

Fastställande av referensintervall för fibrinogen i plasma hos friska föl

Maria Tholander

Handledare: Bernt Jones
Institutionen för klinisk kemi

Examensarbete 2004:41
Veterinärprogrammet
Veterinärmedicinska fakulteten
SLU
ISSN 1650-7045
Uppsala 2003

Innehållsförteckning

Inledning, 3

Akutfasreaktionen/Inflammation, 3

Akutfasproteinerna, 3

Fibrinogen, 4

Fibrinogen som mätvärde, 4

Referensintervall, 5

Syfte, 6

Material och metoder, 6

Djurmaterialet, 6

Analysen, 6

Statistisk bearbetning, 6

Resultat, 7

Diskussion, 9

Referensintervallet, 9

Kontroll av stickprovet, 9

Raser, 11

Hingstar och ston, 11

Fibrinogen och ålder, 11

Fibrinogen för friska jämfört med sjuka, 12

Fibrinogenets utveckling vid sjukdom, 13

Slutsatser, 14

Summary, 15

Referenser, 16

Inledning

I det veterinära praktiska utövandet, och framförallt inom klinikverksamheten är blodanalyser viktiga diagnostiska hjälpmedel. Olika blodanalyser kan säga mycket om en sjukdoms art, samt vara viktiga vid diagnosställande. I vissa situationer är det avgörande med snabbt insatt adekvat behandling och därför är det viktigt med ett snabbt diagnosställande. Ofta är fallet så när det gäller sjuka föl där man misstänker bakteriell infektion. För att kunna tolka resultaten av blodanalyserna på ett korrekt sätt, är det viktigt att ha tillförlitliga referensvärden som man kan referera till.

Akutfasreaktionen/Inflammation

Många gånger ställs den praktiserande hästveterinären, inför patienter med sjukdomar som ger inflammation. Inflammationsreaktionen är kroppens svar på vävnadsskada. Den är till för att reparera skadan och begränsa spridningen. Den lokala reaktionen leder till att mediatorer dvs. cytokiner produceras av leukocyter som samlats på platsen för skadan. Cytokinerna är polypeptider och kan verka lokalt genom att potentiella leukocytsvaret och befrämja cellmigration, eller systemiskt genom att orsaka tex. feber eller förändringar i homeostasen. Under cytokinernas inflytande påverkas plasmaproteinernas koncentration. Detta inträffar under den akuta fasen av inflammation, vilken kallas akutfasreaktionen (Kaneko et al, 1997).

Akutfasproteinerna

En viktig effekt av akutfasreaktionen är att cytokinerna, *interleukin-1* (IL-1) och *tumörnekrosfaktor- α* (TNF- α), påverkar hepatocyterna i levern. Därmed omarrangeras leverns syntes av proteiner, vilket gör att de sk akutfasproteinerna ökar i koncentration (positiva akutfasproteiner) eller minskar (negativa akutfasproteiner). Definitionen av ett akutfasprotein är ett protein som ökar eller minskar med minst 25% vid inflammation (Hultén, 1999).

Akutfasproteinerna är en grupp proteiner med varierande uppgifter. Framförallt är deras funktion positiv för inflammationsreaktionen, antingen genom att vara proinflammatoriska eller antiinflammatoriska (Hultén, 1999). Akutfasproteinerna produceras oavsett vad orsaken är till inflammationen. Man anser dock att bakteriella infektioner eller sepsis orsakar de kraftigaste stegringarna men sjukdomens aktivitet och inflammationens storlek har minst lika stor betydelse (Hultén, 1999).

Många av akutfasproteinerna är globuliner. De är positiva akutfasproteiner dvs. de ökar i koncentration vid inflammation. I α_1 -fraktionen finns bla antitrypsin och bland α_2 -globulinerna finns bla serum amyloid A och haptoglobin. Haptoglobin binds till fritt hemoglobin. Därigenom konserverar det hemoglobin, som har frisatts pga. hemolys. Haptoglobin binder också järn, vilket hindrar

mikroorganismerna att komma åt järnet. Fibrinogen, C-reaktivt protein och ferritin är *β-globuliner*. C-reaktivt protein binds till många produkter bla lipoproteiner, komplementfaktorer eller bakterier och har därmed en skyddande verkan.

Negativa akutfasproteiner är prealbumin, albumin och transferrin. Albumin och transferrin är transportproteiner för många olika substanser. Albumin transporterar tex. fettsyror och många farmaka, medan transferrin främst binder järn. Genom att både albumin och transferrin nedregleras vid inflammation, inriktas kroppens mekanismer på syntes av skyddande proteiner istället för katabolism (Kaneko et al, 1997).

Fibrinogen

Fibrinogen är ett av de positiva akutfasproteinerna. Det syntetiseras av mikrosomerna i levercellerna. Där lagras det sedan tills yttre faktorer gör att det frisätts. Molekylen har relativt stor massa (340 kDa), och består av tre polypeptidkedjor. Huvuddelen av fibrinogenpoolen finns intravaskulärt men en viss del finns även i lymfan och interstitiellt. Storleken på fibrinogenpoolen bestäms främst av synteshastigheten, vilken regleras av plasmakoncentrationen. Fibrinogenets katabolism är dock ofullständigt känd. Dess halveringstid är mycket kortare än för andra plasmaproteiner. Dess trådmolekylstruktur bidrar till att fibrinogen tenderar att aggregera partiklar. Därmed är det huvudansvarigt för erytrocyternas myntrullebildning, sänkingsreaktionen (Ferlund et al, 1991).

