,43 mmol/l.

Från och med vintern 03/04 kommer det att på Institutionen för klinisk kemi, SLU, Uppsala, finnas möjlighet att analysera joniserat kalcium. Dock inte med iSTAT som använts i detta projekt, utan man har köpt in komplement till redan befintliga maskiner på laboratoriet som gör denna analys möjlig. Huruvida det kommer att ske ytterligare försök för att få referensvärden för just denna metod är i skrivande stund oklart.

Summary

The calcium homeostasis in the body is normally strict regulated to be kept within very narrow limits. This regulation is due to the action of parathyroid hormone (PTH) which is synthesized in the chief cells of the parathyroid glands. In different diseases, the calcium homeostasis is disturbed and this could either be due to a dysfunction of the parathyroid gland itself, or it could have a completely different explanation. To investigate disturbed calciumhomeostasis, ionized calcium and PTH can be analyzed from a blood sample. There are a lot of different assays to measure PTH in humans. Some of these assays can also be used on dogs.

In this project a number of healthy dogs were used, and reference values for PTH for the Department of Clinical Chemistry, SLU, Uppsala, was established. The test method used is a “two-site PTH assay” (Coat- A- Count Intact PTH IRMA, from the DPC, Los Angeles, USA) and PTH has been analyzed both from serum and plasma. For analysis of ionized calcium (Ca^{2+}), a micro-blood analyzer (iSTAT) has been used. This analyzer was borrowed from the distributor (Abbott Scandinavia AB, Solna) and is commonly used for human emergency treatment.

Reference range for PTH in both serum and plasma and reference range for ionized calcium have been successfully obtained. The analysis of PTH requires a special treatment of the samples. The analysis is also quite complicated and expensive. Therefore, the question is if there is any profitability to set up this analysis as a routine-analysis. The analysis of ionized calcium requires some special equipment. This analysis from now on will be a routine-analysis in the Department of Clinical Chemistry.

Referenser

1. Berger B. & Feldman E.C. 1987. Primary hyperparathyroidism in dogs: 21 cases (1976-1986). *Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)*. Aug.1,1987, Vol 191, no 3
2. Carlton W.W. & McGavin M.D. 1995. *Thomson's Special Veterinary Pathology*. 2nd edition. Mosby-Year Book. St.Louis, USA
3. DeVries S.E, Feldman E.C, Nelson R.W. & Kennedy P.C. 1993. Primary parathyroid gland hyperplasia in dogs: six cases (1982- 1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)*. April 1, 1993, Vol 202, no 7
4. DPC (Diagnostic Products Corporation). 2003. *Coat-A-Count Intact PTH IRMA*. Analysmanual. DPC 2003-01-02. Los Angeles, USA
5. DPC(Diagnostic Products Corporation). 2002. *IMMULITE Intact PTH*. Analysmanual. DPC 2002-06-11. Los Angeles, USA
6. Drazner F.H. 1987. *Small Animal Endocrinology*. Churchill Livingstone. New York, USA
7. Ettinger S.J. & Feldman E.C. 2000. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 5th edition. Vol.2. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA
8. Feldman E.C. & Nelson R.W. 1987. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 2nd edition. W.B Saunders Company. Philadelphia, USA
9. Griffin J.E. & Ojeda S.R. 2000. *Textbook of Endocrine Physiology*. 4th edition. Oxford University Press. New York, USA
10. Jones Bernt. 2001." Mineralämnen" ur *Kompendium i klinisk kemi 2001*.
11. Junqueira L.C, Carneiro J. & Kelley R.O. 1998. *Basic Histology*. 9th edition. Appelton & Lange. Connecticut, USA
12. Kubota A, Kano R, Mizuno T, Hisasue M, Moore P.F, Watari T, Tsujimoto H. & Hasegawa A. 2002. Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) Produced by Dog Lymphoma Cells. *Journal of Veterinary Medical Science*. 64(9): 835-837, 2002
13. Nelson R.W. & Couto C.G. 1999. *Manual of Small Animal Internal Medicine*. Mosby. St.Louis, USA
14. Pressler B.M, Rotstein D.S, Law J.M, Rosol T.J, LeRoy B., Keene B.W. & Jackson M.W. 2002. Hypercalcemia and high parathyroid hormone-related protein concentration associated with malignant melanoma in a dog. *Journal of the American veterinary Medical Association (JAVMA)*. July 15. 2002, Vol 221, no 2

15. Rijnberk A. 1996. *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, the Netherlands
16. Sjaastad ØV, Hove K. & Sand O. 2003. *Physiology of Domestic Animals*. Scandinavian Veterinary Press. Oslo, Norge
17. Swenson M.J. & Reece W.O. 1993. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 11th edition. Cornell University Press. New York, USA
18. Torrance A.G. & Mooney C.T. 1998. *BSAVA Manual of Small Animal Endocrinology*. 2nd edition. BSAVA. United Kingdom
19. Torrance A.G. & Nachreiner R. 1989a. Human-parathormone assay for use in dogs: validation, sample handling studies, and parathyroid function testing. *American Journal of Veterinary Research*. July 1989. Vol.50. no 7
20. Torrance A.G. & Nachreiner R. 1989b. Intact parathyroid hormone assay and total calcium concentration in the diagnosis of disorders of calcium metabolism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. April-June. 1989. Vol. 3. no 2
21. Willard M.D, Tvedten H. & Turnwald G.H. 1999. *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. 3rd edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA
22. www.iSTAT.com Produktinformation för iSTAT-analyser 2003-09-10