



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Utvärdering av jämviktsdialys för analys av fritt T4 hos hund

Evaluation of equilibrium dialysis for measurement
of free T4 in dogs

Nina Pyykkönen

*Uppsala
2019*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

Utvärdering av jämviktsdialys för analys av fritt T4 hos hund

Evaluation of equilibrium dialysis for measurement of free T4 in dogs

Nina Pyykkönen

Handledare: Emma Strage, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Inger Lilliehöök, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

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

Nyckelord: fritt T4, hypotyroidism, jämviktsdialys, totalt T4

Key words: equilibrium dialysis, free T4, hypothyroidism, total T4

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Hypothyreoidism är en av de vanligaste endokrina sjukdomarna som drabbar hundar. Studier har visat att 0,2 – 0,8 % av hundpopulationen drabbas av sjukdomen. Då tyroideahormonerna har en inverkan på flera av kroppens organsystem gör det att symtomen är många och varierade.

I dagsläget finns det inte ett enskilt prov för att diagnostisera hypothyreoidism, utan hänsyn får tas till kliniska tecken samt analyser av tyroideahormon och tyroideastimulerande hormon (TSH).

Analys av totalt tyroxin (tT4) i serum har under en längre tid använts för att diagnostisera hundar med misstänkt hypothyreoidism. Det har dock visat sig att tT4 även kan sjunka vid andra sjukdomar som inte är relaterade till en underfunktion av sköldkörteln, detta kallas ”euthyroid sick syndrome”. Även vissa läkemedel kan ha en påverkan på hormonnivåerna. Detta ger en ökad risk att hundar felaktigt kan få diagnosen hypothyreoidism.

Fritt T4 (fT4) är den fria fraktionen av T4 och den delen som är biologiskt aktivt. Flera studier har visat att fT4 inte påverkas i lika hög grad av andra sjukdomar och läkemedel som tT4. För analys av fT4 anses jämviktsdialys (jämviktsdialys) vara ”gold standard”. Metoden anses ge en mer korrekt bedömning av tyroideas funktion än tT4, och bättre särskilja hypothyreoida hundar från hundar med normalt fungerande tyroidea.

Syftet med denna studie var att utvärdera en metod för analys av fT4 hos hund efter jämviktsdialys (Vet Direct Free T4 by Equilibrium Dialysis, IVD Technologies, Santa Ana, USA). I utvärderingen ingick att undersöka om metoden fungerar bättre än den nuvarande metoden för att analysera fT4. I dagsläget sker analys av fT4 på Universitetsdjursjukhuset (UDS) med en automatiserad kemiluminiscensbaserad immunologisk metod (Veterinary free T4, IMMULITE 2000).

I studien har 30 friska hundar provtagits för att fastställa ett referensintervall. Referensintervallet för fT4 efter jämviktsdialys fastställdes till 7,7 – 27 pmol/L. Då studien innehåller relativt få hundar får detta referensintervall dock anses vara preliminärt.

Även serum från 27 hundar med annan sjukdom än hypothyreoidism analyserades. Resultaten visade att baserat på fT4 hade 7,4 % av dessa hundar klassats som hypothyreoida med jämviktsdialys, jämfört med 44,4 % med kemiluminiscens. Analys av tT4 visade att 37 % av hundarna hade klassats som hypothyreoida.

Detta tyder på att analys av fT4 med jämviktsdialys är ett säkrare sätt att skilja de verkligt hypothyreoida hundarna från hundar med ”euthyroid sick syndrome”.

ABSTRACT

Hypothyroidism is one of the most common endocrine diagnoses in dogs. Studies have shown that 0.2 – 0.8% of all dogs have hypothyroidism.

Total serum T4 (tT4) has been used to diagnose dogs with hypothyroidism, but studies have shown that non-thyroidal illnesses and certain medication can decrease the levels of tT4. This increases the risk of dogs being misdiagnosed with hypothyroidism.

Free T4 (fT4) is the fraction of T4 that is not bound to proteins and it is this fraction that is biologically active. Studies have shown that the concentration of fT4 is not as likely to be affected by non-thyroidal illness and medication as tT4. This is why analysis of fT4 is considered to give a more accurate assessment of thyroid function than tT4. Equilibrium dialysis is considered to be gold standard for analysis of fT4.

The purpose of this study was to evaluate a method for analysis of fT4 in canine serum by equilibrium dialysis (Vet Direct Free T4 by Equilibrium Dialysis, IVD Technologies, Santa Ana, USA). One part of the evaluation included to examine if this method works better than the current method for analyzing fT4 at the University Animal Hospital (UDS). The current method used at UDS is an automated chemiluminescence immunoassay (Veterinary free T4, IMMULITE 2000)).

Serum samples from 30 clinically healthy dogs and 27 euthyroid dogs with non-thyroidal illness were analyzed.

The reference interval for fT4 by equilibrium dialysis was set to 7.7 – 27 pmol/L. This reference interval is to be considered preliminary due to the relatively small population used in this study.

The study also shows that 7.4% of the 27 sick dogs with other disease than hypothyroidism would have been considered hypothyroid based on fT4 using equilibrium dialysis, compared to 44.4% when analyzing fT4 with chemiluminescence. Analysis of tT4 resulted in 37% being considered hypothyroid.

The results of this study indicate that fT4 measured after equilibrium dialysis is more accurate than fT4 measured by chemiluminescence in diagnosing canine hypothyroidism.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Etiologi	2
Primär, sekundär och tertiär hypotyroidism	2
Predisponerande faktorer	2
Kliniska tecken	3
Diagnostik	4
Totalt T4	4
Fritt T4	4
TSH	4
T3	5
Autoantikroppar	5
MATERIAL OCH METOD	7
Provtagning	7
Prov från friska hundar	7
Prov från hundar med hypotyroidism	8
Prov från hundar med annan sjukdom än hypotyroidism	8
Prov med motstridiga provresultat	9
Analysmetoder	9
FT4ED	9
Immulate fT4Imme, tT4 och TSH	10
Utvärdering av fritt T4 med jämviktsdialys	10
Jämförelse mellan fT4ED, fT4Imme och tT4	11
RESULTAT	12
Följdriktighet	12
Variationskoefficient (CV)	13
Hållbarhetsstudie	14
Referensintervall	15
Hundar med hypotyroidism	15
Fritt T4 med jämviktsdialys och Immulite	16
Totalt T4 Immulite	17
TSH 18	
Prover med motstridiga provresultat	18
DISKUSSION	19
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING	21
REFERENSLISTA	23

FÖRKORTNINGAR

- * Total T4 – tT4
- * Fritt T4 – fT4
- * Fritt T4 med jämviktsdialys – fT4ED
- * Fritt T4 med IMMULITE– fT4Imme
- * Tyroglobulin autoantikroppar– TgAA
- * Tyroideastimulerade hormon – TSH
- * Thyrotropin releasing hormone – TRH

INLEDNING

Underfunktion av sköldkörteln, hypotyroidism, är en av de vanligaste endokrina sjukdomarna hos hund. Prevalensen varierar mellan 0,2 % och 0,8 % (Paradis *et al.*, 1991; Dixon and Mooney, 1999).

Då tyroideahormonerna tyroxin (T4) och trijodotyronin (T3) har en inverkan på många olika organ och vävnader i kroppen gör det att symtomen på hypotyroidism är många och varierade. De vanligast förekommande symtomen är metabola symtom så som långsammare metabolism, viktuppgång och letargi, samt dermatologiska symtom som tunn päls och alopeci. Även neuromuskulära, kardiovaskulära och reproduktiva symtom har beskrivits (Dixon *et al.*, 1999; Panciera, 1999; Platt, 2002). Det är detta vida spektrum av symtom som gör att hypotyroidism kan vara en differentialdiagnos i många utredningar, men det diskuteras också att det har lett till att hypotyroidism är överdiagnostiserad hos hund (Scott-Moncrieff, 2007).

För att diagnostisera hypotyroidism används analysmetoder för att mäta totalt T4 (tT4) och tyroideastimulerande hormon (TSH) i serum. De allra flesta hypotyroida hundarna har lågt tT4-värde och högt TSH. Diagnostiken försvåras dock av att tT4 även sjunker vid andra sjukdomar än hypotyroidism, samt vid användning av vissa läkemedel (Kemppainen & Behrend, 2001). Detta kan ge en missvisande bild och leda till en felaktig diagnos. Även TSH kan ge en missvisande bild då den kan ligga på normala nivåer hos hypotyroida hundar. Bristande funktion av sköldkörteln är inte den enda anledningen till högt TSH (Ramsey, Evans and Herrtage, 1997), på humansidan har det visats att heterofila antikroppar kan ge falskt höga TSH-värden (Despres & Grant, 1998), samt kan förhöjda TSH-värden ses vid återhämtningsfasen vid andra sjukdomar (Ramsey, Evans and Herrtage, 1997).

Fritt T4 (fT4) är den andelen av T4 som inte är bundet till proteiner. FT4 är den fraktionen som är biologiskt aktiv och består av mindre än 0,01 % av tT4. Studier har visat att fT4 inte sjunker lika mycket vid icke-tyreoidala sjukdomar som tT4 gör. Analys av fT4 kan därför ge en mer korrekt indikation på tyreoidas funktion än analys av tT4. (Daminet & Ferguson, 2003).

I dagsläget finns flera olika sätt att analysera fT4, men ”gold standard” anses vara jämviktsdialys (jämviktsdialys) (Ferguson, 2007), där man med hjälp av ett filter avlägsnar störande antikroppar och andra proteiner för att därefter analysera fT4. Studier har visat att jämviktsdialys följt av analys av fT4 (fT4ED) är ett säkrare sätt att skilja de verkligt hypotyroida hundarna från hundar med s.k ”euthyroid sick syndrom” (Ferguson, 2007). Det är viktigt att utvärdera varje analysmetod som använder sig av jämviktsdialys eftersom resultatet till exempel kan påverkas av hur provet dialyseras och även vilken antikropp som används vid själva analysen.