Fibrinogenets uppgift är också att upprätthålla hemostasen. Fibrinogen, faktor I i koagulationssystemet är en precursor till fibrin. Koagulationskaskaden leder till att enzymet trombin omvandlar fibrinogen till fibrin (Ferlund et al, 1991). Fibrinet polymeriseras sedan och bildar slutligen ett fibrinkoagel som förankrar den primärt bildade trombocytoproppen (Roncalés & Sancho, 2000).

Fibrinogen som mätvärde

Fibrinogen är det vanligast analyserade akutfasproteinerna inom veterinärmedicinen. Koncentrationen i plasma används som en inflammationsmarkör hos ffa nöt och häst (Thomas et al, 2000). Ett dygn efter vävnadsskada kan en viss ökad koncentration i plasma påvisas, men det tar i regel 3-4 dagar innan den maximala koncentrationen ses. Nivån betingas till en del av vävnadsskadans storlek. Vid icke alltför kraftiga höjningar normaliseras fibrinogenkoncentrationen åter efter ca 3-4 veckor (Jain, 1986).

Ett ökat fibrinogenvärde ses vid inflammatoriska, neoplastiska eller traumatiska sjukdomar, men den kraftigaste ökningen orsakas som regel av bakteriella infektioner. Hästar med bakteriell pneumoni och abscesser hade i en studie större ökning av fibrinogenvärdet än hästar med kolik, fraktur eller icke purulenta sår (Jain, 1986). Hästar med distala frakturer kan dock visa mycket små ökningar av fibrinogenvärdet, eftersom de distala delarna av hästens ben omges av mycket lite

mjukdelsvävnad, varför någon större inflammation runt frakturen inte uppstår och därmed inte heller någon större frisättning av cytokiner (Campbell et al, 1981).

Fibrinogen kan även öka vid fysisk stress som t ex dräktighet. Hos dräktiga ston börjar fibrinogenkoncentrationen öka mitt i dräktigheten och är som högst 12 till 36 timmar *postpartum*. (Thomas et al 2000).

Minskad fibrinogenkoncentration förekommer vid tillstånd med patologisk proteolys t ex vid DIC (disseminerad intravaskulär koagulation), leverskada och/eller vid ökad fibrinolys (Fernlund et al, 1991). Dock kan fibrinogenkoncentrationen då också vara normal beroende på bakomliggande inflammation, som ökar fibrinogenproduktionen. Därmed maskeras den ökade förbrukningen som annars skulle ha registrerats pga. DIC (Thomas et al, 2000). Fall med hypofibrinogenemi förefaller vara mycket ovanligt hos häst (Tamzali et al, 2001).

Referensintervall

Fibrinogenkoncentrationen hos kliniskt friska varmblodiga vuxna hästar är enligt *Schalm's Veterinary Hematology*, (5 ed. Kramer et al, 2000), 0,1-0,4 g/dl (1-4 g/L). Samma värde, 1-4 g/L (2,6±0,8, medelvärde±standardavvikelsen) anges i *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (Kaneko et al, 1997). Institutionen för klinisk kemi, SLU, anger referensvärdet 1,8-4,2 g/L. En plasmakoncentration på 5-6 g/L kan indikera ett tidigt skede av inflammation, medan 10 g/L eller mer, tyder på en allvarligare sjukdomsprocess med sämre prognos (Campbell et al, 1981).

För fullblods- och quarterhästfölar anger *Schalm's Veterinary Hematology*, (4 ed. Jain, 1986), fibrinogenkoncentrationen 0,27±0,06 g/dl (2,7±0,6 g/L) för det första levnadsdygnet. Efter det stiger värdet de tre första månaderna till 0,46±0,07 g/dl (4,6±0,7 g/L), dock var det i studien svårt att avgöra om stegringen berodde på en subklinisk respiratorisk infektion som de aktuella fölen hade, eller om ökningen är normal för föl i den åldern (Jain, 1986). I en annan studie har man sett att fibrinogenkoncentrationen i plasma generellt var lägre hos nyfödda föl (2,16±0,72 g/L för fullblods- och quarterhästföl), än hos vuxna hästar (medel 3,87 g/L). Värdena ökade sedan med åldern till ett maxvärde vid fem månaders ålder (4,97±0,91 g/L), och minskade sedan (Harvey et al, 1984). *Schalm's veterinary hematology*, (3 ed. Schalm et al, 1975), anger 2-4 g/L (medel 2,65 g/L) för fullblodsföl vid en dags ålder, 3-5 g/L (medel 3,65 g/L) vid en veckas ålder, 3-5 g/L (medel 4,3 g/L) vid en månads ålder, samt medelvärde 5,0 g/L vid två månaders ålder (Schalm et al, 1975).

Sjuka föl med pneumoni uppvisade fibrinogenvärden som var 0.8-1.1 g/dl (8-11g/L), föl med frakturer hade 0.8-1.2 g/dl (8-12 g/L) och föl med akut sjukdom till följd av *Salmonella typhimurium* hade 1.5-1.6 g/dl (15-16 g/L) (Jain,1986).

