



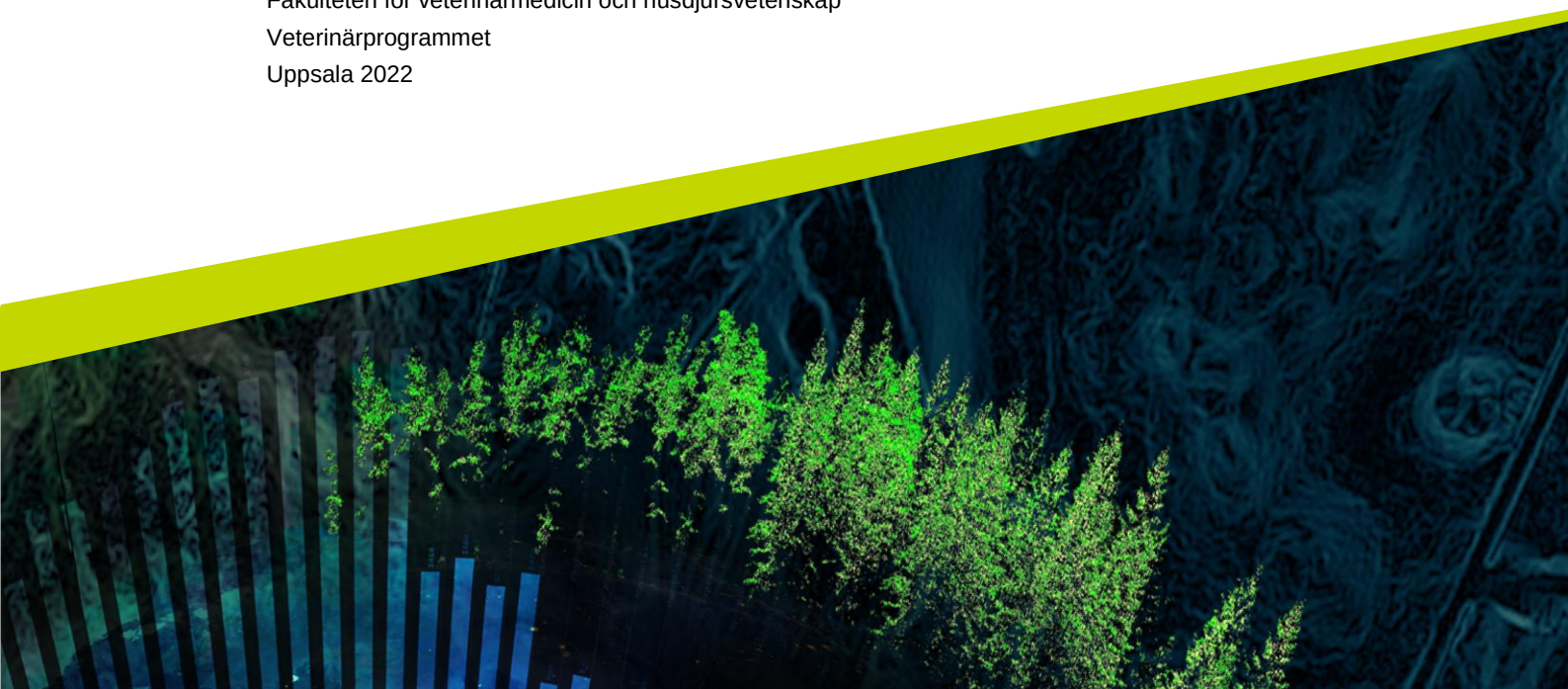
Inflammationsmarkörer hos nöt

– Kinetik av serumamyloid A (SAA) och fibrinogen vid inflammation

Inflammatory markers in cattle – Kinetics of serum amyloid A (SAA) and fibrinogen during inflammation

Amelia Åkesson

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2022



Inflammationsmarkörer hos nöt – Kinetik av serumamyloid A (SAA) och fibrinogen vid inflammation

Inflammatory markers in cattle – Kinetics of serum amyloid A (SAA) and fibrinogen during inflammation

Amelia Åkesson

Handledare: Emma Strage, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare: Sara Häggglund, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare: Jean-Francois Valarcher, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator: Anna Hillström, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning: 30 hp
Nivå och fördjupning: A2E
Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod: EX0869
Program/utbildning: Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2022

Nyckelord: Serumamyloid A, fibrinogen, inflammationsmarkörer, akutfasproteiner, LATIA, nöt

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

<https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

Inflammation är en central del i det medfödda immunförsvaret och är en vanlig anledning till att djur behandlas av veterinär. För att följa en systemisk inflammations förlopp i kroppen kan man analysera olika inflammationsmarkörer, även kallade akutfasproteiner, i blod. Hos nöt har serum-amyloid A (SAA) av flera författare klassats som ett av de viktigaste och mest användbara akutfasproteiner vid inflammation, men det har tills nyligen inte funnits någon snabb och kostnadseffektiv metod för att analysera SAA hos nöt. För att analysera SAA kan man använda sig av en metod som kallas turbidimetrisk latexagglutinationsimmunoanalys eller LATIA. Metoden har använts länge inom veterinärmedicinen då den är snabb och kostnadseffektiv, men endast för analys av ekvint och felint SAA då den ej fungerat för bovint SAA. Nyligen (2021) gjordes en studie i Japan, där ett reagens för LATIA för humanbruk modifierats för att analysera bovint SAA.

Syftet med denna studie var att undersöka användbarheten hos det nya modifierade reagentet för bovint SAA i jämförelse med några andra vanliga inflammationsmarkörer hos nöt. Om metoden fungerar skulle det möjliggöra för att analys av SAA hos nöt kan tillämpas i den kliniska vardagen.

Studiepopulationen bestod av fem nöt inskrivna på idisslarkliniken vid SLU. Kriterier för medverkan i studien var att djuret skulle genomgå kirurgi eller hade tecken på klinisk inflammation och ett positivt glutavactest. Av djuren som medverkade skulle två opereras för högersidig löpmagsförskjutning, en för vänstersidig löpmagsförskjutning, en skulle amputera en extraspene och en hade kraftig bursit i en has. Venöst blodprov togs från djuren före operationen (n=4), 24 timmar efter operation, 48 timmar efter operation samt 72 timmar efter operation. Om djuret var inskrivet för tillstånd som orsakade systemisk inflammation (n=1) togs ett 0-prov, sen prov 24, 48 och 72 timmar efter 0-provet. I de fall djuret skrevs ut eller avlivades innan avslutad provtagning togs färre antal prov. Proven analyserades med avseende på totalprotein, albumin, globuliner, SAA, fibrinogen och hematologi. Före analys av SAA med det nya modifierade reagentet utvärderades metodens variationskoefficienter och linjäritet efter spädning. Resultaten bedömdes ligga inom acceptabla gränser. Genom mixed model analys visades en signifikant skillnad mellan provtagningarna för SAA ($p=0,039$), men inte fibrinogen ($p=0,51$).

I studien kom man fram till att SAA-nivåerna hos djuren stämde väl överens med förväntad grad av inflammation. Fibrinogen följde dock inte samma mönster. Djuren med högersidig löpmagsförskjutning hade högre värden på SAA än det med vänstersidig löpmagsförskjutning, vilket överensstämmer med tidigare studier.

LATIA med en modifierad humanreagent för analys av bovint SAA visar enligt denna studie vara en fungerande analysmetod på nöt. Resultaten från denna studie visar att SAA potentiellt är mer lämplig för övervakning av inflammation hos nöt än glutavac och fibrinogen.

Nyckelord: Serumamyloid A, fibrinogen, inflammationsmarkörer, akutfasproteiner, LATIA, nöt

Abstract

Inflammation plays a central role in the innate immunity and is a common reason for veterinary treatment of animals. To follow a systemic inflammation, different inflammatory markers, also known as acute phase proteins, in blood can be analyzed. In cattle, serum amyloid A is, according to several authors, one of the most important and most useful acute phase proteins, but up until recently there have been no quick and cost-efficient method of analyzing SAA in cattle. To analyze SAA a method called latex agglutination turbidimetric immunoassay, or LATIA, can be used. This method has been used for a long time in veterinary medicine since it is quick and cost-efficient, but only for analyzing equine and feline SAA. It has not worked for analyzing bovine SAA. In a recent study (2021) made in Japan, a human reagent for LATIA was modified to detect the bovine SAA.

The aim of this study was to examine the usefulness of the new modified reagent for the detection of bovine SAA and to compare the serum levels of SAA with those of several other inflammatory markers in cattle. A reliable method would enable the detection of bovine SAA in clinical day to day work.

The study population consisted of five cattle admitted to the ruminant clinic at the Swedish University of Agricultural Sciences. To be included in the study, the animals needed to be admitted for undergoing surgery, or having signs of a clinical inflammation and a positive glutavac test. The included animals underwent surgery for right abomasal displacement (n=2), left abomasal displacement (n=1), amputated an extra teat (n=1), or had a severe bursitis on a hock (n=1). The surgery patients (n=4) had a venous blood sample drawn before surgery, 24 hours after, 48 hours after and 72 hours after surgery. If the animal had a condition that caused a systemic inflammation (n=1), a 0-sample, 24 hours, 48 hours and 72 hours after the 0-sample, were drawn. If the animal was discharged or euthanized before the sampling was done, fewer samples were drawn. Total protein, albumin, globulins, SAA, fibrinogen and hematology were analyzed. Prior to the analysis with the new modified reagent, an evaluation of the method was carried out. In this evaluation the coefficient of variation (CV) and the linearity was assessed to lay within acceptable limits. With mixed model analysis a significant difference of SAA between the first and last sampling occasion was seen ($p=0,039$), but not for fibrinogen ($p=0,51$).