Syftet med denna studie är att utvärdera en kommersiell metod för analys av fT4 hos hund med en kompetitiv radioimmunologisk metod efter jämviktsdialys (Vet Direct Free T4 by Equilibrium Dialysis, IVD Technologies, Santa Ana, USA). I denna utvärdering ingår att se om metoden fungerar bättre än den nuvarande metoden för att analysera fT4 och för att ställa diagnosen hypotyroidism. I dagsläget analyseras fT4 på Universitetsdjursjukhuset (UDS) med en kemiluminiscensbaserad kompetitiv immunologisk teknik på ett automatiserat instrument (Veterinary free T4, IMMULITE 2000, Siemens, München, Tyskland).

LITTERATURÖVERSIKT

Etiologi

Tyreoidea är en endokrin körtel vars vävnad består av ett stort antal folliklar. Lumen i dessa folliklar kallas kolloider och det är i dessa kolloider lagras tyreoglobulin. Tyreoglobulin är en prekursor till tyreoideahormonerna tyroxin (T4) och trijodtyronin (T3) som bildas i tyreoideacellerna. Hypotalamus utsöndrar tyreoideastimulerande hormon (TRH) som stimulerar hypofysen att utsöndra mer TSH som i sin tur stimulerar tyreoidea att bilda T4 och T3. Produktionen av hormonerna regleras av negativ feedback, vilket betyder att låga koncentrationer av T3 och T4 i blodcirkulationen stimulerar TRH och TSH vilket leder till ökad produktion av tyreoideahormon. Största andelen av tyreoideahormonerna är bundna till plasmaproteiner (Pashmakova *et al.*, 2014), endast 0,01 % av T4 cirkulerar fritt och är biologiskt aktivt (Daminet & Ferguson, 2003).

Primär, sekundär och tertiär hypotyroidism

Hypotyroidism kan vara kongenital eller förvärvad. Hos hund är den förvärvade formen vanligast. Den kongenitala ses sällan men leder då till en oproportionell dvärgväxt (Daminet, 2003; Kemppainen & Clark, 1994). Hypotyroidism kan delas in i två kategorier; primär och central. Den centrala formen innefattar både sekundär och tertiär hypotyroidism.

Den primära formen är den vanligast förekommande, > 95 % av fallen beror på denna. Den primära formen uppkommer på grund av destruktion av tyreoideavävnaden. Lymfocytär tyreoidit och idiopatisk follikulär atrofi är de vanligaste orsakerna (Scott-Moncrieff, 2007; Mooney, 2011). Lymfocytär tyreoidit kännetecknas av en infiltration av lymfocyter som ger en progressiv destruktion av tyreoides folliklar. Orsaken till den idiopatiska atrofien är inte helt känd. Tyreoideavävnaden ersätts med fettvävnad och/eller fibrös vävnad. (Graham, Refsal & Nachreiner, 2007)

Sekundär hypotyroidism uppstår till följd av atrofi av tyreoideavävnad på grund av minskad utsöndring av TSH från hypofysen. Mindre än 5 % av fallen beror på den sekundära formen.

Den tertiära formen beror på en otillräcklig produktion eller utsöndring av TRH (Kemppainen & Clark, 1994). Den är väldigt ovanlig hos hund och har än så länge bara beskrivits i en studie (Shiel *et al.*, 2007).

Predisponerande faktorer

Kastration av hundar, både tikar och hanar, har visat sig vara en riskfaktor för att drabbas av hypotyroidism (Milne & Hayes, 1980; Panciera, 1994; Dixon, Reid & Mooney, 1999). Predisponerade raser är dobermann, schnauzer, retrievers, hundar av spanielras, tax, Shetland sheepdog och Irländska settrar (Mooney, 2011). Hypotyroidism drabbar oftare medelålders till gamla hundar. Två studier har visat att medelåldern för drabbade hundar är 7 år (Panciera, 1994; Dixon & Mooney, 1999).

Kliniska tecken

Tyreoidhormonerna har en inverkan på många olika organ och vävnader i kroppen, vilket också gör att brist på dessa hormoner kan ge många och varierande symtom.

De vanligast förekommande symtomen på hypotyreoidism är långsammare metabolism och dermatologiska förändringar. Även neurologiska, kardiovaskulära och reproduktiva symtom har beskrivits (Scott-Moncrieff, 2007).

Tyreoidhormonerna påverkar de flesta vävnaders metabolism och syrekonsumtion vilket gör att när kroppen har brist på dessa hormoner manifesteras det i metabola förändringar som letargi, viktuppgång, ovilja att motionera, mental slöhet och känslighet för kyla (Happ, 1995; David, 2001). Enligt en studie visade 84 % av hundarna med hypotyreoidism metabola symtom (Dixon, Reid & Mooney, 1999).

Dermatologiska förändringar är väldigt vanliga, enligt studier förekommer de i 60-80 % av fallen (Dixon, Reid & Mooney, 1999; Panciera, 1999; Scott-Moncrieff, 2007). Torr och/eller tunn päls, bilateral alopeci, seborré, hyperpigmentering och pyodermi har beskrivits. Även otitis externa förekommer (David, 2001).

Neurologiska symtom är inte lika vanligt, men förekommer. En studie beskrev att 29 % av hundarna visade neurologiska symtom, medan en annan studie endast rapporterade en prevalens på 6 %. Symtom från både det centrala- och perifera nervsystemet, som larynxparalys, neuromuskulär dysfunktion, megaesofagus och encefalopati har beskrivits (Jaggy *et al.*, 1994; Mooney, 2011).

Tyreoidhormon påverkar hjärtats ledningssystem, kontraktilitet, frekvens och diastoliska funktion (David, 2001). Brist på tyreoidhormon leder till en förlängd aktionspotential och en långsammare depolarisation (Panciera, 1994). Symtom som bradykardi har rapporterats i flera studier, men prevalensen har varit allt från 5 % till 26 %. Långsammare atrioventrikulär överledning har angetts som en orsak till bradykardin. EKG-abnormalier som låga R-vågor rapporterades hos 58 % av hundar med hypotyreoidism, i en annan studie var det 74 %. Det är inte helt klart varför hundar med hypotyreoidism har mindre R-vågor, men övervikt, förminskad myokardiell massa och minskad cirkulerande blodvolym har angetts som bidragande faktorer (David, 2001).

Reproduktiva symtom som förlängda, tysta och uteblivna löp, abort, testikelatrofi, försämrat libido och sterilitet förekommer också, men är mindre vanligt (Scott-Moncrieff, 2007).

Hematologiska och biokemiska fynd inkluderar lindrig icke-regenerativ normocytär och normokrom anemi, neutropeni, ökade serumtriglycerider, kolesterol och kreatininkinas (Dixon, Reid & Mooney, 1999). En studie visade att 36 % av 126 hundar hade anemi. Anemin beror på minskad produktion av erythrocyter. Reducerade nivåer av plasmaerythropoetin, försämrat svar på erythropoetin hos erytroida prekursorceller och en försämrad direkt effekt av tyreoidhormoner på hematopoetiska pluripotenta stamceller kan vara anledningen (David, 2001).

Diagnostik

Att diagnostisera hypothyreoidism kan vara komplicerat då det inte finns några symptom som är patognomona för just hypothyreoidism (Panciera, 1999). För att diagnostisera sjukdomen finns det inte ett enskilt prov som kan tas, utan hänsyn får tas till kliniska tecken samt analyser av tyreoideahormon och TSH.

Totalt T4

Vid analys av tT4 analyseras både T4 som är bundet till protein och den fria fraktionen av T4. Att analysera tT4 i serum har dock en låg specificitet för att diagnostisera hypothyreoidism, enligt en studie var det så lågt som 0,75 (Dixon & Mooney, 1999; Panciera, 1999). TT4 är visserligen oftast lågt hos hypothyreoida hundar, men kan även vara lågt hos hundar som inte är hypothyreoida. Koncentrationen tT4 har visat sig sjunka även vid andra sjukdomar än hypothyreoidism, s.k. "euthyroid sick syndrome" (Miller *et al.*, 1992; Kantrowitz *et al.*, 2001). Sjukdomar som kan leda till lägre koncentrationer av tT4 är bland annat hyperadrenokorticism (Peterson & Ferguson, 1984), SIRS, sepsis (Pashmakova *et al.*, 2014), diabetes mellitus, leversjukdom och njursjukdom (Elliott, King and Zerbe, 1995).

Även vissa läkemedel som glukokortikoider, fenobarbital, sulfonamider och karprofen kan sänka koncentrationen av tT4 (Daminet & Ferguson, 2003).

Normala nivåer av tT4 anses dock kunna användas för att utesluta hypothyreoidism (Kemppainen & Behrend, 2001).

Autoantikroppar mot T4 är ytterligare en faktor som kan påverka T4-koncentrationen. Studier har visat att autoantikroppar mot tT4 har lett till falskt höga nivåer och att det ökar risken för att feldiagnostisera hypothyreoida hundar (Kemppainen & Behrend, 2001; Piechotta, Arndt & Hoppen, 2010).

Fritt T4

fT4 är den fria fraktionen av T4 och den delen som kan ta sig in i celler och är biologiskt aktivt. fT4 består av mindre än 0,01 % av tT4 (Daminet & Ferguson, 2003). Studier har visat att fT4 inte påverkas lika mycket av andra sjukdomar och läkemedel som totalt T4. Analys av fT4 anses därmed ge en mer korrekt bedömning av tyreoideas funktion, och bättre särskilja hypothyreoida hundar från hundar med normalt fungerande tyreoidea, än analyser av tT4 i serum (Kemppainen & Behrend, 2001; Schachter *et al.*, 2004). Det finns flera olika typer av metoder för att analysera fT4 som fungerar mer eller mindre bra för diagnostik av hypothyreoidism. Equilibriumdialys (jämviktsdialys) anses vara bättre än övriga metoder för att ställa rätt diagnos (Dixon & Mooney, 1999; Schachter *et al.*, 2004; Welsh & Soldin, 2016).