Syfte

Syftet med detta arbete var att, utifrån analyserade blodprover, beräkna ett referensintervall för koncentrationen av fibrinogen i plasma hos friska fullblodsföl.

Materiel och metoder

Djurmaterialet

Blodprover från 34 fullblodsföl, mellan några timmar och 8 månader (240 dagar) gamla, insamlades under sommarmånaderna 2001 och 2002 från ett stuteri. Proverna togs genom punktion i *Vena jugularis*, halsvenen, i EDTA- rör och skickades sedan till klinisk kemi för analys av fibrinogen samt räkning av vita blodceller, B-LPK. Samtidigt med blodprovstagningen noterades fölets ålder, eventuella kliniska symtom på sjukdom, eller om fölet hade onormal kroppstemperatur.

De undersökta fölen föddes mellan februari och juli i ett stall med ca 20 fölande ston per år. Under sommarmånaderna gick stona med föl ute dygnet runt i mindre grupper. Vid 5-6 månaders ålder avvandes fölen. Stona avmaskades 1 månad innan beräknad fölning och sedan inom 12 timmar efter. Fölen avmaskades vid 5 veckors ålder, innan betessläppning, under betet med 6-7 veckors mellanrum samt vid installning efter betet. Fölen vaccinerades regelmässigt.

Analysen

Sammanlagt samlade man in 156 blodprover. Analyserna av fibrinogen i plasma skedde dagen efter eller senast två dygn efter provtagningen (fem av proverna) vid Institutionen för klinisk kemi. För analysen användes samma metod som rutinmässigt används på institutionen (Fibrinogen kinetic, F. Hoffmann-La Roche & Co, Diagnostica, Basel, Switzerland). Metoden bygger på enzymatisk klyvning av fibrinogenmolekylen. Principen är att ett trombinliknande enzym, batroxobin från ormgift, tillsätts. Giftet spjälkar fibrinogenmolekylerna i plasman till fibrinogenmonomerer, vilka i sin tur polymeriseras till fibrin. Turbiditetsökningen i lösningen mäts sedan fotometriskt (Konelab 30, Konelab Corporation, Espoo, Finland). Sedan kan fibrinogenkoncentrationen beräknas (Thunberg & Hultén, 2001). Enligt bruksanvisningen ska analysen genomföras på citrat-plasma, men på institutionen används EDTA-plasma, vilket visats ge samma värden.

Statistisk bearbetning

För att kunna betrakta den provtagna populationen som ett representativt stickprov av hela fölpopulationen av fullblodstyp, och därmed få fram mer tillförlitliga referensvärden, användes endast ett blodprov från varje föl i beräkningarna, trots att det i många fall fanns fler att tillgå. I urvalsprocessen användes det andra

blodprovet som tagits på de föl som klassats som friska. Detta för att undvika subjektivt urval. Kriterierna för att ett föl skulle klassas som friskt, var att det vid provtagningstillfället inte visade symtom på sjukdom samt hade normal kroppstemperatur (dvs. 38,0° till 39,5°). Prover från föl som haft kliniska symtom på sjukdom eller onormal kroppstemperatur, klassades inte som friska igen förrän tidigast 4 veckor efter det provtagningstillfälle då individen uppvisat kliniska symtom på sjukdom. Inte heller ansågs prover tagna senare än en vecka före konstaterad sjukdom som prov från friska föl.

Med dessa kriterier blev 31 prover klassade som tagna från friska individer. Åldern vid denna provtagning var mellan 0 och 240 dagar, där 16 prover kom från föl som var under 60 dagar gamla (dvs. 52%). Av samtiliga prover var 19 från stoföl (61%) och 12 från hingstföl.

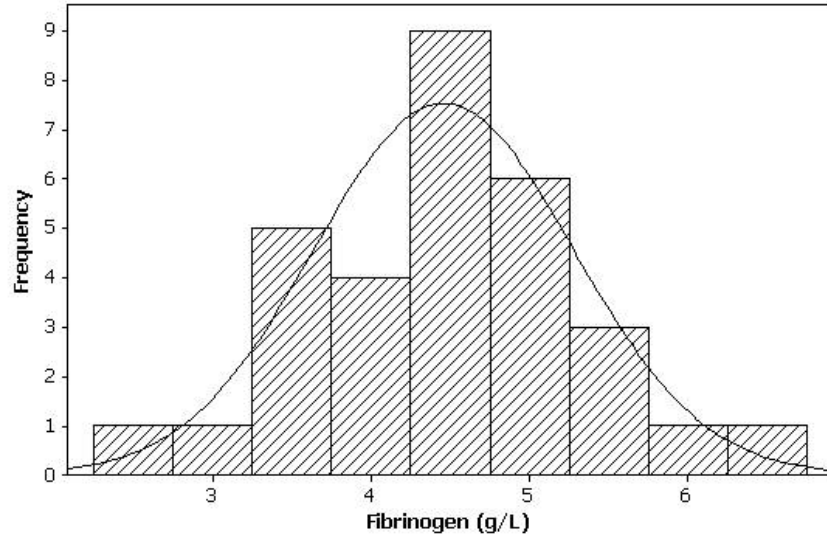
I gruppen som klassats som sjuka, fanns 14 prover från lika många individer. För att även här undvika subjektivt urval, användes det första blodprovet (om flera fanns) från de föl som klassats som sjuka. De utplockade proverna som tagits inom perioden 4 veckor efter, samt en vecka innan en sjukdomsperiod, klassades dock inte härröra från sjuka individer. Fölen i gruppen med sjuka prover var mellan 17 och 90 dagar gamla med 10 (71%) från föl yngre än 60 dagar. Könsfördelningen var 8 (57%) stoföl och 6 hingstföl. Tolv av fölen förekom i båda grupperna eftersom de vid flera provtagningstillfällen varit friska men även haft en episod av sjukdom.