A main finding of this study was that the SAA-levels in the animals agreed with the expected level of inflammation. Fibrinogen and glutavac did not follow this pattern. In agreement with previous studies, the animals with right abomasal displacement had higher values on SAA than the animal with left abomasal displacement.

LATIA with a modified human reagent for analysis of bovine SAA shows, according to this study, promise as a functioning method more suitable for monitoring patients than the glutavac test or analysis of fibrinogen.

Keywords: Serum amyloid A, fibrinogen, inflammatory markers, acute phase proteins, LATIA, bovine

Innehållsförteckning

Förkortningar	8
1. Inledning	9
2. Litteraturoversikt	10
2.1. Inflammation	10
2.2. Akutfasproteiner	10
2.2.1. Serumamyloid A.....	11
2.2.2. Haptoglobin.....	13
2.2.3. Fibrinogen	14
2.2.4. Albumin	15
2.2.5. Globuliner.....	15
2.2.6. Akutfasproteiners påverkan av stress	17
3. Material och metod	19
3.1. Djur i studien.....	19
3.2. Analytiska metoder	19
3.3. Studiedesign	21
4. Resultat.....	23
4.1. Utvärdering av analysmetoden för SAA	23
4.2. Analysresultat	24
4.2.1. Nöt 1: RDA.....	24
4.2.2. Nöt 2: RDA.....	26
4.2.3. Nöt 3: Spenamputation	28
4.2.4. Nöt 4: LDA	30
4.2.5. Nöt 5: Bursit hos	32
4.2.6. Serumamyloid A och fibrinogen hos alla provtagna djur	34
5. Diskussion.....	35
5.1. Slutsats	40
Referenser.....	41
Populärvetenskaplig sammanfattning	47

Förkortningar

CV	Variationskoefficienten (eng: coefficient of variation)
DAMP	Skadeassocierade molekulära mönster (eng: damage associated molecular patterns)
HB	Hemoglobin
IL	Interleukin
IG	Immunoglobulin
LATIA	Turbidimetrisk Latexagglutinationsimmunoanalys (eng: latex agglutination turbidimetric immunoassay)
LDA	Vänstersidig löpmagsförskjutning (eng: left abomasal displacement)
NaCl	Natriumklorid
PAMP	Patogenassocierade molekulära mönster (eng: pathogen-associated molecular patterns)
PCR	Polymeraskedjereaktion (eng: polymerase chain reaction)
PRR	Patogenigenkännande receptorer (eng: pathogen recognition receptors)
TNF- α	Tumörnekrosfaktor- α (eng: tumour necrosis factor- α)
TLR	Tollika receptorer (eng: toll-like receptors)
RDA	Högersidig löpmagsförskjutning (eng: right abomasal displacement)
SAA	Serumamyloid A
SD	Standardavvikelse
SLB	Svensk låglandsboskap
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
SRB	Svensk röd boskap
SR-B1	Sökarreceptor B1 (eng: scavenger receptor B1)
UDS	Universitetsdjursjukhuset

1. Inledning

Inflammation är en central del i det medfödda immunförsvaret och kan triggas av infektiösa eller icke-infektiösa orsaker. Dessa triggande faktorer kan vara exempelvis bakterier eller vävnadsskada. Inflammationen består av multipla celltyper och kemiska substanser som samverkar för återställande av skadan i kroppen.

Inflammation är också en vanlig orsak till att djur behandlas av veterinär, men det kan vara svårt att enbart med klinisk undersökning avgöra om ett djur har systemisk inflammation eller inte. För att konstatera en systemisk inflammation, bedöma prognos och även följa effekt av insatt behandling kan man analysera olika inflammationsmarkörer i blod. Metoden turbidimetrisk latexagglutinations-immunoanalys eller LATIA, har använts sedan 1956 för att analysera akutfasproteinet serumamyloid A (SAA) (Gella *et al.* 1991). Metoden används inom veterinärmedicinen även idag, men endast för att analysera SAA hos katt och häst då metoden ej fungerat för analys av SAA hos nöt. Någon annan kostnadseffektiv och snabb metod för att analysera SAA hos nöt har inte heller funnits (Otsuka *et al.* 2021), vilket medfört att analys av SAA hos nöt inte används i den kliniska vardagen. Detta trots att det visats vara en av de viktigaste och mest användbara akutfasproteinerna hos nöt (Ceciliani *et al.* 2012).

Nyligen, i en japansk studie, har ett reagens för LATIA för humanbruk modifierats och visats fungera för att analysera bovint SAA (Otsuka *et al.* 2021).

Syftet med denna studie var att undersöka användbarheten hos det nya modifierade reagentet för bovint SAA i jämförelse med några andra vanliga inflammationsmarkörer hos nöt.

Den nämnda analysmetoden är en automatiserad metod som, om den visar sig fungera, ska kunna inkluderas för analys av SAA som en del av rutindiagnostiken för nöt.

2. Litteraturöversikt

2.1. Inflammation

Inflammation en viktig del i det så kallade medfödda immunförsvaret. Inflammationen kan triggas av infektiös eller icke-infektiös orsak, exempelvis bakterier eller vävnadsskada. Det medfödda immunförsvaret är den andra skyddsbarriären mot infektion, efter fysisk skyddsbarriär så som hud, och består av kemiska och cellulära försvarsmekanismer. Dessa försvarsmekanismer är det vi sammantaget kallar för inflammation.

Inflammationen börjar med att skademolekyler (DAMPar), olika exogena patogena strukturer (PAMPar) eller endogena alarminer, känns igen av igenkänningsreceptorer (PRRs) på sentinelceller som exempelvis dendritiska celler. Sentinelcellerna medierar aktivering och migration ut i vävnaden av viktiga immunologiska celltyper, så som neutrofiler och makrofager, med hjälp av cytokiner och vasoaktiva molekyler. Exempel på några viktiga proinflammatoriska cytokiner är IL-1, IL-6 och TNF- α . De vasoaktiva molekylerna, vilka inkluderar histamin, vasoaktiva lipider, enzymer, cytokiner och kemokiner, medierar vasodilatation och förändrar strukturen på kärlväggarna. Detta tillåter genomsläpp av bland annat inflammatoriska celler från blodbanan och ut i vävnaden. Det är de vasoaktiva molekylerna som är centrala i orsakandet av fyra av de fem kardinalsymptomen (rodnad, svullnad, smärta och värme) för akut inflammation. När detta skett är en inflammation inducerad och processen mot elimination av patogener eller en reparation av skadad vävnad är påbörjad (Punchard *et al.* 2004; Tizard 2009; Bertoni *et al.* 2015).

2.2. Akutfasproteiner

Akutfasproteiner är biomarkörer, vilka klassas som ”negativa”- eller ”positiva” proteiner som minskar respektive ökar vid inflammatoriska tillstånd (Murata *et al.* 2004; Gruys *et al.* 2005; Nazifi *et al.* 2009).

I en studie gjort av Horadagoda *et al.* år 1999 undersöktes huruvida akutfasproteiner kan användas för att skilja mellan akut och kronisk inflammation hos nöt.

I studien använde man 81 kliniska fall med nöt som diagnostiserats genom klinisk undersökning, relevanta provtagningar och, i de fall det var möjligt, obduktion. Diagnosen klassades sedan som inflammatorisk eller icke-inflammatorisk, varpå djuren med inflammatoriska diagnoser såsom exempelvis luftvägssjukdom, osteomyelit eller leverabscesser inkluderades i studien. Djuren var av olika kön, ålder och ras. Leukocyter och akutfasproteinerna serumamyloid A, haptoglobin och α 1-glykoprotein undersöktes hos djuren. Genom att jämföra stegringen av olika typer av leukocyter med stegringen av akutfasproteinerna, kom man fram till att den sammantagna bilden av individens akutfasproteiner spelar en viktig roll i att skilja mellan akut och kronisk inflammation hos nöt. Dock krävs mer studier för att man ska kunna använda metoden i den kliniska vardagen (Horadagoda *et al.* 1999).

Hos nöt är SAA och haptoglobin så kallade major akutfasproteiner, vilket innebär att dessa är de akutfasproteiner som stiger mest vid inflammation. De är alltså de viktigaste akutfasproteinerna vid klinisk användning (Ceciliani *et al.* 2012), men andra som exempelvis fibrinogen, vilken anses vara en säker indikator på inflammation hos nöt, används också kliniskt (Murata *et al.* 2004). Även albumin förekommer, men sjunker istället vid inflammation (Ceciliani *et al.* 2012).