TSH

Hos hypothyreoida hundar ligger TSH ofta över referensintervallet, det har dock rapporterats att 25-40 % av hundar med hypothyreoidism kan ha normala TSH-värden (Welsh and Soldin, 2016). Anledningar till att TSH-nivåerna inte är förhöjda kan vara andra samtidiga sjukdomar som sänker koncentrationen TSH, att analysmetoden för att mäta TSH inte känner igen hormonet och att nivåerna av TSH kan fluktuera till normalspannet hos vissa hundar (Kemppainen &

Behrend, 2001). Det finns även studier som visar att hos hundar med hypotyroidism sjunker TSH-nivåerna efter 1 – 2 år (Diaz-Espiñeira *et al.*, 2008).

T3

Studier har visat att T3 inte bör användas för att utvärdera tyreoidernas funktion hos hund då nivåerna i serum inte skiljde sig signifikant mellan hypotyroida och eutyroida hundar (Miller *et al.*, 1992). T3-nivåerna kan vara sänkta under sjukdomens sena skede, men i början är nivåerna hos hypotyroida hundar ofta inom referens (Kemppainen & Behrend, 2001).

Autoantikroppar

En komplikation i diagnostiken av hypotyroidism är autoantikroppar mot tyroglobulin (en prekursor till tyreoidhormon), T4, T3 samt heterofila antikroppar som kan störa vid analys av alla tyreoidhormon, inklusive TSH. Den vanligaste av dessa antikroppar är antikroppar mot tyroglobulin, den har rapporterats hos 30-50 % av hypotyroida hundar. Autoantikroppar mot T3 och T4 är inte lika vanligt, men av dessa två är autoantikroppar mot T3 något mer förekommande. Studier visar att prevalensen autoantikroppar mot T3 varierar från 0, 2 till 4 %. Prevalensen autoantikroppar mot T4 är 0,2-0,8 % (Despres & Grant, 1998; Kemppainen and Behrend, 2001). Beroende på vilken sorts analysmetod och vilken antikropp det handlar om, kan dessa autoantikroppar ge antingen falskt höga eller falskt låga värden av T4 (Despres & Grant, 1998).

Analys av fT4

För att mäta koncentrationen fT4 använder sig de flesta laboratorier av någon form av immunologisk metod. En vanlig metod för att mäta fT4 är en s.k. enstegs kompetitiv immunologisk metod. Det är även denna metod som för närvarande används på UDS för att analysera fT4. Patientens serum inkuberas tillsammans med en inmärkt t4-analog som tävlar om att binda till en fast fas anti t4-antikropp. Den fasta fasen är en polystyrenkula som är klädd med antikropp.

Efter att provet har inkuberats, tvättas den obundna fraktionen bort. Därefter tillsätts kemiluminiscenssubstrat, provet inkuberas igen och resultatet (ljussignalen) läses av i en luminometer.

Equilibriumdialys (jämviktsdialys) anses vara "gold standard" för analys av fT4 hos både hund och människa (Schachter *et al.*, 2004; Welsh and Soldin, 2016). Analysen separerar fT4 från proteinbundet med hjälp av ett semipermeabelt membran som blockerar större molekyler. Detta gör att T4 bundet till protein samt autoantikroppar inte kan komma igenom, utan endast mindre molekyler som t ex fritt T4 kan passera (van Deventer& Soldin, 2013).

För jämviktsdialysen används en engångscell med en liten och en stor dialyskammare. I den stora kammaren pipetteras dialysbuffert och i den lilla kammaren serumprov. Engångscellerna inkuberas sedan tills jämvikt nås och fT4 kan vandra över dialysmembranet till dialysbufferten. När detta har gjorts, aspireras dialysbufferten som innehåller fritt T4 och analyseras med en kompetitiv radioimmunologisk metod (RIA) vilken baseras på tyroxin som är inmärkt med radioaktiv jodisotop - I¹²⁵. Det radioaktiva tyroxinet tävlar med fT4 om bindningsställen på en

antikropp. Graden av radioaktivitet beror på hur mycket av det inmärkta radioaktiva tyroxinet har kunnat binda till antikroppen. Radioaktiviteten räknas i cpm (counts per minute). Om hög radioaktivitet mäts betyder det att serumet innehåller låg koncentration fT4 och låg radioaktivitet betyder att serumet innehåller hög koncentration fT4.

Jämviktsdialys används i dagsläget inte på något veterinärmedicinskt laboratorium i Sverige, utan analys baseras på immunologiska metoder utan dialys. Nackdelen med jämviktsdialys är att den är dyrare och mer tidskrävande än andra analysmetoder för att mäta fT4 och kräver utrustning som gammareäknare och tillstånd för hantering av radioaktivt material.

MATERIAL OCH METOD

Provtagning

Prov från friska hundar

Provtagning av kliniskt friska hundar till denna studie påbörjades våren 2018. Etiskt tillstånd C193/14 fanns för provtagningen. 21 friska hundar genomgick en klinisk undersökning och djurägarna fick svara på frågor för att säkerställa att hunden är frisk. I den kliniska undersökningen ingick:

- Hjärtauskultation
- Lungauskultation
- Bedömning av slemhinnor
- Tandsten
- Palperbara lymfknotor
- Bukpalpation
- Palpation av tyreoidea och juver

Djurägarna fick även svara på följande frågor:

- När åt din hund senast?
- Vad äter din hund för foder?
- Normal törst och aptit?
- Kräkning/diarré/hosta/snuva/trötthet/avmagring?
- Tidigare sjukdomar?

Utöver dessa 21 hundar har överblivet serum från 9 friska hundar som provtagits tidigare använts. Dessa hundar var friska enligt klinisk undersökning av veterinär och enligt djurägare. För att hundarna skulle få vara med i studien skulle de vara över 1 år och inte ha ätit på minst 8 timmar innan provtagning.

Tabell 1. *Friska hundar i studien*

Ras	Kön	Ålder
Labrador	Hane	7 år
Labrador	Hona	2 år
Spinone	Honkastrat	9 år
Tollare	Hane	5 år
Whippet	Hankastrat	2 år
Cocker spaniel	Hankastrat	5 år
Kleiner Münsterländer	Hankastrat	5 år
Blandras	Hona	1 år

Tax	Hane	2 år
Tibetansk spaniel	Hankastrat	3 år
Finsk lapphund	Hona	2 år
Blandras	Hona	5 år
Border Collie	Hane	5 år
Engelsk springer spaniel	Hona	2 år
Labrador	Hane	1 år
Welsh springer spaniel	Hona	1 år
Shetland sheepdog	Hona	1 år
Border collie	Honkastrat	12 år
Labrador	Hankastrat	9 år
Norrbottenspets	Hane	2 år
Blandras	Hona	8 år

Prov från hundar med hypotyroidism

Under tiden för denna studie analyserades serum från 4 hundar med laboratorieresultat som tydligt talar för hypotyroidism, det vill säga lågt tT4 och högt TSH.

Prov från hundar med annan sjukdom än hypotyroidism

Under hösten 2018 har även överblivet serum från 27 hundar med icke-tyreoidal sjukdom samlats. De 27 hundarna var patienter på IVA, vård eller poliklinikpatienter på Universitetsdjursjukhuset. För de ineliggande hundarna på IVA och vård fick djurägarna skriva på en tillåtelse att överblivet serum från deras hundar fick användas till forskning, vad gäller poliklinikpatienterna tillfrågades djurägarna muntligt. Hundarna genomgick en klinisk undersökning där parametrarna allmäntillstånd, hjärtauskultation, lungauskultation, bukpalpation, palperbara lymfknotor och kontroll av slemhinnor kontrollerades. Utefter dessa parametrar kategoriserades hundarna i tre kategorier, där hundarna i kategori 1 var de lindrigt sjuka och de i kategori 3 svårast sjuka. Behandlande veterinär hade ingen klinisk misstanke om hypotyroidism. Serumet som togs från hundarna centrifugerades inom en timme efter provtagning och förvarades sedan i – 70 °C fram till analys av fT4ED, tT4Imme och TSH.

Tabell 2. *Sjuka hundar i studien*

Ras	Kön	Kategori
Golden retriever	Hona	3
Blandras	Hane	3
Dobermann	Hane	1

Dvärgschnauzer	Hane	2
Blandras	Hane	3
Mellanpudel	Hona	2
Dvärgschnauzer	Hona	3
Bullterrier	Hona	3
Finsk lapphund	Hona	3
Blandras	Hane	2
Cocker spaniel	Hane	2
Blandras	Hane	1
Blandras	Hane	1
Dvärgschnauzer	Hona	1
Parson Russel terrier		3
Jämthund	Hane	2
Labrador	Hona	2
Schäfer	Hane	1
Ny ras	Hona	2
Wachtel	Hane	2
Jack Russel	Hona	2
Fransk bulldogg	Hane	1
Bichon Havanais	Hona	1
Wachtel	Hona	2
Blandras	Hona	2
Pointer	Hona	2
Boxer	Hona	3

Prov med motstridiga provresultat

Autoantikroppar mot T4 kan ge falskt högt T4 i kompetitiva immunologiska metoder. Under tiden som detta arbete pågick identifierades 3 hundar med ovanliga resultat dvs högt FT4Imme i kombination med högt TSH och lågt TT4. Serum från dessa hundar analyserades i duplikat med fT4ED.