De analyserade proverna sammanställdes och jämfördes med hjälp av datorprogrammen Excel, Minitab och SAS.

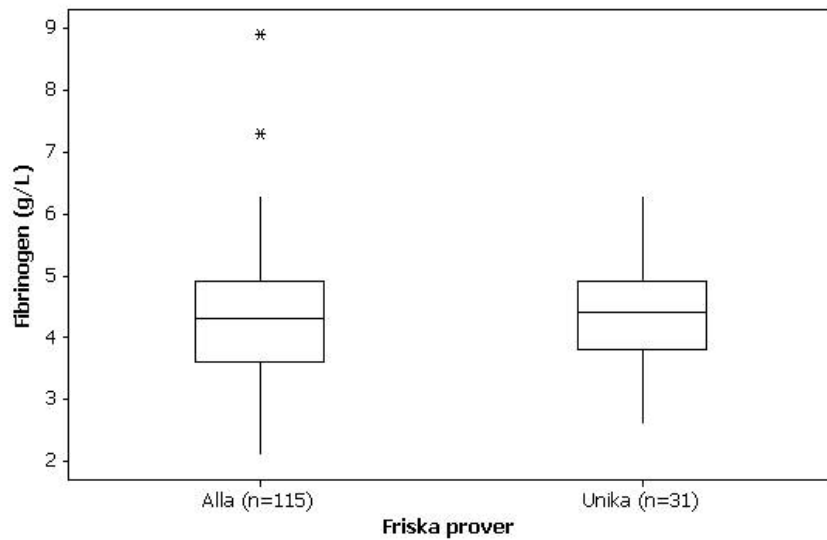
Resultat

En kontroll av fördelningen av de 31 proverna, antydde att värdena var relativt normalfördelade (Figur 1).

Medelvärdet för fibrinogenkoncentrationen hos de friska fölen (31 prover), beräknades till 4,5 g/L med standardavvikelsen (SD) 0,82. Detta ger populationsgränserna (medelvärdet \pm 1,96 SD) 2,9-6,1 g/L (Figur 2).



Figur 1. Frekvenskurvan för de 31 prover från friska individer som använts för beräkning av referensintervallet för P-fibrinogen.



Figur 2. Jämförelse av friska prover från de två olika grupperna. Den ena med ett prov för varje individ (unika) och den andra där samtliga friska prover inkluderats (alla). Gruppen med alla friska prover har större spridning.

Samma beräkning för samtliga prover som kom från friska individer (115 stycken) men från ett fåtal individer (31 föl), gav medelvärdet 4,3 g/L. Standardavvikelsen var 1,1 och populationsgränserna 1,7-7,5 g/L.

Jämförelsen mellan hingstar och ston visade, att skillnaden mellan minsta och det högsta värdet var större bland stona (2,6-6,3 g/L respektive 3,6-5,5 g/L), men i övrigt skilde sig inte hingstar och ston så mycket åt. Medelvärdet för stona var 4,5 g/L och för hingstarna 4,4 g/L (Figur 3).

Populationsgränserna för de sjuka fölen beräknades till 2,1-10,2 g/L, medelvärdet var 6,1 och standardavvikelsen var 2,1 (Figur 5).

Diskussion

Referensintervallet

Referensintervallet för de friska fölen var 2,9-6,1 g/L, vilket är ett högre värde än för vuxna hästar (1,8-4,2 g/L). Detta är intressant eftersom fibrinogenvärden på föl regelmässigt har jämförts med referensvärden för vuxna hästar, i brist på andra jämförelsevärden för föl. Det bör dock iakttas att vid analys av fibrinogen används ofta olika analysmetoder, eftersom många olika finns att tillgå. Det gör det lite mer komplicerat när man jämför referensvärden för fibrinogen i litteraturen. Generellt kan man konstatera, att fölen i denna undersökningen låg högre än vad som anges som referensvärden hos vuxna hästar, 1-4 g/L (Kramer et al, 2000) och (Kaneko et al, 1997).

Däremot stämde våra värden väl överens med vad *Schalm's veterinary hematology*, fjärde upplagan (Jain, 1986), anger för tre månader gamla fullblods- och quarterhästföl, samt vad tredje upplagan (Schalm, 1975), anger för en månad gamla fullblodsföl, 3,0-5,0 g/L. Referensvärdena för våra friska föl är $4,5 \pm 0,8$ g/L, vilket är mycket lika det Schalm anger, $0,46 \pm 0,07$ g/dl ($4,6 \pm 0,7$ g/L) (Jain, 1986). Vårt referensintervall, 2,9-6,1 g/L, stämmer också bra med intervallet för en månad gamla fullblodsföl, 3,0-5,0 g/L enligt *Schalm's veterinary hematology*, tredje upplagan (Schalm, 1975). Vid fem månaders ålder har $4,97 \pm 0,91$ g/L angetts som referensvärden för fullblods- och quarterhästföl (Harvey et al, 1984).