2.2.1. Serumamyloid A

Serumamyloid A, även kallat SAA, är ett så kallat positivt akutfasprotein som ökar vid inflammatoriska processer. Hos nöt finns fyra isoformer av SAA (SAA1-4), samtliga apolipoproteiner, där SAA1 och SAA2 är akutfasproteiner. Proteinet syntetiseras i levern genom inducering av pro-inflammatoriska cytokiner så som IL-1, IL-6 och TNF α varpå det transporteras ut i den systemiska cirkulationen (Ceciliani *et al.* 2012; Tizard 2009; Horadagoda *et al.* 1999; Otsuka *et al.* 2020). Hos nöt kan en isoform av SAA även syntetiseras av andra celltyper än hepatocyter. Studier har visat att så kallat mammärt SAA (M-SAA3) kan produceras av epitelceller i mjölkkörtlar i juvret (McDonald *et al.* 2001; Eckersall *et al.* 2006). Därmed återfinns SAA3 i colostrum (Orro *et al.* 2008) och mjölk från kor med mastit (Jacobsen *et al.* 2005). Studier har även visat att mRNA som kodar för SAA3 även uttrycks i flera andra vävnader hos nöt så som exempelvis synovialmembran, thyroidea (Berg *et al.* 2011) och abomasum (Dilda *et al.* 2012). Dock i mycket lägre utsträckning än i hepatocyter (Berg *et al.* 2011; Dilda *et al.* 2012). Funktionen hos SAA4 är ännu i stor utsträckning okänd, men det verkar inte på samma vis som övriga isoformer och är inte involverat i inflammation (Otsuka *et al.* 2020).

SAA kan stiga upp emot 100 gånger vid akut inflammation och sjunker snabbt när inflammationen försvinner (Kushner 1982; Ceciliani *et al.* 2012).

SAA:s verkningsmekanism vid inflammation

SAA har flertalet olika biologiska funktioner, och alla är sannolikt ej kartlagda än. SAA har immunomodulerande aktivitet och verkar direkt på immunförsvaret.

Genom att verka kemoattraktivt för neutrofiler, monocyter och T-celler (Tizard 2009) medieras migration, adhesion och vävnadsinfiltration av ovan nämnda celltyper. Humant SAA reagerar med formyl-L-methionyl-L-peptiden (fMLP) på FPRL1-receptorn på cellerna och verkar då kemotaxiskt. Just denna aktivitet är ännu inte kartlagd hos bovin SAA (Ceciliani *et al.* 2012). SAA kan även uppreglera IL-8 vilket attraherar och aktiverar neutrofiler (Tizard 2009). In vitro-studier har även visat att bovin SAA3 kan hindra adherens av enteropatogena *Escherichia coli* (EPEC) till humana tarmceller (Mack *et al.* 2003).

En annan biologisk funktion SAA har är att binda kolesterol (Ceciliani *et al.* 2012). Kolesterol triggar inflammation genom aktivering av Toll-like receptors (TLR). Dessa är extra- och intracellulära igenkänningsreceptorer som signalerar olika patogena strukturer (PAMP) och sätter igång immunrespons samt initiering av inflammation genom olika cytokiner vid aktivering (Tall & Yvan-Charvet 2015; Tizard 2009). Det finns flera olika typer av TLRs som signalerar för olika PAMP, där TLR-1 är den som signalerar för kolesterol (Tizard 2009). SAA binder och tar bort kolesterol från inflammationsplatsen. Genom sin struktur som apolipoprotein kan SAA interagera med molekyler som sedan kan hitta och ta upp kolesterol från celler som gått i apoptos vid inflammationen. SAA binder till receptorn SR-B1 på makrofager, vilket ökar bortforsling av kolesterol från fagocyterade cellmembran (Westhuyzen *et al.* 2005; Ceciliani *et al.* 2012).

SAA:s tredje biologiska funktion är att verka opsoniserande (Ceciliani *et al.* 2012). Opsonisering innebär att komplementproteiner fäster till patogenens yta för att signalera till fagocyterande celler (Tizard 2009). Bovin SAA tros kunna opsonisera både Gram- och Gram+ bakterier. Viktigt att nämna är att studier som gjorts på bovin SAAs opsoniserande mekanismer främst utförts på juverceller. Cirkulerande SAA kan därför bete sig annorlunda (Ceciliani *et al.* 2012).

Turbidimetrisk latexagglutinationsimmunoanalys

Flera metoder kan användas för att mäta SAA i serum. Den som används i denna studie är turbidimetrisk latexagglutinationsimmunoanalys (LATIA). Metoden har använts länge för humanbruk (Gella *et al.* 1991), men även för analys av SAA hos katt och häst (Stoneham *et al.* 2001; Tamamoto *et al.* 2008; Christensen *et al.* 2012).

Metoden LATIA innebär att man använder en latexlänkad monoklonal eller polyklonal antikropp i ett reagens, som binder till en specifik del av proteinet som ska undersökas, här SAA. Komplexen agglutinerar i provet och turbiditeten kan då mätas med hjälp av spektrofotometri (Christensen *et al.* 2012; Hiraoka *et al.* 2019).

Nyligen gjordes en studie av Otsuka *et al.* (2021) där ett LATIA-reagens för humanbruk som modifierats av tillverkaren (Eiken Chemical Co, Tokyo, Japan) för att kunna analysera bovin SAA undersöktes. Reagenset, som också används i denna studie, är modifierat genom förändring av antikroppen i lösningen. Humant och bovin SAA skiljer sig genom att det bovina SAA1 och SAA2 saknar en del av

aminosyra-sekvensen jämfört med humant SAA, och är därmed kortare. Om man jämför regionen där aminosyrasekvensen skiljer sig och det saknas aminosyror i bovin SAA jämfört med humant SAA är homologin 53,1 % respektive 76,2 %. I övriga delar av genomet är homologin hög. Antikroppen modifierades så att den skulle binda till sekvensen från N-terminalen 80e till 90e aminosyran i bovin SAA1 och SAA2, där homologin är hög. Liknande modifiering har gjorts av samma laboratorium (Eiken Chemical Co, Tokyo, Japan) där reagenset framgångsrikt använts i flera studier för att analysera SAA hos hund, katt och häst med LATIA (Tamamoto *et al.* 2008; Christensen *et al.* 2012).

I studien från Otsuka *et al.* (2021) påvisades användbarheten av reagenset för att mäta bovin SAA.

2.2.2. Haptoglobin

Haptoglobin är som tidigare nämnt ett viktigt akutfasprotein hos nöt. Det är ett positivt akutfasprotein som likt SAA främst produceras av hepatocyter i levern (Ceciliani *et al.* 2012) genom inducering av cytokinen IL-6 (Tizard 2009). Haptoglobin har i studier dock påvisats kunna produceras även i vissa extrahepatiska vävnader.

Dilda *et al.* (2012) gjorde en studie där man med hjälp av Western blot och immunohistokemi påvisade förekomst av haptoglobin i mukosans ytepitel i abomasum. Däremot fann man inget genuttryck av mRNA som kodade för haptoglobin i abomasum. Man kunde därför dra slutsatsen att haptoglobinet bildades i annan vävnad, förslagsvis enligt författarna i levern, och sedan transporterades till abomasum.

Thielen *et al.* (2007) kunde däremot påvisa produktion av haptoglobin av mammarceller i sin studie. Detta genom att med PCR påvisa uttryck av haptoglobin-mRNA i alveolära mammarceller.

Saremi *et al.* (2012) kunde i en annan studie med PCR påvisa uttryck av haptoglobin-mRNA i fettväv hos nöt.

Haptoglobins primära funktion är att binda fritt hemoglobin i blodet och därmed hindra det från att orsaka oxidativa skador. Haptoglobin binder, förutom hemoglobin, även järn. I och med sin järnstabiliserande mekanism verkar haptoglobinet som direkt antioxidativt (Ceciliani *et al.* 2012).

Haptoglobins verkningsmekanism vid inflammation

Genom sin bindning av järn hindras järnet från att tas upp av järnberoende patogener så som *Escherichia coli*. På så sätt hindras uppförökning av fler bakterier (Tizard 2009). Däremot finns det järnberoende bakterier som kan utnyttja hemoglobinet och därmed dess bundna järn, trots att komplexet är bundet till haptoglobin (Ceciliani *et al.* 2012).

Haptoglobin verkar även direkt på både det medfödda och det förvärvade immunförsvaret. När haptoglobinet är bundet till hemoglobin binder det även till CD163-receptorer på monocyter och makrofager, vilket inducerar antiinflammatoriska mediatorer från nämnda celltyper. Mediatorerna är exempelvis hemoxygenas-1 och IL-10 (Philippidis *et al.* 2004; Ceciliani *et al.* 2012). IL-10 är en antiinflammatorisk och immunosuppressiv cytokin som dämpar svar från T-celler, NK-celler och makrofager (Tizard 2009).

Genom bindning till neutrofiler kan haptoglobin även, genom inhibering av lipoxygenas och cykloxygenas, hämma neutrofilaktivitet. Därmed verkar haptoglobinet sammantaget som antiinflammatoriskt (Ceciliani *et al.* 2012).