Analysmetoder

FT4ED

Fritt T4 med Vet Direct Free T4 by Equilibrium Dialysis (fTE4D) från IVD technologies är en veterinärmedicinsk immunologisk metod framtagen för hund. I varje körning analyseras 7 standarder med koncentrationen 2,6, 5,1, 10,3, 20,6, 41,2, 82,4 och 164,8 pmol/L, låg och hög kontroll samt patientprover. Patientproverna samt kontrollerna dialyserades först i en

dialyskammare. För jämviktsdialysen användes en engångscell med en liten och en stor dialyskammare. 1,325 ml dialysbuffert pipetterades i den stora kammaren och 200 µl serum i den lilla kammaren. Dialyscellerna täcktes sedan med tejp för att förhindra avdunstning. Cellerna inkuberades i 37 ± 2 °C i 17,5 h tills det nådde jämvikt. Därefter aspirerades 700 µL dialysbuffert innehållande fT4 till ett provrör till vilket en första antikropp och inmärkt radioaktivt T4 tillsattes. Rören blandades väl och inkuberades i 37 °C vattenbad. Därefter inkuberades proverna i 2-4 °C i 30 minuter. En andra antikropp tillsattes och proverna inkuberades 1 timme i 2-4 °C. Efter detta centrifugerades proverna i 3300 varv per minut (RPM) i 3 °C i 33 minuter. Supernatanten hölls av och radioaktiviteten i pelleten mättes med en gammarräknaren Wallac Wizard 2470 (Perkin Elmer, MA, USA). Standardkurvan användes för att räkna ut koncentrationerna hos patientproverna och kontrollproverna med hjälp av programmet WorkOutPlus (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Immulite fT4Imme, tT4 och TSH

IMMULITE 2000 är en kemiluminiscensbaserad immunologisk metod. Till analysen användes reagenskitet Canine free T4. Denna metod är den som i dagsläget används på UDS för att analysera fT4. IMMULITE 2000 användes även för att analysera tT4 och TSH.

Utvärdering av fritt T4 med jämviktsdialys

För att utvärdera om analysmetoden var följdriktig utfördes två spädningsserier. Det första provet seriespäckades två gånger. Koncentrationen för det ospäckda provet noterades och utifrån den beräknades en förväntad koncentration för varje steg i seriespädningen. Provet späddes först 50 % och den lösningen späddes sedan med 50 %. Proverna analyserades två gånger vid varje tillfälle för att få ett medelvärde. Det andra provet späddes med direktspädning till 80, 60, 40 och 20 % av ursprunglig koncentration. Vid denna spädningsserie analyserades bara ett replikat.

För tolkning av följdriktigheten räknades observerat värde (O) ut i förhållande till förväntat värde (E) och detta angavs i procent. Ett perfekt följdriktigt förhållande (linjärt samband) ger ett resultat på 100 %.

För att kontrollera metodens precision beräknades variationskoefficient (CV) på resultat från upprepade analyser av två poolade prover – en med låg koncentration och en med hög koncentration av fT4. Varje pool delades in i 4 allikvoter som frystes i -20 °C. Provet analyserades i 1-2 replikat under totalt 4 dagar. Variationskoefficient är ett mått på spridningen runt medelvärdet. CV i procent räknas ut genom att dela standardavvikelse med medelvärdet och multiplicera med 100. Man tittar på spridningen inom en körning (dvs inomkörnings CV) och mellan olika körningar på olika dagar (dvs mellankörnings CV).

För att kontrollera hållbarheten för fT4 i serum fick ett centrifugerat serumprov stå framme i rumstemperatur i 3 dygn för att se hur fT4 nivåerna påverkades.

För hållbarhet, CV och följdriktighet användes överblivet serum från patientprover på klinisk kemiska laboratoriet på Universitetsdjursjukhuset.

Serumprov från 30 kliniskt friska hundar användes för att få fram ett referensintervall med hjälp av Reference value advisor (Geffré *et al.*, 2009, 2011). Proverna analyserades i duplikat hos 21 hundar och medelvärdet användes för beräkning. Hos 9 hundar räckte serumet endast till ett replikat. De individuella värdena från de 30 friska hundarna var normalfördelade enligt Anderson-Darlings test. Det sågs inga outliers enligt Dixon eller Tukeys test. I dataprogrammet räknades 90 % konfidensintervall för övre och undre referensintervallet ut genom bootstrapping.

För att titta på om metoden korrekt kunde klassificera hypotyreoidea hundar analyserades serum från 4 hundar med tydliga laboratorieresultat på hypotyroidism. Dessa prov analyserades i duplikat.

Metodernas nedre mätområde har markerats i figur 4-6. Koncentrationer under de lägsta mätvärdena kan inte mätas på ett tillförlitligt sätt och brukar inte rapporteras ut. I diagrammen har de faktiska värdena som fås fram i analyserna plottats in i diagrammet, men den röda linjen markerar var gränsen för lägsta mätvärdet går.

Jämförelse mellan fT4ED, fT4Imme och tT4

I gruppen sjuka hundar med icke-tyreoidal sjukdom användes det överblivna serumet till analys av tT4, fT4ED, fT4 med kemiluminiscens (fT4Imme) samt TSH. För analys av fT4ED analyserades proverna i duplikat och för övriga analyser i ett replikat. Koncentrationen av TT4 och fT4 mätt med IMMULITE 2000 har sedan jämförts med fT4 mätt efter jämviktsdialys för att se vilken metod som påverkas minst av andra sjukdomar. Behandlande veterinär hade ingen klinisk misstanke om hypotyroidism.

RESULTAT

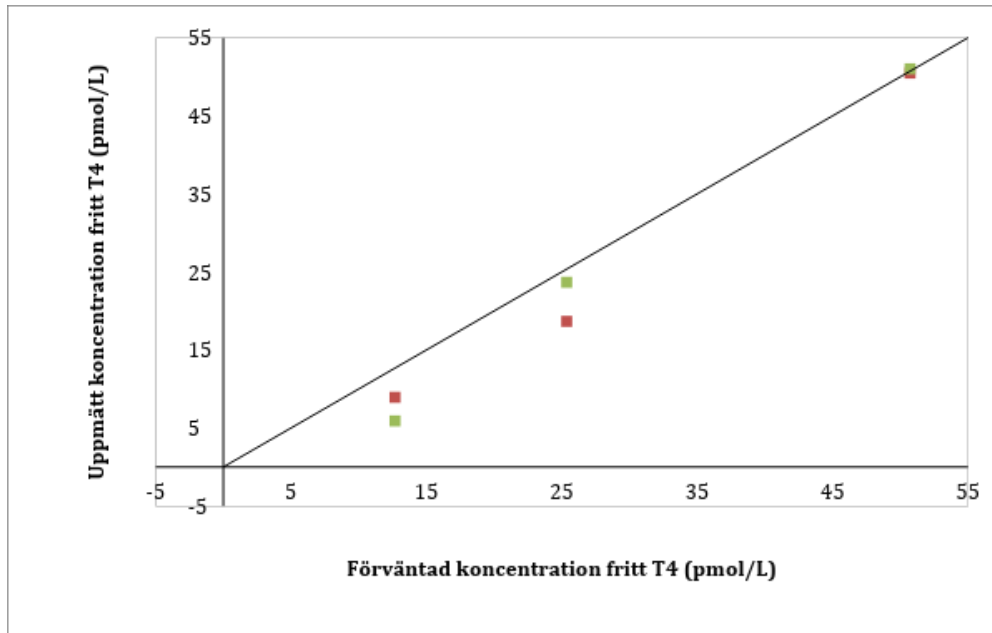
Följdriktighet

Seriespädning (prov A) av ett högt prov visade O/E mellan 59 % och 100 % när alla replikaten togs med i uträkningarna. Ospädd hade provet en koncentration på 50,5 pmol/L. De förväntade koncentrationerna och de uppmätta koncentrationerna presenteras i tabell 3 och figur 1. Eftersom resultaten från spädningen av prov A inte var helt linjär gjordes en ny spädningsserie med tätare intervall med ett annat prov (prov B).

Vid visuell analys av direktspädningen (prov B) såg det ospädda provet ut att vara en outlier. Provet med näst högsta spädningen (80 %) sattes därför som förväntat värde. Med den näst högsta spädningen som förväntat värde var O/E 82 – 106 % (tabell 4 och figur 2).

Tabell 3. Medelvärden och förväntade värden i pmol/L av seriespädning (prov A)

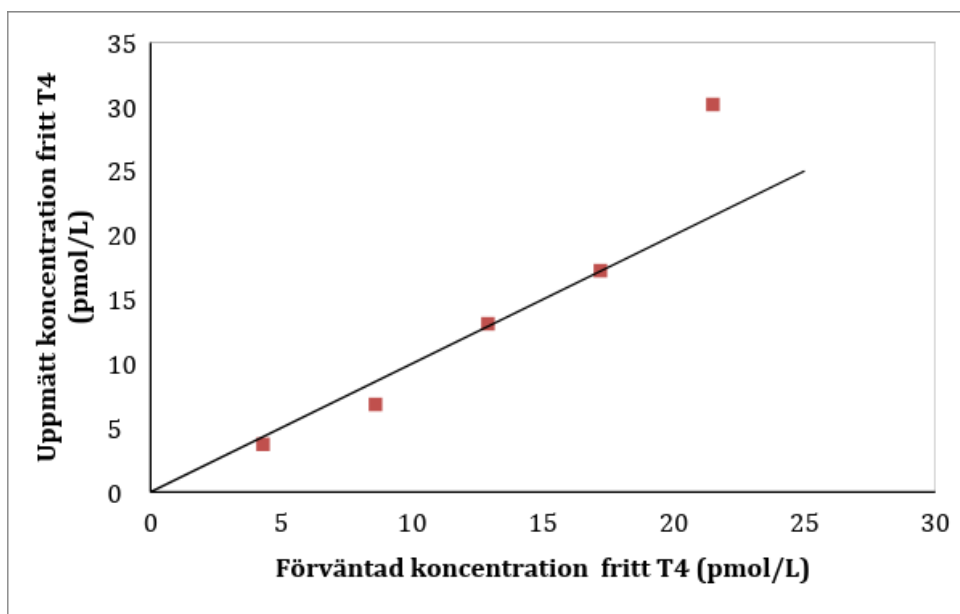
Spädning	Medelvärde		Förväntat värde	O/E i %
Ospädd	49,9	50,9	50,5	100
0,5	23,7	18,7	21,1	84
0,25	5,9	8,9	7,5	59



Figur 1. Jämförelse förväntad koncentration och uppmätt koncentration av ett prov A seriespädd två gånger och analyserat i två replikat (replikaten är de röda och gröna fyrkanterna i diagrammet).