Kontroll av stickprovet

Tolkning av laboratedata baseras på att resultat av många biokemiska och hematologiska mätningar är normalfördelade. Referensintervall räknas i dessa fall vanligtvis ut med hjälp av formeln: $\text{medelvärde} \pm 1,96 \text{ SD}$ (SD=standardavvikelsen). Denna formel ger populationsgränserna, dvs. 95% av alla friska föl i populationen ska ligga inom gränserna (Leadon, 1992).

Frekvenskurvan i Figur 1 indikerar att värdena för fibrinogen hos de friska fölen i undersökningen (n=31), var relativt normalfördelade, men för att försäkra sig om att formeln fungerade tillfredsställande i det här fallet, användes även en kompletterande uträkningsmetod för att kontrollera att liknande värden erhöles.

För den kompletterande metoden användes dataprogrammet SAS. Metoden är en alternativ skattning av percentiler som inte bygger på normalapproximationen, utan den interpolerar linjärt mellan värden ur stickprovet. Om 95% av populationen ska ligga inom gränsvärdena, räknar SAS ut, med hjälp av en algoritm, värdet för den 2,5 percentilen samt den 97,5 percentilen.

För gruppen med unika djur (n=31) blev värdena 2,6 g/L (2,5 percentilen) och 6,3 g/L (97,5 percentilen). Det motsvarade det minsta samt det största observerade värdena i stickprovet. Vid jämförelse med de gränsvärden som erhöles, med formeln för populationsgränserna (2,9 och 6,1), kan man konstatera att den alltså fungerade tillfredsställande att använda i det här fallet, trots att den förutsätter normalfördelning och stickprovet var litet. Slutsatsen av denna jämförelse blir därför att referensintervallet som beräknats för fibrinogen i den här studien 2,9-6,1 g/L är säkert trots få prover .

Vid tolkning av analysresultat är det dock viktigt att inse att värden som ligger inom normalgränserna kan vara onormala för vissa individer. Trots att man har beräknat tillförlitliga populationsgränser, ligger 5 % av individerna i normalpopulationen utanför normalintervallet. Det innebär att 2,5 % ligger under den lägre gränsen normalt, och 2,5 % ligger över den högre gränsen normalt. Man kan utläsa från värdena i den här analysen, att vissa individer kan ha höga värden utan att ha kliniska symtom på sjukdom. Av fölen som hade de 10 högsta fibrinogenvärdena, hade 2 inte visat några symtom på sjukdom, de var alltså friska.

Som parentes kan nämnas att den alternativa uträkningsmetoden för gruppen med alla prover (n=115), gav 2,4 g/L (2,5 percentilen) och 6,3 (97,5 percentilen) vilket motsvarade fibrinogenkoncentrationen i den 3:e och 4:e lägsta observationerna i stickprovet, respektive den 4:e högsta observationen i stickprovet. De här värdena skilde sig betydligt mer från de som formeln för populationsgränserna gav (1,7 och 7,5 g/L). I detta ”stickprov” som är större än det med unika individer, och som man kanske kan anta ligger närmare normalfördelningen än det lilla, ger alltså formeln för populationsgränserna ej tillförlitliga värden. Detta stämde väl med att frekvenskurvan för den stora gruppen var mer skev mot de högre värdena för fibrinogen. Den var alltså inte helt normalfördelad.

Om alla tillgängliga prover använts, hade populationsgränserna för de sjuka och de friska fölen i stort sett varit desamma, vilket borde vara orimligt. Det troligaste är att de flesta av de sjuka fölen hade någon grad av fibrinogenstegring.

Använder man flera prover från samma individ finns risken att man får ett missvisande resultat och därmed ej tillförlitliga referensintervall. Detta beror på att fibrinogenkoncentrationen liksom många andra biologiska värden, tenderar att ligga på en viss nivå, med inte allt för stor variation, för en och samma individ. Därför missbedömer man spridningen av värdena om man betraktar ett

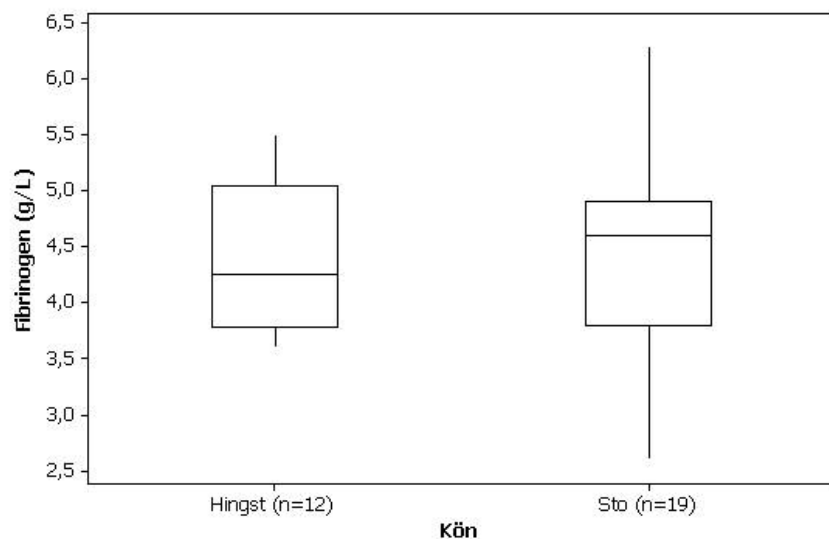
provmaterial som ett stort stickprov, när det i själva verket är många prover som härstammar från få individer.