2.2.3. Fibrinogen

Fibrinogen är ett positivt akutfasprotein som syntetiseras i levern. Det blir hos nöt generellt endast förhöjt upp till ca 3 gånger jämfört med normalnivån (McSherry *et al.* 1970) och tar även längre tid att sjunka jämfört med exempelvis SAA. Halveringstiden för fibrinogen är runt fyra dygn hos människa (Tennent *et al.* 2006; Davalos & Akassoglou 2012).

Fibrinogen är en viktig del i hemostasen och koagulationskaskaden. Det är därför viktigt vid läkning av vävnadsskada. En del i kaskaden är att trombin klyver fibrinogenmolekylen till fibrin, som sedan polymeriseras och bildar ett fibrinnät som trombocyter kan fästa i. Restprodukter vid klyvningen blir fibrinopeptid A och B (Green 2006; Davalos & Akassoglou 2012; Luyendyk *et al.* 2019).

Fibrinogens verkningsmekanism vid inflammation

Fibrinogen verkar både direkt och indirekt på immunförsvaret genom bindning och aktivering av flertalet immunceller. Exempelvis genom bindning till integrinerna CD11b/c och CD18 på leukocyter (Solovjov *et al.* 2005; Luyendyk *et al.* 2019). Denna signalering leder till aktivering av så kallade NF- κ B-pathway (Davalos & Akassoglou 2012; Luyendyk *et al.* 2019) som spelar en central roll i inflammation och stimulerar produktion av interleukiner så som IL-1, IL-6, IL-18 och TNF- α . Dessa inducerar sedan ytterligare inflammation och immunrespons (Tizard 2009). Fibrinogen kan även binda till TLR-4 som aktiverar makrofager samt inducerar frisättning av flertalet cytokiner (Smiley *et al.* 2001).

Peptiden fibrinopeptid B som tidigare nämnts klyvs av från fibrinogen i koagulationskaskaden verkar direkt immunomodulerande genom att vara kemoattraktivt för leukocyter (Davalos & Akassoglou 2012). Fibrinogen kan även verka antiinflammatoriskt, genom att skydda neutrofiler från neutrofila extracellulära fällor (Locke *et al.* 2020).

Ellis-Stranskymetoden

Fibrinogen kan mätas med bland annat en så kallad ”QuickVet® analyzer”, vilken använder Ellis-Stranskymetoden. Detta är en gammal välbeprövad metod för att mäta fibrinogen i plasma. I analysen polymeriseras fibrinogen med hjälp av en trombinreagent, på liknande vis som i koagulationskaskaden. Turbiditeten i provet kan sedan mätas genom spektrofotometri och instrumentet omvandlar resultatet till en fibrinogenkoncentration (Burmester *et al.* 1970).

Fibrinogen kan även undersökas med glutavactestet som beskrivs nedan. Där emot indikerar glutavactestet en stegring av fibrinogen och/eller immunoglobuliner. Man kan därmed inte använda detta test för att säkerställa en stegring av just fibrinogen, utan testet används mer som en indikator på inflammation (Brink *et al.* 2005).

2.2.4. Albumin

Albumin är ett så kallat negativt akutfasprotein som därmed minskar vid inflammation. Proteinet syntetiseras i levern och står för 35-50 % av totalproteinmängden (Kaneko *et al.* 2008). En hypoalbuminemi, som karakteriserar en inflammation, kan även bero på förlust av proteinet. Detta kan ske vid exempelvis njur- eller tarmsjukdom. Hypoalbuminemi som uppstår vid inflammation orsakas av en nedsatt syntes i levern till följd av inflammation (Bertoni *et al.* 2008). En leverinsufficiens kan ge samma effekt. Även långvarig svält och proteinbrist kan leda till en hypoalbuminemi. Albuminets största funktion är att verka som bärare av icke vattenlösliga ämnen i blodet, så som exempelvis vissa hormoner, hemmolekyler och fettsyror.

Albumin har ingen direkt verkan på inflammationen, utan är mer utav en indikator för en pågående inflammation i kombination med övriga symptom och parametrar (Kaneko *et al.* 2008). Dock har albumin en halveringstid på 14-16 dygn hos idisslare, och en hypoalbuminemi till följd av inflammation kan ta veckor att utveckla (Thrall *et al.* 2012).

2.2.5. Globuliner

Globuliner är globulära proteiner som är involverade i flertalet biologiska processer i kroppen. Globulinerna klassas in i olika grupper beroende på hur snabbt de rör sig vid en elektrofores, där α - och β -globuliner rör sig snabbare än γ -globuliner. Många av α - och β -globulinerna är transportproteiner (Gaur *et al.* 2019). Tidigare nämnda haptoglobin är exempelvis en α -globulin (Ceciliani *et al.* 2012). γ -globulinerna, och några β -globuliner, är antikroppar och därmed direkt involverade i immunförsvaret (Tizard 2009).

Globulinnivåerna i blodet inkluderas i analys av totalprotein i blod. Mängden totalprotein i ett prov kan alltså indikera om inflammation föreligger. I totalprotein

ingår dock mängder med olika proteiner och en hyperproteinemi kan bero på flertalet olika orsaker, där dehydrering är en av de vanligaste.

En hyperproteinemi är alltså inte en direkt indikation på inflammation, trots att stegringen av globuliner kan bidra till en viss hyperproteinemi (Smith 2014). Globuliner kan öka av andra orsaker än inflammation och elektrofores för att ta reda på vilken typ av globuliner som är förhöjda ger betydligt säkrare information om en inflammation föreligger, än ett förhöjt värde på totalproteinerna (Tizard 2009). Ett sänkt värde på globuliner har ett viktigt diagnostiskt värde för unga kalvar med failure of passive transport, det vill säga otillräcklig mängd maternala immunoglobuliner från colostrum (Weaver *et al.* 2000).

De olika immunoglobulinerna

De flesta immunoglobulinerna, undantaget IgM, tillhör som tidigare nämnt gruppen γ -globuliner, vilka rör sig långsammast vid en elektrofores (Tizard 2009).

Immunoglobuliner (Ig) är en del av det förvärvade immunförsvaret och produceras av B-celler. Det är glykoproteiner med en antikroppsaktivitet. Det finns fem olika klasser av immunoglobuliner där IgG är den som har högst koncentration i serum. Därefter är det IgM, IgA, IgE och IgD i fallande ordning. Immunoglobulinerna består av två identiska lätta kedjor och två identiska tunga γ -kedjor och har olika många antigenbindande platser.

IgG står för en viktig del i det antikroppsmedierade immunsvaret. IgG binder till antigen och verkar agglutinerande och opsoniserande. IgG kan även aktivera komplementsystemet, vilket är en enzymkaskad med flera biologiska funktioner bland andra cytotoxicitet och opsonisering. Hos nöt finns tre subklasser av IgG. Dessa kallas IgG1, IgG2 och IgG3 (Tizard 2009).

IgM är den immunoglobulin som ökar mest vid primär immunrespons, men kan även vara involverad i sekundär immunrespons. IgM är mer effektiv än IgG på att aktivera komplementsystemet, agglutinera, opsonisera samt neutralisera virus. Detta till följd av sin pentamer struktur (Tizard 2009; Wang *et al.* 2016).

IgA återfinns framför allt på slemhinnor i exempelvis luftvägar, mag-tarmkanal och urinvägar. Den verkar genom att agglutinera antigen och hindrar invaderande patogener från att adherera till kroppsytan (Phalipon *et al.* 2002; Tizard 2009).

IgD är ett immunoglobulin som inte är lika studerat som övriga immunoglobuliner. IgD finns främst i membranbunden form och fungerar som en B-cellsreceptor (Tizard 2009; Xu *et al.* 2012). IgM har genom antikroppsklassbyte visats kunna bli IgD i övre luftvägar hos människa, för att därpå kunna binda till invaderande bakterier (Chen & Cerutti 2011). Studier har visat att IgD finns hos nöt, men i mindre utsträckning än hos människa (Xu *et al.* 2012).

IgE är främst en signalöverföringsmolekyl som är kopplad till allergiska reaktioner. Den återfinns som tidigare nämnt i mycket låga nivåer i en frisk individ. Genom korsbindning mellan antigen, IgE och en mastcell aktiveras mastcellen och

fristätter inflammatoriska molekyler så som antihistamin (Kawakami & Galli 2002; Tizard 2009).

Glutavac

Glutaraldehydtest eller Glutavac är ett välbeprövat snabbtest för att diagnosticera inflammation hos bland annat nöt som använts sen 70-talet (Sandholm 1974; Brink *et al.* 2005). En glutaraldehydreagent i testet, vilken innehåller en aldehydgrupp, reagerar med fria aminogrunder i fibrinogen eller immunoglobuliner i blod och gör att provet koagulerar. Ju högre koncentration av fibrinogen och immunoglobuliner, desto snabbare koagulerar provet. Provet läses av vid flera förbestämda tidpunkter, varvid diagnos om inflammation eller ej kan ställas. Ju snabbare provet koagulerar, desto kraftigare inflammation har individen. Glutavactestet kan ej skilja på stegring av fibrinogen och stegring av immunoglobuliner, utan indikerar endast en stegring av någon, eller båda, proteinerna (Sandholm 1974; Brink *et al.* 2005; Bernarski *et al.* 2019).