Tabell 4. Uppmätta värden och förväntade värden i pmol/L av direktspädning (prov B)

Spädning	Uppmätt värde	Förväntat värde	O/E i %
Ospätt	30,2	21,5	140
0,8	17,2	17,2	100
0,6	13,1	12,9	102
0,4	6,8	8,6	79
0,2	3,7	4,3	87



Figur 2. Jämförelse förväntad koncentration och uppmätt koncentration av prov B vid direktspädning. Varje spädning är analyserat i ett replikat (de röda fyrkanterna i diagrammet).

Variationskoefficient (CV)

Vid utvärdering av CV tittar man på hur väl resultaten överensstämmer med varandra efter upprepade mätningar av samma prov under samma förhållanden. Ingen outlier identifierades enligt Grubb's test även om en dag visade ett högt värde inomkörnings CV på låg pool. Inomkörnings CV för lågt prov låg på mellan 8,3 - 30,3 % och högt prov 2,8 - 8,6 %. Mellankörnings CV låg på 12,1 % för lågt prov och 16,8 % för högt prov (se tabell 5 och 6).

Tabell 5. *Variationskoefficient (CV) låg pool*

Dag	Rep. 1	Rep. 2	Std	Medelvärde	Inom	
					CV	
1	9,4 pmol/L	8,3 pmol/L	0,8	8,9 pmol/L	8,7 %	
2	7,7 pmol/L	6,9 pmol/L	0,6	7,3 pmol/L	8,3 %	
3	7,0 pmol/L	8,3 pmol/L	0,9	7,7 pmol/L	12,3 %	
4	11,4 pmol/L	7,4 pmol/L	2,9	9,4 pmol/L	30,3 %	
					Mellan	
					Std	1,00
					Medelvärde	8,3 pmol/L
					CV	12,1 %

Tabell 6. *Variationskoefficient (CV) hög pool*

Dag	Rep. 1	Rep. 2	Std	Medelvärde	Inom	
					CV	
1	30,0 pmol/L	28,8 pmol/L	0,8	29,4 pmol/L	2,8 %	
2	22,9 pmol/L	25,8 pmol/L	2,1	24,35 pmol/L	8,6 %	
3	26,8 pmol/L	Slut				
4	36,0 pmol/L	32,4 pmol/L	2,6	34,2 pmol/L	7,5	
					Mellan	
					Std	4,9
					Medelvärde	29,3 pmol/L
					CV	16,8 %

Hållbarhetsstudie

Ett prov analyserades färskt samt efter 2 respektive 3 dygn (se tabell 7). Hållbarheten ändrades mindre än 6 % vilket ansågs vara hållbart.

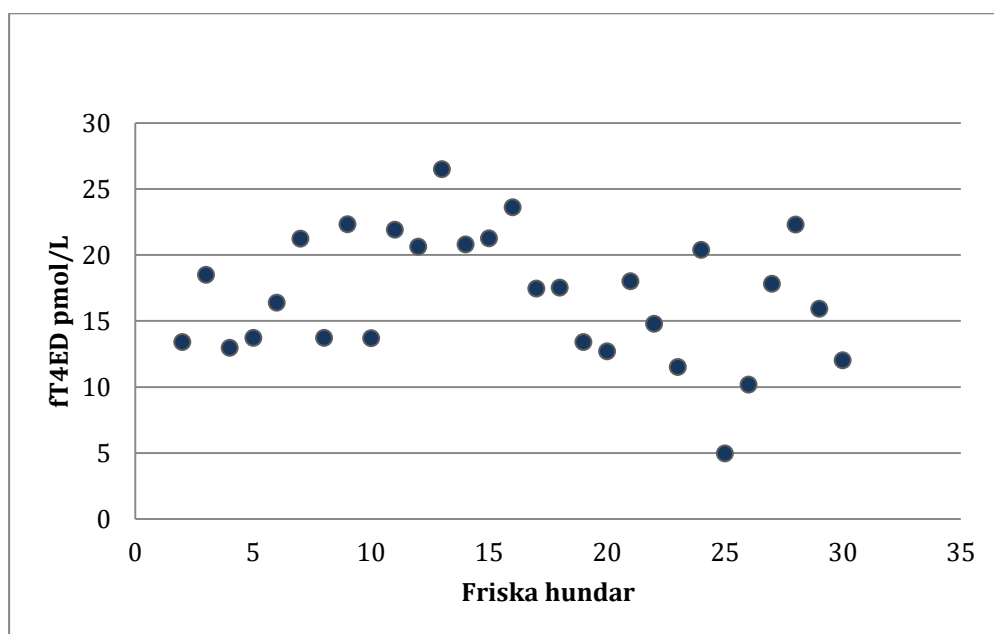
Tabell 7. *Hållbarhet i procent*

	Rep. 1	Rep. 2	Medel	Skillnad i %
Färskt prov	13,8 pmol/L	18,3 pmol/L	16,1 pmol/L	
Hållbarhet 2 dygn	15,1 pmol/L	16,5 pmol/L	15,8 pmol/L	- 1,9 %
Hållbarhet 3 dygn	15,8 pmol/L	14,7 pmol/L	15,2 pmol/L	- 5,6 %

Referensintervall

95 % referensintervall räknades genom att ta medelvärdet \pm 2 standardavvikelser. Resultatet blev ett referensintervall på 7,7 – 27 pmol/L. Referensintervall räknades även med robust metoden och detta sätt gav exakt samma referensintervall som medelvärdet \pm 2 standardavvikelser.

Konfidensintervallet för referensintervallets undre och övre gräns var bredare än vad man önskar sig (Geffré *et al.*, 2011) vilket troligen beror på att för få djur var med i studien (Friedrichs *et al.*, 2012).



Figur 3. Värden för *ft4ED* för de friska hundarna. Det högsta uppmätta medelvärdet var 26,5 pmol/L och det lägsta 4,97 pmol/L.

Hundar med hypotyreoidism

För att titta på hur *ft4ED* skulle se ut hos hypotyreoida hundar analyserades serum från 4 hundar med laboratorieresultat som tydligt talar för hypotyreoidism, det vill säga lågt *tT4* och högt *TSH*. Alla dessa hundar visade sig ha *ft4ED* under detektionsnivån (<2,6). Alla 4 hundar hade även låga nivåer *ft4* (Immulite) (<3,9) (se tabell 8).

Tabell 8. Värden för hundar med hypotyreoidism. Referensintervall för *ft4ED* är 7,7 - 27 pmol/L, *tT4* 14-45 nmol/L, *TSH* < 40 IU/L och *ft4Imme* 7,5 – 40 pmol/L

	FT4ED	TT4	TSH	FT4Imme
Hund 1	<2,6	<6	<200	<3,9
Hund 2	<2,6	<6	51	<3,9
Hund 3	<2,6	<6	127	<3,9
Hund 4	<2,6	<6	70	<3,9

Fritt T4 med jämviktsdialys och Immulite

I dessa kategorier ingår 27 hundar med icke-tyreoidal sjukdom. Hundarna i kategori 1 är de lindrigast sjuka och i kategori 3 de svårast sjuka.

Kategori 1

I denna kategori hade vi 7 hundar, värdena för fT4ED låg mellan 7,2 – 80,9 pmol/L. 14,3 %, 1 av 7 hundar, hade klassats som hypotyreoid om vår preliminära nedre referens 7,7 pmol/L använts. Enligt tillverkarens referensintervall på 10,3 – 41,2 pmol/L, hade också 1 av 7 hundar klassats som hypotyreoid.

Vid analys av fT4Imme fick vi värden mellan <3,9 – 34,9 pmol/L. 42,9 %, 3 av 7 hundar, i denna kategori hade klassats som hypotyreoida enligt laboratoriets nedre referens på 7,5 pmol/L.

Kategori 2

I kategori 2 hade vi 14 hundar, värdena för fT4ED var mellan 8,5 – 54,7 pmol/L. Ingen av hundarna hade klassats som hypotyreoid enligt vårt preliminära referensintervall. Enligt tillverkarens nedre referens 10,3 pmol/L, hade 1 av 14 klassats som hypotyreoid.