Raser

Huruvida ras spelar roll för fibrinogenkoncentrationen i plasma verkar vara oklart, eftersom inga handböcker behandlar detta och referenser inom området är svåra att finna. Därför har resultaten från stickprovet endast jämförts med studier där fullblodsföl, samt i vissa studier, fullblodsföl och quarterhästföl, använts.

Hingstar och ston

Fibrinogen har i tidigare undersökningar visats inte vara beroende särskilt mycket av kön (Harvey et al, 1984). Det antogs vara så även i det här fallet, speciellt då fölen inte blivit köns mogna och inte borde ha någon avsevärd insöndring av könshormoner, som skulle kunna påverka fibrinogenvärdet. Vid kontroll av detta visade det sig också att antagandet stämde, dock var skillnaden mellan max och minvärdena större för stonfölen. Hingstar och ston bedömdes därför inte för sig, utan sammanslogs i stickprovet.



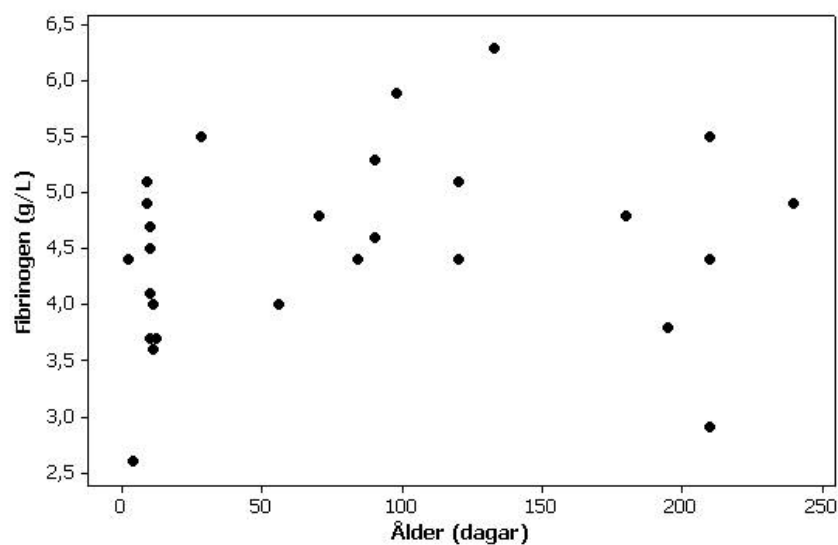
Figur 3. Skillnaden mellan hingstar (n=12) och ston (n=19). Medelvärdet för stona är högre (4,5 g/L) än för hingstarna (4,4 g/L). Skillnaden mellan max- och minvärdet är större bland stona.

Fibrinogen och ålder

Som tidigare nämnts, har man tidigare sett indikationer på att fibrinogen ökar med åldern den första tiden i fölets liv, dvs. de första tre månaderna (Jain, 1986). Liknande tendenser kunde observeras i det här materialet. Av 34 föl totalt, ökade

värdet för fibrinogen hos 19 av dem (56%) med ålder. Hos 3 stycken (9%) minskade värdet, hos 4 (12%) var det oförändrat och hos 8 föl var det svårt att avgöra om fibrinogenvärdet ökade eller minskade, beroende på sjukdomsperioder eller annat. Eftersom fölen i vårt materiel provtogs vid olika åldersintervall, är det svårt att dra några slutsatser i frågan om fibrinogenkoncentrationen ökar med ålder.

Om man däremot tittar på alla individer i stickprovet (n=31), så ökar inte fibrinogenvärdet med åldern, utan det ligger på ungefär samma nivå (Figur 4).



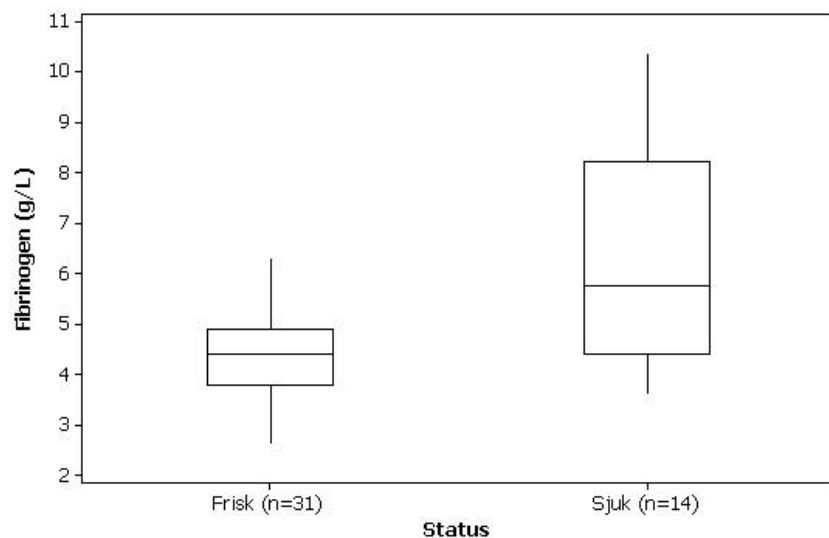
Figur 4. Fibrinogenvärdet för friska individer ligger ungefär inom samma område med ökande ålder i stickprovet (n=31, 4 av prickarna motsvarar två individer).