I en studie av Metzner *et al.* gjord 2007 undersöktes användbarheten av testet samt vilken typ av provmaterial som gav säkrast resultat och därmed lämpar sig bäst för att använda. I kohortstudien undersöktes korrelationen mellan koagulationstiden och proteinfraktionen i provet. Testet kördes på EDTA- och hepariniserat blod samt på serum och plasma. Dubbla prov togs för att undersöka precisionen hos testet. Resultatet blev att EDTA-blod gav säkrast svar och lämpar sig därför bäst att använda som provmaterial.

I en annan studie där testets användbarhet undersöktes kom man fram till att ju kraftigare inflammation, desto högre tillförlitlighet hade testet. I studien rekommenderade författarna att testet används tillsammans med klinisk bild för att utesluta inflammation (Bernarski *et al.* 2019). I tidigare nämnda kohortstudie av Metzner *et al.* (2007) påvisades att testet hade bäst effekt vid 7-8 minuters positivt utslag.

2.2.6. Akutfasproteiners påverkan av stress

I några studier på nöt har det visats en statistisk signifikans för att stress kan påverka nivåerna av akutfasproteiner i blod, och därmed skulle akutfasproteiner enligt studierna kunna användas som en välfärdsmarkör.

I en studie av Alseemgest *et al.* (1995) visades att SAA i serum steg hos kalvar som utsattes för stress. I studien utsattes två grupper, med fem friska kalvar vardera, för olika hala golv i sina inhägnader. Man utförde regelbundna beteendeobservationer och analyser av hur djuren rörde sig över golven. En grupp halkade signifikant mer än den andra. Hos dessa djur fann man lindrigt förhöjda nivåer av SAA i serum. Däremot steg inte haptoglobin hos denna djurgrupp (Alseemgest *et al.* 1995). I studien lägger man fram att tidigare bevis för att IL-6 inducerats av adrenalin hos råttor (van Gool *et al.* 1990) kan vara en möjlig förklaring till stegringen i

SAA vid stress hos kalvar (Alsemgeest *et al.* 1995). Även kortisol har visats kunna stimulera bildning av SAA och haptoglobin av hepatocyter i in vitro studier (Higuchi *et al.* 1994; Alsemgeest *et al.* 1996)

Lomborg *et al.* tittade år 2008 på huruvida även vuxna nöt fick en stegring av akutfasproteiner när de utsattes för stress. I studien transporterades åtta friska vuxna nöt i fyra till sex timmar till en forskningsanläggning. Vid ankomst till forskningsanläggningen kunde djuren genom beteendeobservationer konstateras vara stressade. Blodprov togs före transport samt 8, 24 och 48 timmar efter transporten. Blodproven analyserades med avseende på SAA, haptoglobin och hematologi. Provtagningen visade på neutrofili i närmst anslutning till transporten, samt att SAA och haptoglobin ökade med tiden när djuren befann sig på forskningsanläggningen och slutsats drogs att de nämnda akutfasproteinerna ökar vid stress även hos vuxna nöt.

Även Giannetto *et al.* (2011) gjorde en studie där man analyserade akutfasproteiner hos 10 vuxna nöt i samband med och efter transport till slakteri. I studien sågs att SAA, haptoglobin samt totalantal leukocyter ökade efter transporten, men fibrinogen var på liknande nivåer (Casella *et al.* 2012).

3. Material och metod

3.1. Djur i studien

Djur som inkluderades i studien var fyra privatägda nötkreatur och ett nötkreatur tillhörande universitetet, vilka samtliga var inskrivna på idisslarkliniken vid SLU (etiskt tillståndsnummer 5.8.18-15533/2018). Kriterier för medverkan i studien var att djuret skulle genomgå kirurgi eller hade kliniska tecken på systemisk inflammation. Djuret skulle vid misstanke om systemisk inflammation ha positiv glutavac för att medverka. Ålder, kön och ras noterades och beskrivs i tabellen nedan. Djurägarna godkände djurens medverkan i studien genom att skriva under ett medgivande vid inskrivning av djuret. Försöket gick under Institutionen för kliniska vetenskapers djuretiska tillstånd och provtagningen var därmed godkänd av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (diarienummer 5.8.18-15533/2018).

Tabell 1. Djur medverkande i studien. SLB - svensk låglandsboskap, SRB - svensk röd boskap, RDA - högersidig löpmagsförskjutning, LDA - vänstersidig löpmagsförskjutning.

Identitet	Ras	Ålder	Kön	Diagnos
1	SLB	5 år	Hondjur	RDA
2	SRB	4 år	Hondjur	RDA
3	SLB	2 år	Hondjur	Spenamputation
4	SLB/SRB-korsning	3 år	Hondjur	LDA
5	SRB	1 år	Hondjur	Bursit has

3.2. Analytiska metoder

Analyserna som inkluderades i studien var analys av totalprotein, albumin, kalkylering av globuliner, glutavac, LATIA för analys av SAA, Elis-Stranskymetoden för analys av fibrinogen samt hematologisk undersökning. Dessa analyser ingår antingen i rutindiagnostiken vid UDS idag eller kan sättas upp och därmed ingå i framtida rutindiagnostik.

Glutavactestet gjordes direkt i stallet bredvid djuret. Provet blandades genom att vickas fem gånger direkt efter deponering av blod utan tillsats i röret. Därefter vickades provet vid varje minut tills provet stelnat eller i maximalt 15 minuter. Tiden för provets stelning antecknades.

För analys av SAA, totalprotein och albumin användes serumrör. Rören stod i rumstemperatur i 30 min efter provtagning för att stelna. Därefter centrifugerades rören i 2000 x *g* i 10 min vid rumstemperatur och serumet pipetterades sedan upp till tre alikvoter. Alikvoterna märktes upp och frystes in i -80 °C i väntan på analys. Klinisk kemiska laboriet vid UDS analyserade sedan proverna vid ett och samma tillfälle i slumpmässig ordning inom samma djur med avseende på SAA, totalprotein och albumin. Analysen utfördes på instrumentet Abbott Architect c4000. För analys av SAA användes det modifierade humanreagenset från Eiken Chemical Co. Om provkoncentrationen av SAA låg utanför instrumentets mätintervall späddes provet. Albumin analyserades av instrumentet med en metod baserad på bromkresolgrönt. Bromkresolgrönt binder specifikt till albuminet och bildar ett färgkomplex vars absorbans är direkt proportionell till albuminkoncentrationen i provet (Lee Rodkey 1964; Wells *et al.* 1985). För analys av totalprotein använder instrumentet biuretmetoden. Metoden utnyttjar att proteiner, vilka har två eller fler peptidbindningar, reagerar med koppar. Dessa bildar ett färgkomplex vars absorbans är direkt proportionell till mängden protein i provet om koppar finns i överflöd (Sánchez Rojas & Cano Pavón 2005).

Globulinerna kunde efter värden på totalprotein och albumin bestämts kalkyleras genom formeln globulin = totalprotein – albumin.

För analys av fibrinogen användes citratplasma. Citratröret centrifugerades direkt efter provtagning, enligt instruktion från tillverkaren av analysinstrumentet, i 893 x *g* under 8 min vid rumstemperatur. Därefter pipetterades 100 µl citratplasma över i reagensröret från tillverkaren. Lösningen blandades genom att pipettera upp och åter deponera lösningen fem gånger. Därefter vickades röret fem gånger för att försäkra sig om fullständigt blandad lösning. Slutligen pipetterades 100 µl av lösningen upp och deponerades i brunnen för provmaterial på provkassetten, vilken förts in i analysinstrumentet QuickVet® analyser. Provet analyserades i analysinstrumentet enligt Ellis-Stranskymetoden beskriven i sektionen 2.2.3 med en reagent för ekvint fibrinogen.

För analys av hematologi användes EDTA-blod. Ett blodutstryk gjordes direkt efter provtagning. Därefter användes resterande mängd blod till hematologisk analys av analysinstrumentet Advia® 2120i på Klinisk kemiska laboriet. Blodutstryket analyserades under mikroskop där en manuell differentialräkning av leukocyter gjordes. Endast leukocyttantal och hemoglobin inkluderades i studien.

Utvärdering av analysmetoden för analys av SAA

Inför LATIA med det nya modifierade reagenset för analys av bovint SAA gjordes en utvärdering av analysen. Vid utvärderingen togs ett serumprov från ett nöt med konstaterad kraftig inflammation till följd av diagnosticerad fibrinös peritonit, pleurit och perikardit. Provet användes sedan för att undersöka testets precision och linjäritet.

För att undersöka testets precision gjordes inomkörningstester där samma prov analyserades tio gånger direkt efter varandra. Av resultatet från de tio körningarna kunde sedan, med hjälp av medelvärdet på körningarna, standardavvikelsen kalkyleras och därefter kunde variationskoefficienten (CV %) för testet fastställas enligt formeln $CV (\%) = (\text{standardavvikelsen}/\text{medelvärdet}) * 100$. För att ytterligare undersöka testets precision analyserades två olika prov med kontrollmaterial av animaliskt ursprung (medelvärde 9,83 mg/L och 50,8 mg/L) på 8 respektive 11 olika dagar. Mellankörningsvariationskoefficienterna för de två proverna fastställdes sedan på samma vis som för inomkörningsvariationen, med hjälp av medelvärde och standardavvikelse.