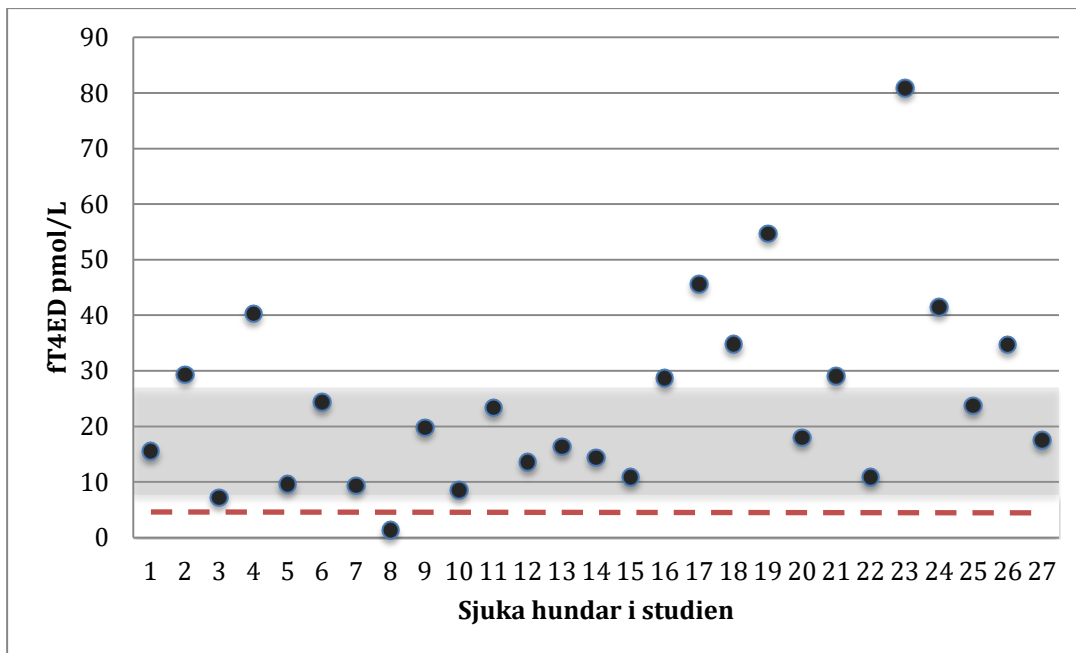
Värdena för fT4Imme blev 4,5 – 20,2 pmol/L. 35,7 %, 5 av 14 hundar, hade klassats som hypotyreoida enligt laboratoriets nedre referens på 7,5 pmol/L.

Kategori 3

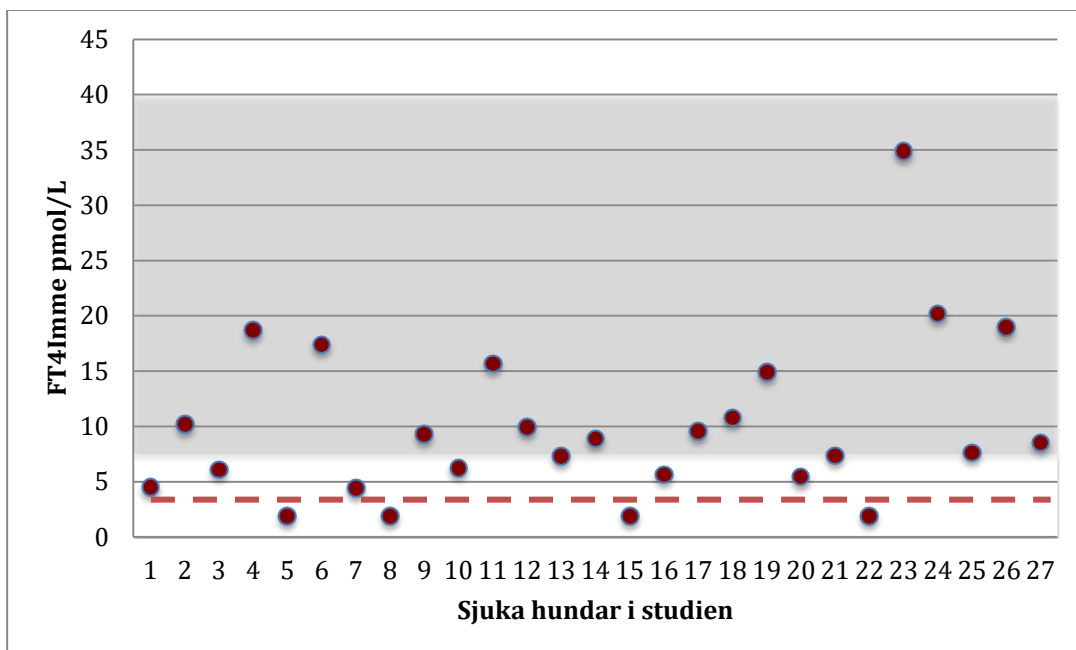
I kategori 3 hade vi 6 hundar. Värdena för fT4ED var mellan <3,9 – 19,8 pmol/L. Av hundarna i kategori 3 hade 16,7 %, 1 av 6 hundar, klassats som hypotyreoid om vår preliminära nedre referens 7,7 pmol/L använts. Enligt tillverkarens nedre referens 10,3 pmol/L, hade 3 av 6 hundar klassats som hypotyreoida.

Värdena för fT4Imme blev <3,9 – 9,3 pmol/L. 66,7 %, 4 av 6 hundar, hade klassats som hypotyreoida enligt laboratoriets nedre referens på 7,5 pmol/L.

Av alla sjuka hundar i studien hade 7,4 % klassats som hypotyreoida med jämviktsdialys (se figur 3) medan 44,4 % hade klassats som hypotyreoida med fT4Imme (se figur 4 och 5).



Figur 4. Diagram med $ft4ED$ -värden för alla sjuka hundar oavsett kategori. Grå bakgrund är referensintervallet, de svarta punkterna är värden för alla hundar med icke tyreoidal sjukdom och röda strecket är lägsta mätvärdet. Av dessa hundar hade 7,4 %, dvs 2 av 27 hundar, kategoriserats som hypothyreoida.



Figur 5. Diagram med värden för $ft4Imme$ för alla sjuka hundar oavsett kategori. Grå bakgrund är referensintervallet, de röda punkterna är värden för alla sjuka hundar och det röda strecket är lägsta mätvärdet. Av dessa hundar hade 44,4 %, dvs 12 av 27 hundar, kategoriserats som hypothyreoida.

Totalt T4 Immulite

Kategori 1

Värdena för $tT4$ hamnade mellan 7,5 och 40,4 nmol/L. 28,6 %, 2 av 7 hundar, hade klassats som hypothyreoida enligt nedre referens på 14 nmol/L.

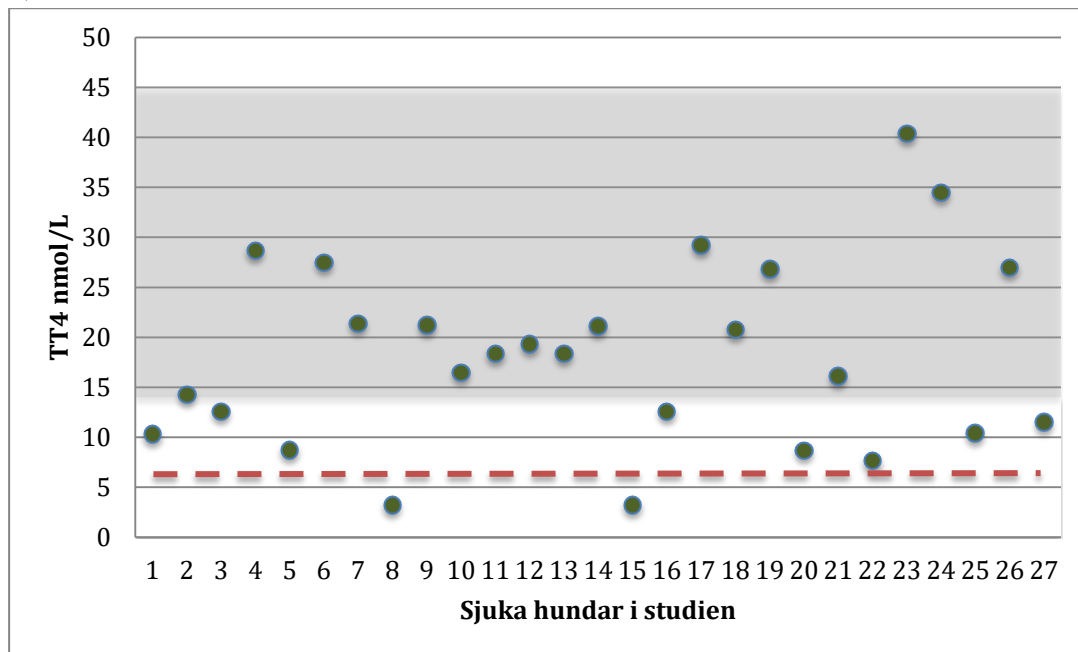
Kategori 2

Värdena för tT4 hamnade mellan 8,7 – 34,5 nmol/L. 28,6 %, 4 av 14, hade klassats som hypotyreoida enligt nedre referens på 14 nmol/L.

Kategori 3

Värdena för tT4 hamnade mellan <6,0 – 21,4 nmol/L. 66,7 %, 4 av 6 hundar, hade klassats som hypotyreoida enligt nedre referens på 14 nmol/L.

Av alla sjuka hundar i studien hade 37 %, 10 av 27 hundar, klassats som hypotyreoida (se figur 6).



Figur 6. Diagram med värden för tT4 för alla sjuka hundar oavsett kategori. Grå bakgrund är referensintervall och gröna prickarna tT4-värden för de sjuka hundarna, röda strecket är lägsta mätvärdet. Av dessa hundar hade 37 %, dvs 10 av 27 hundar, kategoriserats som hypotyreoida.

TSH

Det övre referensintervallet för TSH är 40 IU/L. Ingen av hundarna i studien låg över den gränsen.

Prover med motstridiga provresultat

3 hundar uppvisade ovanliga värden med lågt tT4, högt TSH men högt fT4Imme. När dessa analyserades fT4ED hade dessa hundar låga tyroxinnivåer (se tabell 9).

Tabell 9. Tre blodprov med ovanliga värden

	FT4ED	TT4	TSH	FT4Imme
Hund 1	<2,6 pmol/L	<6 nmol/L	>200 IU/L	23 pmol/L
Hund 2	<2,6 pmol/L	<6 nmol/L	>200 IU/L	77 pmol/L
Hund 3	<2,6 pmol/L	<6 nmol/L	>200 IU/L	>77,2 pmol/L

DISKUSSION

Det är viktigt att varje laboratorium tar fram egna referensintervall eller verifierar tillverkarens referensintervall, eftersom detta kan variera mellan olika laboratorier och även vilken population hundar som provtagits. Referensintervallet vi fick fram i denna studie beräknades till 7,7 - 27 pmol/L. Referensvärden ska vara baserade på 95 % av populationen vilket betyder att 5 % bör ligga utanför intervallet. De friska hundarna som provtagits i denna studie låg alla innanför tillverkarens referensintervall på 10,3– 41,2 pmol/L och tendensen var snarare att de låg åt det lägre hållet. Detta kan tyda på att tillverkarens referensintervall är för brett jämfört med vårt, men för att påvisa detta behöver fler friska hundar provtas.