Fibrinogen hos friska jämfört med sjuka

Resultaten för de sjuka fölen i denna undersökning, visade att många inte hade särskilt förhöjda fibrinogenvärden (min 3,6 och max 10,4 g/L). Detta illustreras i Figur 5, där man kan konstatera att vid medelvärdet för de friska fölen, fanns också många i den sjuka gruppen (första kvartilen, 25%).

Vid bedömningen av sjuka föl är det därför viktigt att ha i åtanke att många föl, som inte är riktigt sjuka, ligger inom normalintervallet. I det här materialet var antagligen många av de föl som klassades som sjuka inte speciellt påverkade av sjukdomen. Några behandlades men ingen av dem behandlades på klinik. De drabbades av åkommor som i vissa fall kan tolkas som näst intill subkliniska.

Detta betyder att individförändringen är viktigast när det gäller att tolka provsvar avseende fibrinogen på föl, vid lindrigare åkommor. En regelmässig kontroll av den individuella normalnivån är att rekommendera, samt uppmärksamhet på eventuella förändringar.



Figur 5. Skillnaden mellan friska (n=31) och sjuka (n=14). Notera att på samma värde som medelvärdet för alla friska ligger (4,5 g/L), finns även många i den sjuka gruppen (första kvartilen, 25%).

Fibrinogenets utveckling vid sjukdom

De föl som klassats som sjuka och som provtagits flera gånger under samma sjukdomsperiod (2 föl), hade fibrinogenvärden som var som högst vid det första provtagningstillfället. Vid det senare provtagningstillfället hade fibrinogenkoncentrationen sjunkit något. Detta visar att fibrinogen är en snabb indikator på sjukdom, eftersom de sjuka fölen provtogs i ett initialt skede. Dock togs få prover i serie under en sjukdomsperiod, och därför är underlaget för litet för att man ska kunna göra en detaljerad bedömning av fibrinogenkoncentrationens dynamik under sjukdomsförloppet.

Det är dock inte alla inflammatoriska tillstånd som orsakar mätbara öknings av fibrinogenkoncentrationen i plasma. En sjukdoms art kan vara sådan att vävnadsskadan inte stimulerar till någon kraftig akutfasreaktion och därmed ingen kraftig fibrinogenstegring. Inflammation i uterus t ex orsakar inte någon märkbar ökning av fibrinogen på sto (Campbell et al 1981).

I den här undersökningen användes ett relativt litet stickprov och inkonsekvent frekvens i ålder, men resultatet kan ändå vara informativt. Önskvärt hade varit att studien designats från början så att stickprovet hade blivit större. Dessutom hade det varit intressant att följa fibrinogenutvecklingen med ålder dvs. dela upp fölen i ålderskategorier. Med hänsyn till att de flesta blodprovsanalyser på Institutionen för klinisk kemi kommer från varmbloodstravare, hade det varit intressant med ett materiel även från sådana föl.

Förhoppningen med det här arbetet är att det ska kunna vara till nytta som ett riktvärde och hjälpa till vid diagnos och behandling av sjuka föl, och därmed möjliggöra ett tidigt diagnosställande.

Slutsatser

Prover från 31 friska föl i åldrarna 0-240 dagar togs och analyserades avseende fibrinogenkoncentrationen i plasma. Populationsintervallet beräknades, vilket gav referensintervallet 2,9-6,1 g/L. Detta stämmer väl överens med de intervall som visats i tidigare studier och angetts i litteraturen för tre månader gamla fullblodsföl och quarterhästar.

Jämförelsen mellan hingstar och ston visade en större spridning bland stona, men i övrigt var resultaten likvärdiga. De föl som provtagits vid en högre ålder låg generellt på samma nivå som de yngre. Vid jämförelse av friska och sjuka föl hade många av de sjuka fölen inte tydligt förhöjda fibrinogenvärden. Det noterades även att fibrinogen är en snabb indikator på inflammation.

Summary

Establishing a reference interval for plasma fibrinogen in foals

Fibrinogen concentrations were analysed in EDTA preserved blood plasma samples from 34 thoroughbred foals born in 2001 and 2002 at one stud farm. The foals were between 0 and 240 days old at the time of the sampling, and there were 19 fillies and 12 stallions in the group. The foals were examined for clinical symptoms of disease and their body temperature was measured before blood was sampled from the jugular vein. From totally 156 blood samples, 31 were selected as originating from clinically healthy foals, and used to determine a reference range for thoroughbred foals. Samples originating from foals showing clinical symptoms of disease or an abnormal body temperature at the time of sampling, were classified as coming from unhealthy animals.

The samples were transported to the Department of Clinical Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden. The fibrinogen concentration in plasma was determined using a commercial reptilase method (Fibrinogen Kinetic, F. Hoffmann-La Roche & Co, Diagnostica, Switzerland) and a Konelab 30 analyser (Konelab, Corporation, Espoo, Finland). The number of leukocytes was also determined in all samples (Cell-dyn 3500, Abott Diagnostics, Abott Park, IL, USA).

The reference range (mean \pm 1.96 SD) for the studied group was estimated to 2.9-6.1 g/L (mean \pm SD, 4.4 \pm 0.8 g/L). Although a small number of animals was used, the frequency distribution (Figure 1) indicated a normal distribution. Similar results were obtained when alternative methods were used to calculate a reference range.