För att undersöka testets linjäritet gjordes en seriespädning i 20 %-steg med NaCl ner till som lägst 20 % provkoncentration. För varje spädningssteg kalkylerades en förväntad nivå (E) av SAA, genom att multiplicera det erhållna värdet med spädningsfaktorn. Den observerade koncentrationen (O) registrerades och utifrån detta kunde linjäriteten (O/E) kalkyleras.

Statistisk analys

För de statistiska analyserna av testet användes JMP Pro version 16. Skillnad i koncentration av SAA och fibrinogen under behandling utvärderades med en mixed model analys på de kor som uppvisade tecken på inflammation innan behandling (n=4). Ko sattes som slumpmässig effekt och provtagning som fast effekt. För att ytterligare undersöka vilka provtagningstillfällen som skiljde sig åt gjordes Tukey's HSD multiple comparisons test.

3.3. Studiedesign

Venöst blodprov togs ur jugularvenen på nöt. Vid provtagning konstaterades tiden mellan ankomst till kliniken och provtagningen. Före varje provtagning noterades djurets status enligt klinikens veterinärer. Bedömningen användes senare till att subjektivt gradera djurets kliniska bild från 1–5 där 1 är frisk och 5 är mycket allvarligt sjuk. Provet togs med vacutainerkanyl alternativt direkt ur permanent kanyl i de fall djuret hade en sådan. I de fall provet togs direkt ur permanentkanylen drogs först 5 ml blod med spruta vilket kasserades. Detta för att undvika felaktiga värden på fibrinogen då blod kan ha koagulerat i permanentkanylen.

20 ml blod drogs med spruta i de fall djuret hade permanentkanyl. Blodet fördelades sedan i EDTA-rör (4 ml), två serumrör (4 ml vardera), ett citratrör (4 ml) och i ett glutavac-test där blod fylldes till mittersta strecket på testet. Om djuret ej hade permanentkanyl togs blodet direkt i ovan nämnda rör med hjälp av vacutainerkanyl.

Prov togs på samma djur före operationen, 24 timmar efter operation, 48 timmar efter operation samt 72 timmar efter operation. I samband med operationen behandlades djuren med meloxicam 15 mg/kg kroppsvikt som engångsdos eller q 24h om det bedömdes nödvändigt mot smärta. Behandling med bensylpenicillin 20 mg/kg kroppsvikt q 24h påbörjades även på djuren som genomgick bukkirurgi.

Om djuret var inskrivet för tillstånd som orsakade systemisk inflammation (exempelvis bursit) togs först ett ankomstprov. Därefter togs prov 24, 48 och 72 timmar efter ankomstprovet. I de fall djuret skrevs ut eller avlivades innan avslutad provtagning togs färre antal prov.

Efter samtliga provtagningar av samtliga parametrar gjordes en analys av de olika värdena för respektive individ.

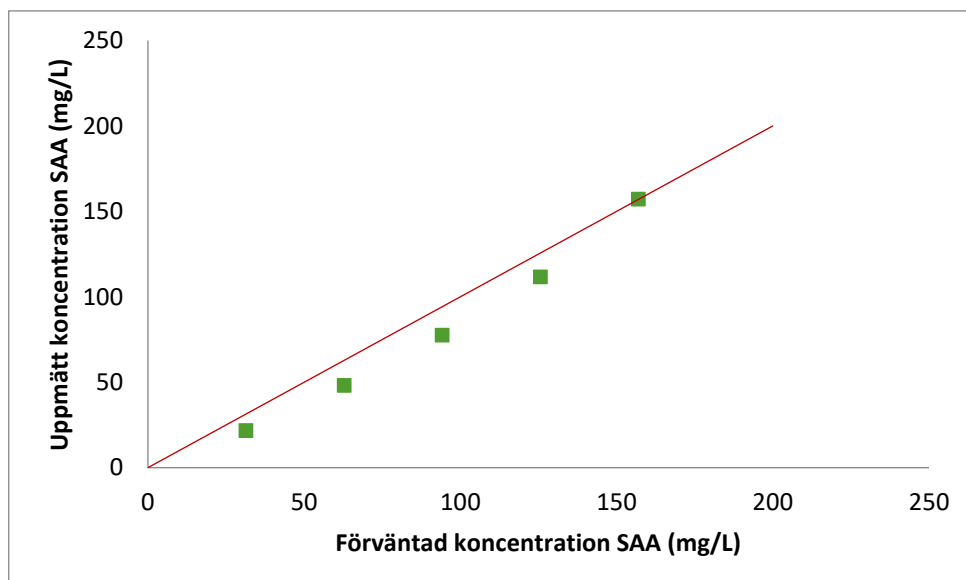
4. Resultat

4.1. Utvärdering av analysmetoden för SAA

För att utvärdera analysmetoden som användes vid undersökning av SAA kontrollerades som tidigare nämnt testets variationskoefficient samt testets linjäritet. Vid undersökning av inomkörningsvariation var medelvärdet av de tio seriekörningarna 52,87 mg/L, standardavvikelsen (SD) var 0,47 mg/L och CV kalkylerades därmed till 0,89 %.

Vid undersökning av mellankörningsvariation av de två olika kontrollproverna kom man fram till att medelvärdet av seriekörningarna var 9,82 mg/L respektive 50,80 mg/L, standardavvikelserna var 0,75 respektive 1,61 och CV kalkylerades då till 7,6 % respektive 3,2 %.

Vid undersökning av linjäriteten gjordes som tidigare beskrivet en seriespädning med NaCl. Resultatet av spädningen blev att O/E var 69–89 %.



Figur 1. Linjäriteten vid spädning i 20 %-steg med NaCl där de gröna punkterna representerar uppmätt koncentration vid de olika spädningarna. Kurvan $y=x$, då man har 100 % överensstämmande med förväntat SAA, illustreras i rött. Punkten som har 100 % överensstämmande representerar ospädd prov.

4.2. Analysresultat

4.2.1. Nöt 1: RDA

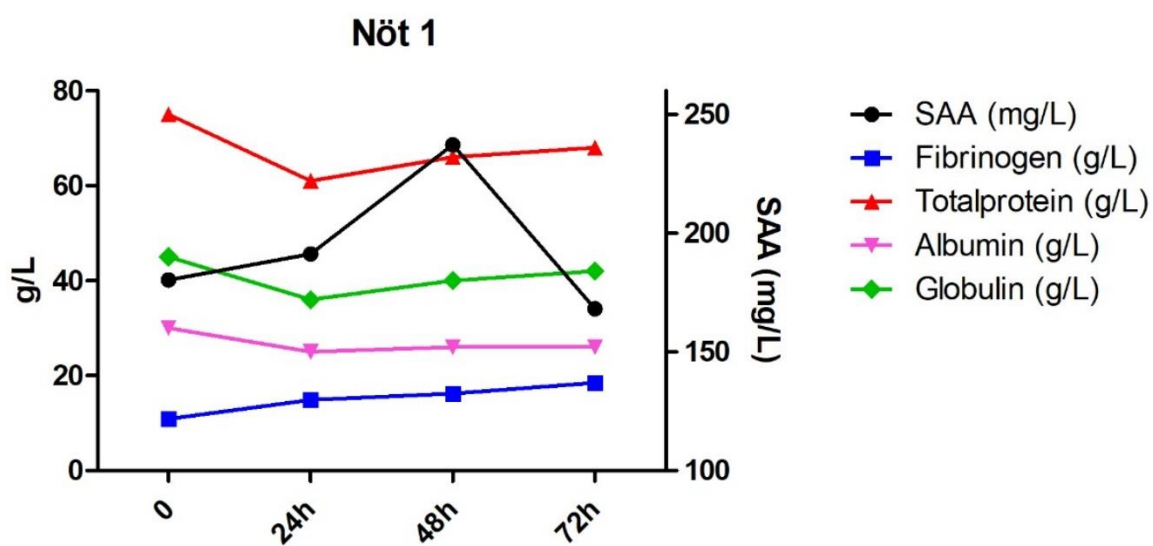
Nöt 1 genomgick en operation utan komplikationer och gick hem efter sista provtagningen genomförts. Djuret var väldigt sjuk vid ankomst till kliniken, 5 på skalan 1–5, och mådde bättre dag för dag efter operationen. Vid hemgång klassades djuret som friskt. I samband med operationen behandlades kon med meloxicam 15 mg/kg kroppsvikt som engångsdos. Behandling med bensylpenicillin 20 mg/kg kroppsvikt q 24h påbörjades även.

Glutavactestet stelnade på kortare och kortare tid vartefter tiden gick efter operationen. Fibrinogenet steg gradvis. Vid analys av SAA behövdes alla proven spädas då värdena var utanför instrumentets mätintervall. SAA steg efter operationen, men gick sedan ner mellan 48 och 72 timmar. Totalproteiner sjönk efter operationen, men steg därefter gradvis igen. Detsamma gäller albuminet och globulinerna.