För att jämföra tillverkarens och vårt referensintervall behöver vi även veta vilka raser tillverkaren har använt sig av. I tillverkarens referensintervall ingår 33 blodgivarhundar vilket betyder att de troligen är raser av större storlek (Lucas, Lentz and Hale, 2004), medan vi i vår studie hade en blandning av raser och storlekar. Detta kan vara en anledning till att referensintervallen skiljer sig åt då studier har visat att medelvärdet för fT4 kan variera signifikant mellan raser (Hegstad-Davies *et al.*, 2015) och storlek på hund (Fialkovičová *et al.*, 2012). Det är viktigt att referensintervallet är baserat på den population hundar där analysmetoden är tänkt att användas och denna studies blandning av raser och ålder ger troligen ett mer korrekt referensintervall än tillverkarens. Det fastställda referensintervallet i denna studie får dock anses som ett preliminärt referensintervall då det är relativt få hundar med i studien.

Analysen av fT4ED visade acceptabla värden vad gäller CV och följdriktighet. Metoden innehåller många pipetteringssteg och det kan ha haft en påverkan på både CV och följdriktighet. Inomkörnings CV för låg pool dag 4 var oacceptabelt högt (ca 30%) men övriga dagar låg det betydligt lägre (<13%). Det höga värdet dag 4 kan bero på pipetteringsfel under något moment.

På de fyra kliniska proverna vi analyserat från hypothyreoida hundar har metoden korrekt klassificerat dessa som hypothyreoida, så inom/mellankörningsvariationen påverkade inte diagnosen i dessa fyra fall. Vi skulle behöva fler prov från hypothyreoida hundar samt ett prov där vi har störande antikroppar som både ger högt tT4 och fT4 och TSH för att se hur metoden beter sig.

Vad gäller följdriktigheten visade spädningsserien acceptabel följdriktighet vid direktspädning. Vid seriespädning var det sämre följdriktighet – ner till 59 %. Det finns en risk att detta resultat berodde på ett pipetteringsfel. Uppstår det ett fel i första spädningen kommer detta följa med till nästa gång då det är samma prov som späds. I direktspädningen späddes provet ännu längre ner än i seriespädningen vilket också är önskvärt för att validera följdriktigheten i större del av metodens mätintervall.

Analysresultaten av de sjuka hundarna i studien visade att 7,4 % hade klassats som hypothyreoida med analys av fT4 efter jämviktsdialys, 44,4 % av hundarna hade klassats som hypothyreoida med immuliteanalysen och mätning av tT4 hade klassat 37 % av hundarna som hypothyreoida. Om man jämför resultaten för fT4Imme och tT4 mot resultaten för fT4ED skulle

det kunna betyda att 37 % fler hundar hade kunnat feldiagnostiseras som hypotyreoidea om endast resultaten för fT4Imme hade tagits i hänsyn. 29,6 % fler hade kunnat feldiagnostiseras baserat på resultaten för tT4. Resultaten är i enlighet med andra studier som gjorts inom området (Dixon and Mooney, 1999; Schachter *et al.*, 2004). Det ska dock nämnas att diagnosen hypotyroidism inte ska ställas endast på analys av tT4 eller fT4, utan alltid i kombination med TSH och klinisk bedömning, så i praktiken hade förmodligen inte så många hundar fått fel diagnos. Resultaten tyder ändå på att analys av fT4 efter jämviktsdialys är ett mer tillförlitligt sätt att skilja de verkligt hypotyreoidea hundarna från hundar med sick euthyroid syndrome. Ifall referensintervallet ändras så att det mer liknar tillverkarens, kommer fler hundar att klassas som hypotyreoidea. Innan man kan dra säkra slutsatser måste man först fastställa referensintervallet undre gräns – detta är dock preliminära resultat som verkar lovande.

26 av 27 hundar inom gruppen hundar med non-thyroidal illness hade fT4-värden över lägsta detektionsnivån mätt efter jämviktsdialys och 23 av 27 hade värden över detektionsnivån med immulitemetoden. Jämför man detta med koncentrationen av fT4 hos hundar med hypotyroidism ser man en tydlig skillnad då alla hundar med konstaterad hypotyroidism hade fT4-koncentrationer under detektionsnivå både vad gäller jämviktsdialys < 2,6 pmol/L samt immulitemetoden < 3,9 pmol/L. Detta överensstämmer med flera studier som konstaterat att nivåerna av fT4 hos hypotyreoidea hundar ofta är lägre än hos hundar med non-thyreoidal illness. (Nelson *et al.*, 1991; Schachter *et al.*, 2004). I denna studie analyserades även enstaka prov från hundar med udda provsvar. Två av dessa hade fT4Imme >77 pmol/L men lågt fT4ED och lågt tT4. Dessa resultat kan tala för att fT4 analyserat med IMMULITE 2000 påverkas mer av störande antikroppar än tT4. Fler studier behöver dock göras där hundar med störande antikroppar analyseras för att dra säkra slutsatser angående skillnad i interferens vid analys av tT4 och fT4 med Immulite.

Resultaten från denna studie visar att dialysmetoden fungerar bättre än nuvarande analysmetod för att särskilja hypotyreoidea hundar från hundar med sick euthyroid syndrome och troligen hundar med störande antikroppar. Det som dock måste tas hänsyn till innan jämviktsdialys börjar användas på UDS är kostnaden för denna analys samt arbetsinsats. Dialysmetoden är betydligt dyrare och mer arbetsintensiv än den nuvarande metoden. De många pipetteringsstegen ger risk för enskilda avvikande värden och för att säkert identifiera dessa hade det varit bra att analysera proverna i triplikat. Detta skulle öka kostnaden och kräver dessutom stora provvolym. Ytterligare studier som beaktar alla dessa variabler behövs.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Underfunktion av sköldkörteln, hypotyroidism, är en av de vanligaste hormonella sjukdomarna som drabbar hund. Sjukdomen drabbar vanligtvis medelålders till gamla hundar, enligt forskning som har gjorts är medelåldern 7 år.

Sköldkörteln utsöndrar hormonerna trijodotyronin (T3) och tyroxin (T4) och dessa hormon påverkar flera av kroppens organ och vävnader, vilket gör att hunden kan uppvisa många symtom och av olika slag. Ofta ser man att hundens ämnesomsättning påverkas vilket kan leda till viktuppgång, allmän trötthet, ovilja att motionera och ökad känslighet för kyla. Även symtom från hud och päls ses ofta. Hundens päls kan bli både torrare och tunnare, kala fläckar kan uppstå, områden i huden kan bli mörkare (hyperpigmentering) och hunden kan drabbas av hudinfektioner.

Att diagnostisera hypotyroidism

Det går inte att ställa diagnosen hypotyroidism med ett enda prov, utan hänsyn måste tas till kliniska symtom och analyser av tyreoidhormon. Längre har man analyserat totalt tyroxin (tT4) tillsammans med tyreoidstimulerande hormon (TSH) för att ställa diagnosen. Om T4 är lågt och TSH är högt är det en stark indikation på att hunden är hypotyroid. Det som dock komplicerar diagnostiken är att tT4 även kan vara lågt hos hundar med annan sjukdom än hypotyroidism. Även vissa läkemedelsbehandlingar har visat sig kunna sänka nivåerna av tT4.

Fritt T4 är en del av den totala mängden T4 (tT4), men fT4 är inte bundet till något protein. Fritt T4 är en väldigt liten del av det totala T4, men det är denna fria fraktion som är biologiskt aktivt. Flertalet studier har visat att analys av fritt T4 (fT4) ger en mer korrekt bedömning av sköldkörtelns funktion, då den inte påverkas lika mycket av andra sjukdomar och läkemedelsbehandlingar. Det blir då lättare att skilja hundar som verkligen har hypotyroidism från hundar med andra sjukdomar som gjort att nivåerna av tT4 är lågt.

”Gold standard” för analys av fT4 är equilibriumdialys (jämviktsdialys). I denna metod använder man sig av ett membran som gör att när serumet passerar membranet kommer större molekyler inte igenom. Detta gör att T4 som är bundet till protein inte kan passera, men däremot fT4 eftersom den är mindre. Efter att provet har dialyserats analyseras man sedan mängden fT4.

Studien

Jämviktsdialys används inte i dagsläget på något veterinärmedicinskt laboratorium i Sverige. Syftet med denna studie var att utvärdera om metoden fungerade bättre än nuvarande metod för att analysera fT4.

I studien provtogs 30 stycken friska hundar. Proven från dessa hundar användes till att fastställa ett referensintervall. Ett referensintervall sätter en övre och undre gräns inom vilka friska hundars värden ska ligga.

Även överblivet serum från 27 sjuka hundar som varit inlagda på Universitetsdjursjukhuset (UDS) ha använts. Dessa hundar hade andra sjukdomar än hypotyroidism. De sjuka hundarna kategoriserades sedan i kategorierna 1, 2 och 3. Där hundarna i kategori 1 var lindrigt sjuka och

de i kategori 3 svårast sjuka. De sjuka hundarnas serumprov användes sedan för att titta på om jämviktsdialysen var bättre på att särskilja hundar som faktiskt var hypotyreoidea från hundar med icke-tyreoidal sjukdom.

Resultat

När ett referensintervall räknas ut ska den baseras på 95 % av populationen, vilket betyder att 5 % bör ligga utanför ett referensintervall. Resultaten från den här studien visade att tillverkarens referensintervall eventuellt är något för brett, då alla våra friska hundar var inom referensintervallet och tendensen var mer att värdena låg åt det lägre hållet. Vårt referensintervall fastställdes till 7,7 - 27 pmol/L jämfört med tillverkarens 10,3 – 41,2 pmol/L.