The estimated level of 2.9-6.1 g/L for the central 95% of this foal group is higher than the interval used for adult horses (1.8-4.2 g/L) in the present laboratory. This is important to consider when examining foals. A value that is evaluated as increased, may be perfectly normal for foals in general.

Among the totally 31 clinically healthy foals, 19 (56%) showed increasing concentrations with age, 3 of them (9%) decreased, while 4 (12%) were unchanged. Sex did not seem to play any big role for fibrinogen levels when the 19 fillies and 12 stallions were compared. The fillies had a wider variation (min-max 2.6-6.3 for fillies, 3.6-5.5 for stallions, respectively), but the means for the two groups were comparable (4.5 g/L for fillies, 4.4 g/L for stallions).

Fibrinogen development over time in foals with clinical disease was not thoroughly investigated. However, it seemed that the foals showing evidence of clinical disease, had the highest fibrinogen value at the first sampling occasion. This shows that fibrinogen is a fast reacting acute phase protein indicating an inflammatory reaction already when the owner first discovered signs of disease in this free ranging foals.

Interestingly, this survey showed, that the fibrinogen levels of healthy foals did not differ much from the fibrinogen levels in foals with clinical disease. This underlines the importance for the veterinarian to always make a synthesis between clinical symptoms and results of blood analyses, as obviously some of the foals were ill when sampled although their fibrinogen levels were within the calculated reference range.

Referenser:

- Altman, D. G. 1991. *Practical statistics for medical research*. Chapman & Hall. chap. 7-8.
- Campbell, M. D. Bellamy, J. E. & Searcy G. P. 1981. Determination of plasma fibrinogen concentration in the horse. *American journal of veterinary research*. 42 (1), 100-104.
- Fernlund, P. Fex, G. Hanssson, A. Stenflo, J. & Lundh, B. 1991. *Laurells klinisk kemi i praktisk medicin*. Studentlitteratur. pp 473-474.
- Harvey, J. W. Asquith R. L. McNulty, P. K. Kivipelto, J. & Bauer, J. E. 1984. Haematology of foals up to one year old. *Equine veterinary journal*. 16 (4), 347-353.
- Hultén, C. 1999. *Serum Amyloid A (SAA) as a Marker of Inflammation in the Horse*. Veterinaria 64. Doktorsavhandling Sveriges lantbruksuniversitet, SLU, Institutionen för klinisk kemi. pp 11-18
- Hultén, C. & Demmers, S. 2002. Serum Amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leukocyte count, neutrophil count and fibrinogen. *Equine Veterinary Journal* 34(7), 693-698.
- Jain, N.C. 1986. *Schalm's veterinary hematology*. 4 ed. Lea & Febiger. pp 147-149, 161, 173, 947-948, 960-962
- Kaneko, J. J. Harvey. J. W. & Bruss, M. L. 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5 edition. Academic press. pp 121-122, 132-133, 890-891.
- Kramer, J. W. 2000. *Normal hematology in the horse*. In: Schalm's veterinary hematology. 5 ed. Editors: Feldman, B. F. Zinkl, J. G. Jain, N. C., Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore, USA. Lippincott Williams & Wilkins. pp 532-535, 891-896, 1070-1071.
- Leadon, D. P. 1992. *Clinical pathology data*. In: Current therapy in equine medicine. Edited by Robinson, N. E. pp 822-826.
- Olsson, U. Engstrand, U. 2000. *Biometri*. Kompendium för grundkurs i statistik. Sveriges Lantbruksuniversitet, avdelningen för statistik. Kap 5.
- Roncalés, F. J. & Sancho, J. M. 2000. *Coagulation activators*. In: Schalm's veterinary hematology. 5 ed. Feldman, B. F. Zinkl, J. G. Jain, N. C., Lippincott Williams & Wilkins. pp 532-536.
- Schalm, O.W. Jain, N. C. & Carroll, E. J. 1975. *Veterinary hematology*. 3 ed. Lea & Fabiger. pp 609-613.
- Tamzali, Y. Guelfi, J. F. & Braun, J. P. 2001. Plasma fibrinogen measurement in the horse: comparison of Millar's technique with a chronometric technique and the QBC-Vet Autoreader. *Research in veterinary science*. 71 (3), 213-217.
- Thomas, J. S. 2000. *Overview of plasma proteins*. In: Schalm's veterinary hematology. 5 ed. Feldman, B. F. Zinkl, J. G. Jain, N. C., Lippincott Williams & Wilkins. pp 891-896.
- Thunberg, L. & Hultén, C. 2001. Proteiner In: *Kompendium i klinisk kemi 2001*. Institutionen för klinisk kemi, SLU. Uppsala, Sverige. K7.

Voigt, G. L. 2000. *Hematology techniques and concepts for veterinary technicians*. pp 36-38, 103-110.

Öhagen, P. 2002. *Statistik kompendium*. pp 6-10.

Författarens tack

Stort tack till min handledare Bernt Jones för engagemang, bra synpunkter och god hjälp under arbetets gång. Tack också till Patrik Öhagen för hjälp med statistiska uträkningar. Slutligen vill jag tacka Linus och min familj för stöd och uppmuntring under hela veterinärutbildningen.