Hematologin visade på neutrofili med måttlig vänsterförskjutning samt lindriga toxiska förändringar vid ankomst. Bortsett från ett förhöjt hemoglobin vid ankomst var den röda blod bilden utan klinisk anmärkning. Med tiden försvann de toxiska förändringarna och inflammationen dämpades. Däremot bestod vänsterförskjutningen under hela klinikvistelsen, men gick från måttlig till lindrig.

Tabell 2. Provresultat nöt nr 1, värdet på serumamyloid A är ett medelvärde av två replikat. * innebär att provet var utanför mätintervall och späts med NaCl. Värdet som anges är omräknat med korrekt spädningsfaktor.

Nöt 1	0-prov	24 h	48 h	72 h	Referens-intervall
Klinisk bild (1-5)	5	3	2	1	
Glutavac (min)	15	9	5	5	≥15
Fibrinogen (g/L)	10,9	14,9	16,2	18,5	<7
Serumamyloid A (mg/L)	180*	191*	237*	168*	<7
Totalprotein (g/L)	75	61	66	68	58–75
Albumin (g/L)	30	25	26	26	32–38
Globuliner (g/L)	45	36	40	42	26–40



Figur 2. Diagram över provresultat nöt 1.

Tabell 3. Hematologiresultat nöt 1. Endast hemoglobin är inkluderat från den röda blodbilden, då övrigt var utan klinisk relevans. Alla leukocytantal utgår från manuell differentialräkning.

Hematologi Nöt 1	0-prov	24 h	48 h	72 h	Referens- intervall
Leukocyter ($\times 10^9$ celler/L)	9,44	5,95	7,19	8,74	5,1–13,3
Segmentkärniga neutrofiler ($\times 10^9$ celler/L)	3,21	1,9	2,8	2,53	1,7–6,0
Stavkärniga neutrofiler ($\times 10^9$ celler/L)	1,79	0,89	0,36	0,35	<0,2
Lymfocyter ($\times 10^9$ celler/L)	3,4	2,62	2,59	3,41	1,8–8,1
Monocyter ($\times 10^9$ celler/L)	1,04	0,18	0,5	1,4	0,1–0,7
Eosinofiler ($\times 10^9$ celler/L)	1	0,36	0,93	<0,1	0,1–1,2
Basofiler ($\times 10^9$ celler/L)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2
Toxiska förändringar	Lindriga	Lindriga	Inga	Inga	
Hb (g/L)	142	113	110	113	84–120

4.2.2. Nöt 2: RDA

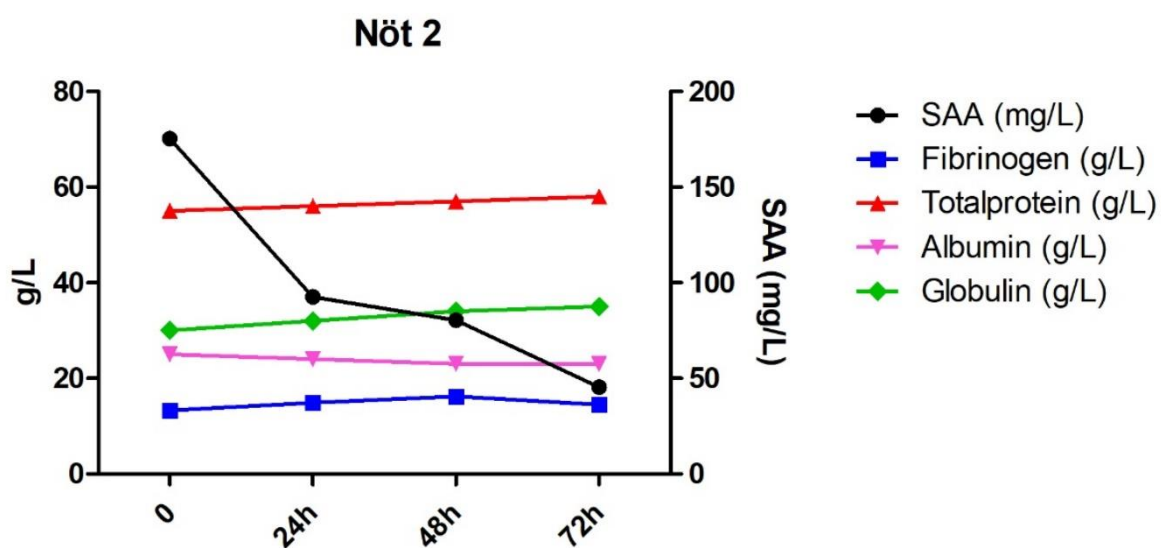
Även nöt 2 genomgick alla provtagningar enligt planen. Vid ankomst till kliniken hade djuret ikteriska slemhinnor samt väldigt dåligt allmäntillstånd. Hon bedömdes som 5 på skalan mellan 1-5 där 1 var frisk och 5 mycket sjuk. Hon genomgick en operation som förflöpte enligt plan. I samband med operationen behandlades kon med meloxicam 15 mg/kg kroppsvikt som engångsdos. Behandling med bensylpenicillin 20 mg/kg kroppsvikt q 24h samt behandling med metamizol 15 mg/kg kroppsvikt q 24h påbörjades även. Den första dagen efter operationen mådde djuret bättre än vid ankomst. Påföljande dagar blev djuret dock inte bättre och beslut om avlivning togs då dålig prognos. Djuret obducerades där diagnosen ulcerativ reticulorumenit med trombos i vena cava vid leverhilus ställdes. Djuret hade även ett fokalt extensivt hematoma i omentum, i området för löpmagen.

Nöt 2 hade hela tiden ett negativt glutavactest. Fibrinogenet steg lindrigt succesivt efter operationen, men sjönk mellan 48 och 72 timmar efter operationen. SAA sjönk relativt kraftigt, succesivt efter operationen. Totalproteinerna steg lindrigt efter operationen, albuminet sjönk och globulinerna steg.

Vid ankomst till kliniken hade denna ko kraftig degenerativ vänsterförskjutning med kraftiga toxiska förändringar. Detta kvarstod dagen efter operationen och förbättrades inte förrän efter 48 timmar. Då hade hon måttlig vänsterförskjutning med måttliga toxiska förändringar samt ökning av lymfocyter inom referens. Till 72 timmar efter operationen ses ytterligare förbättring med lindrig vänsterförskjutning samt lindriga toxiska förändringar. Den röda blodbildningen var hela tiden utan klinisk anmärkning.

Tabell 4. Provresultat nöt 2, värdet på serumamyloid A är ett medelvärde av två replikat.

Nöt 2	0-prov	24 h	48 h	72 h	Referensintervall
Klinisk bild (1-5)	5	3	3	3	
Glutavac (min)	15	15	15	15	≥15
Fibrinogen (g/L)	13,3	14,9	16,2	14,5	<7
Serumamyloid A (mg/L)	175	93	80	45	<7
Totalprotein (g/L)	55	56	57	58	58–75
Albumin (g/L)	25	24	23	23	32–38
Globuliner (g/L)	30	32	34	35	26–40



Figur 3. Diagram över provresultat nöt 2.

Tabell 5. Hematologiresultat nöt 2. Endast hemoglobin är inkluderat från den röda blodbilden, då övrigt var utan klinisk relevans. Alla leukocytantal utgår från manuell differentialräkning.

Hematologi Nöt 2	0-prov	24 h	48 h	72 h	Referens- intervall
Leukocyter ($\times 10^9$ celler/L)	6,09	4,97	6,86	8,39	5,1–13,3
Segmentkärniga neutrofiler ($\times 10^9$ celler/L)	1,16	0,8	1,17	2,85	1,7–6,0
Stavkärniga neutrofiler ($\times 10^9$ celler/L)	2,25	1,59	0,82	0,5	<0,2
Lymfocyter ($\times 10^9$ celler/L)	2,25	2,44	3,84	4,45	1,8–8,1
Monocyter ($\times 10^9$ celler/L)	0,24	0,1	0,48	0,42	0,1–0,7
Eosinofiler ($\times 10^9$ celler/L)	0,18	0,05	0,55	0,17	0,1–1,2
Basofiler ($\times 10^9$ celler/L)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2
Toxiska förändringar	Kraftiga	Kraftiga	Måttliga	Lindriga	
Hb (g/L)	111	103	101	100	84–120