Det ska dock tas i hänsyn att denna studie innehöll relativt få hundar vilket gör att referensintervallet får anses vara preliminärt.

Resultaten från hundarna med andra sjukdomar än hypotyroidism visade att en större andel av hundarna hade felaktigt klassats som hypotyreoidea om analys av T4 och fritt T4 med nuvarande analys hade använts. I enlighet med andra studier som har gjorts inom området tyder detta på att analys av fT4 efter jämviktsdialys ger en mer korrekt bedömning av sköldkörtelns funktion. Nackdelen med jämviktsdialys är dock att metoden är både dyrare och mer arbetsintensiv än metoden som för närvarande används. En utvärdering kring kostnad och arbetsinsats bör därför göras innan metoden börjar användas på UDS.

REFERENSLISTA

- Daminet, S. (2003). *Evaluation of canine thyroid function in physiological and pathological conditions*. Diss: Merelbeke, Belgium: Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine.
- Daminet, S. & Ferguson, D. C. (2003). Influence of drugs on thyroid function in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17:463–472.
- David, L. P. (2001). Conditions associated with canine hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31(5), pp. 935–950. doi: 10.1016/S0195-5616(01)50006-6.
- Despres, N. & Grant, A. M. (1998). Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clinical Chemistry*, (3), p. 15.
- van Deventer, H. E. & Soldin, S. J. (2013). The expanding role of tandem mass spectrometry in optimizing diagnosis and treatment of thyroid disease. In: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 127–152. doi: 10.1016/B978-0-12-407680-8.00005-1.
- Diaz-Espiñeira, M. M., Mol, J. A., van den Ingh, T. S., van der Vlugt-Meijer, R. H., Rijnberk, A. & Kooistra, H. S. (2008). Functional and morphological changes in the adenohypophysis of dogs with induced primary hypothyroidism: Loss of TSH hypersecretion, hypersomatotropism, hypoprolactinemia, and pituitary enlargement with transdifferentiation. *Domestic Animal Endocrinology*, 35(1), pp. 98–111. doi: 10.1016/j.domaniend.2008.03.001.
- Dixon, M., Reid, S. W. & Mooney, C. T. (1999). Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Veterinary Record*, 145(17), pp. 481–487. doi: 10.1136/vr.145.17.481.
- Dixon, R. M. & Mooney, C. T. (1999). Evaluation of serum free thyroxine and thyrotropin concentrations in the diagnosis of canine hypothyroidism. *Journal of Small Animal Practice*, 40(2), pp. 72–78. doi: 10.1111/j.1748-5827.1999.tb03040.x.
- Elliott, D. A., King, L. G. & Zerbe, C. A. (1995). Thyroid hormone concentrations in critically ill canine intensive care patients. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 5(1), pp. 17–23. doi: 10.1111/j.1476-4431.1995.tb00023.x.
- Ferguson, D. C. (2007). Testing for hypothyroidism in dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37(4), pp. 647–669. doi: 10.1016/j.cvsm.2007.05.015.
- Fialkovičová, M., Mardzinová, S., Benkova, M., Mojziso, J., Gaálová, M. & Sesztáková, E. (2012). Seasonal influence on the thyroid gland in healthy dogs of various breeds in different weights. *Acta Veterinaria Brno*, 81(2), pp. 183–188. doi: 10.2754/avb201281020183.
- Friedrichs, K. R., Harr, K. E., Freeman, K. P., Szladovits, B., Walton, R. M., Barnhart, K. F., Blanco-Chavez, J. & American Society for Veterinary Clinical Pathology. (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), pp. 441–453. doi: 10.1111/vcp.12006.
- Geffré, A., Friedrichs, K., Harr, K., Concordet, D., Trumel, C. & Braun, J. P. (2009). Reference values: a review. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(3), pp. 288–298. doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00179.x.
- Geffré, A., Concordet, D., Braun, J. P. & Trumel, C. (2011). Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel: Reference Value Advisor. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(1), pp. 107–112. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00287.x.

- Graham, P. A., Refsal, K. R. & Nachreiner, R. F. (2007). Etiopathologic findings of canine hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37(4), pp. 617–631. doi: 10.1016/j.cvsm.2007.05.002.
- Happ, G. M. (1995). Thyroiditis—A model canine autoimmune disease. In: *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. Elsevier, pp. 97–139. doi: 10.1016/S0065-3519(06)80018-2.
- Hegstad-Davies, R. L., Torres, S. M., Sharkey, L. C., Gresch, S. C., Muñoz-Zanzi, C. A. & Davies, P. R. (2015). Breed-specific reference intervals for assessing thyroid function in seven dog breeds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), pp. 716–727. doi: 10.1177/1040638715606953.
- Jaggy, A., Oliver, J. E., Ferguson, D. C., Mahaffey, E. A. & Glaus, T. Jr. (1994). Neurological manifestations of hypothyroidism: A retrospective study of 29 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8(5), pp. 328–336. doi: 10.1111/j.1939-1676.1994.tb03245.x.
- Kantrowitz, L. B., Peterson, M. E., Melián, C. & Nichols, R. (2001). Serum total thyroxine, total triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations in dogs with nonthyroidal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(6), pp. 765–769. doi: 10.2460/javma.2001.219.765.
- Kemppainen, R. J. & Behrend, E. N. (2001). Diagnosis of canine hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31(5), pp. 951–962. doi: 10.1016/S0195-5616(01)50007-8.
- Kemppainen, R. J. & Clark, T. P. (1994). Etiopathogenesis of canine hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 24(3), pp. 467–476. doi: 10.1016/S0195-5616(94)50052-4.
- Lucas, R., Lentz, K. D. & Hale, A. S. (2004). Collection and preparation of blood products. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 19(2), pp. 55–62. doi: 10.1053/j.ctsap.2004.01.007.
- Miller, A. B., Nelson, R. W., Scott-Moncrieff, J. C., Neal, L. & Bottoms, G. D. (1992). Serial thyroid hormone concentrations in healthy euthyroid dogs, dogs with hypothyroidism, and euthyroid dogs with atopic dermatitis. *British Veterinary Journal*, 148(5), pp. 451–458. doi: 10.1016/0007-1935(92)90032-V.
- Milne, K. L. & Hayes, H. M. (1981). Epidemiologic features of canine hypothyroidism. *The Cornell Veterinarian*, 71(1):3-14.
- Mooney, C. (2011). Canine hypothyroidism: A review of aetiology and diagnosis. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(3), pp. 105–114. doi: 10.1080/00480169.2011.563729.
- Nelson, R. W., Ihle, S. L., Feldman, E. C. & Bottoms, G. D. (1991). Serum free thyroxine concentration in healthy dogs, dogs with hypothyroidism, and euthyroid dogs with concurrent illness. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, (198), pp. 1401–7.
- Panciera, D. (1994). Hypothyroidism in dogs: 66 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(5):761-7
- Panciera, D. L. (1999). Is it possible to diagnose canine hypothyroidism? *Journal of Small Animal Practice*, 40(4), pp. 152–157. doi: 10.1111/j.1748-5827.1999.tb03780.x.
- Paradis, M., Lepine, S., Lemay, S. & Fontaine, M. (1991). Studies of various diagnostic methods for canine hypothyroidism. *Veterinary Dermatology*, 2(3–4), pp. 125–132. doi: 10.1111/j.1365-3164.1991.tb00123.x.

- Pashmakova, M. B., Bishop, M. A., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. & Barr, J. W. (2014). Evaluation of serum thyroid hormones in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis: Serum thyroid hormones in dogs with SIRS or sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 24(3), pp. 264–271. doi: 10.1111/vec.12172.
- Peterson, M. & Ferguson, D. C. (1984). Effects of spontaneous hyperadrenocorticism on serum thyroid hormone concentrations in the dog. *American Journal of Veterinary Research*, 1984, Oct;45(10):2034-8.
- Piechotta, M., Arndt, M. & Hoppen, H. O. (2010). Autoantibodies against thyroid hormones and their influence on thyroxine determination with chemiluminescence immunoassay in dogs. *Journal of Veterinary Science*, 11(3), p. 191. doi: 10.4142/jvs.2010.11.3.191.
- Platt, S. R. (2002). Neuromuscular complications in endocrine and metabolic disorders. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 32(1), pp. 125–146. doi: 10.1016/S0195-5616(03)00082-2.
- Ramsey, I. K., Evans, H. & Herrtage, M. E. (1997). Thyroid-stimulating hormone and total thyroxine concentrations in euthyroid, sick euthyroid and hypothyroid dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 38(12), pp. 540–545. doi: 10.1111/j.1748-5827.1997.tb03313.x.
- Schachter, S., Nelson, R. W., Scott-Moncrieff, C., Ferguson, D. C., Montgomery T., Feldman, E. C., Neal, L. & Kass, P. H. (2004). Comparison of serum-free thyroxine concentrations determined by standard equilibrium dialysis, modified equilibrium dialysis, and 5 radioimmunoassays in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18: 259-264. doi:10.1111/j.1939-1676.2004.tb02543.x
- Scott-Moncrieff, J. C. (2007). Clinical signs and concurrent diseases of hypothyroidism in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37(4), pp. 709–722. doi: 10.1016/j.cvsm.2007.03.003.
- Shiel, R. E., Acke, E., Puggioni, A., Cassidy, J. P. & Mooney C. T. (2007). Tertiary hypothyroidism in a dog. *Irish Veterinary Journal*, 60(2), p. 88. doi: 10.1186/2046-0481-60-2-88.
- Welsh, K. J. & Soldin, S. J. (2016). Diagnosis of endocrine disease: How reliable are free thyroid and total T3 hormone assays? *European Journal of Endocrinology*, 175(6), pp. R255–R263. doi: 10.1530/EJE-16-0193.