4.2.3. Nöt 3: Spenamputation

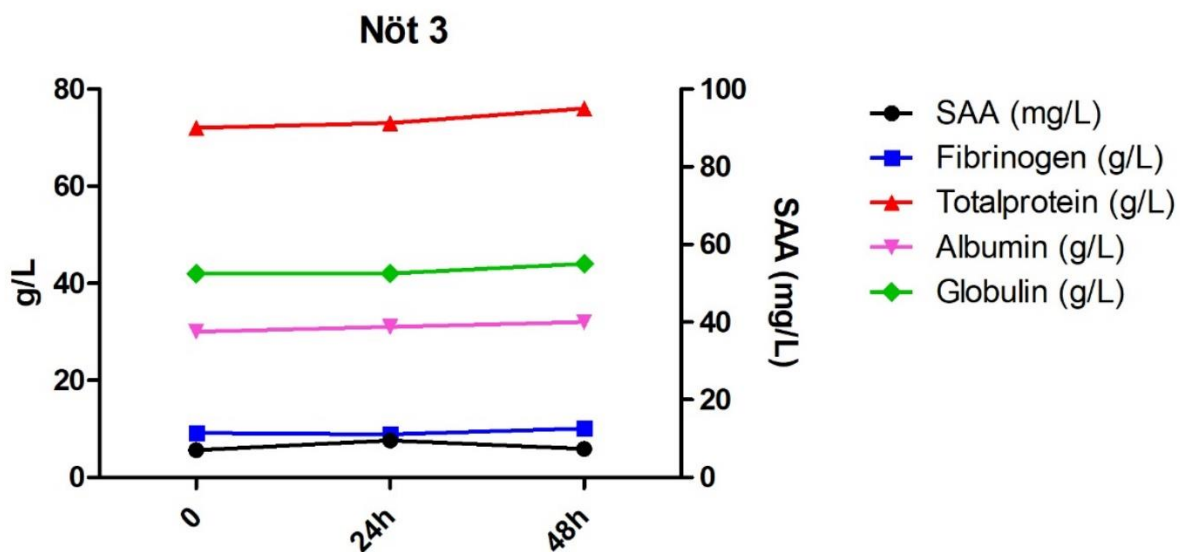
Nöt 3 skrevs ut från kliniken efter 48 timmar och provtogs därför endast fyra gånger. Hon bedömdes som frisk under hela sin klinikvistelse. Hon genomgick en operation där en extraspene togs bort och ingreppet förlöpte utan komplikationer. I samband med ingreppet behandlades kon med meloxicam 15 mg/kg kroppsvikt som engångsdos.

Glutavactestet var negativt vid ankomst. Dagen efter stelnade det på 12 minuter, för att sedan före hemkomst stelna långsammare igen. Fibrinogenet var över referens (<7 g/L) vid ankomst, trots att djuret klassades som friskt. Det sjönk efter ingreppet för att sedan stiga igen. SAA var under referens vid ankomst. Efter ingreppet steg SAA lindrigt, för att sedan sjunka till hemgång. Totalproteiner, albumin och globuliner steg efter ingreppet.

Vid ankomst till kliniken hade denna ko lindrig leukocytos med lindrig neutrofil. Den röda blodbilden var utan klinisk anmärkning.

Tabell 6. Provresultat nöt 3, värdet på serumamyloid A är ett medelvärde av två replikat.

Nöt 3	0-prov	24 h	48 h	72h	Referens-intervall
Klinisk bild (1-5)	1	1	1	-	
Glutavac (min)	15	12	14	-	≥15
Fibrinogen (g/L)	9,2	8,9	10,1	-	<7
Serumamyloid A (mg/L)	<7	10	7	-	<7
Totalprotein (g/L)	72	73	76	-	58–75
Albumin (g/L)	30	31	32	-	32–38
Globuliner (g/L)	42	42	44	-	26–40



Figur 4. Diagram över provresultat nöt 3.

Tabell 7. Hematologiresultat nöt 3. Endast hemoglobin är inkluderat från den röda blodbilden, då övrigt var utan klinisk relevans. Alla leukocyttantal utgår från manuell differentialräkning.

Hematologi Nöt 3	0- prov	24 h	48 h	72 h	Referens- intervall
Leukocyter ($\times 10^9$ celler/L)	13,56	7,62	7,77	-	5,1–13,3
Segmentkärniga neutrofiler ($\times 10^9$ celler/L)	7,73	1,83	2,41	-	1,7–6,0
Stavkärniga neutrofiler ($\times 10^9$ celler/L)	0,14	<0,1	<0,1	-	<0,2
Lymfocyter ($\times 10^9$ celler/L)	4,88	4,88	3,57	-	1,8–8,1
Monocyter ($\times 10^9$ celler/L)	0,14	0,53	0,93	-	0,1–0,7
Eosinofiler ($\times 10^9$ celler/L)	0,68	0,38	0,85	-	0,1–1,2
Basofiler ($\times 10^9$ celler/L)	<0,1	<0,1	<0,1	-	<0,2
Toxiska förändringar	Inga	Inga	Inga	-	
Hb (g/L)	107	107	107	-	84–120

4.2.4. Nöt 4: LDA

Nöt 4 inkom i relativt dåligt allmäntillstånd och bedömdes vara en 4 på den 5-gradiga skalan över mående. Hon genomgick en operation som fortlöpte utan komplikationer. I samband med operationen påbörjades behandling med meloxi-cam 15 mg/kg kroppsvikt q 24 h samt med bensylpenicillin 20 mg/kg kroppsvikt q 24h.

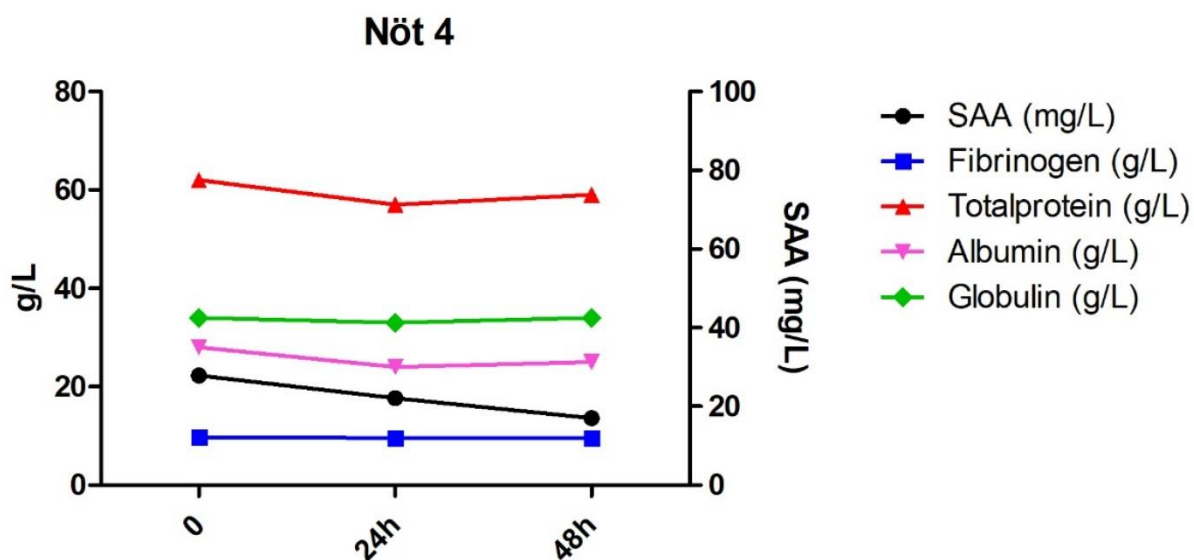
Hon mådde till en början lite bättre efter operationen, men blev sedan sämre igen och beslut om avlivning togs då prognos pessima. Djuret obduceras efter avlivning varpå diagnos med kraftig leverlipidos samt akut hemorragisk enterit ställdes.

Djurets glutavactest var hela tiden negativt. Fibrinogenet låg på nästan exakt samma värde genom hela klinikvistelsen. SAA sjönk efter operationen. Totalproteinerna sjönk efter operationen, men steg därefter gradvis. Albuminet sjönk till dagen efter operationen, men steg sedan något. Detsamma gällde globulinerna.

Vid ankomst till kliniken hade nöt 4 lindrigt förhöjt Hb. Hematologiskt sågs inga tecken på inflammation under hela klinikvistelsen. Den röda blod bilden var utan klinisk relevans.

Tabell 8. Provresultat nöt 4, värdet på serumamyloid A är ett medelvärde av två replikat.

Nöt 4	0-prov	24 h	48 h	72 h	Referens-intervall
Klinisk bild	4	3	4	-	
Glutavac (min)	15	15	15	-	≥15
Fibrinogen (g/L)	9,7	9,6	9,6	-	<7
Serumamyloid A (mg/L)	28	22	17	-	<7
Totalprotein (g/L)	62	57	59	-	58–75
Albumin (g/L)	28	24	25	-	32–38
Globuliner (g/L)	34	33	34	-	26–40



Figur 5. Diagram över provresultat nöt 4.

Tabell 9. Hematologiresultat nöt 4. Endast hemoglobin är inkluderat från den röda blodbilden, då övrigt var utan klinisk relevans. Alla leukocyttantal utgår från manuell differentialräkning.

Hematologi Nöt 4	0- prov	24 h	48 h	72 h	Referens- intervall
Leukocyter ($\times 10^9$ celler/L)	4,26	2,73	3,4	-	5,1–13,3
Segmentkärniga neutrofiler ($\times 10^9$ celler/L)	1,92	0,63	0,58	-	1,7–6,0
Stavkärniga neutrofiler ($\times 10^9$ celler/L)	0,17	<0,1	<0,1	-	<0,2
Lymfocyter ($\times 10^9$ celler/L)	2,04	1,99	2,52	-	1,8–8,1
Monocyter ($\times 10^9$ celler/L)	0,09	0,11	0,31	-	0,1–0,7
Eosinofiler ($\times 10^9$ celler/L)	0,04	<0,1	<0,1	-	0,1–1,2
Basofiler ($\times 10^9$ celler/L)	<0,1	<0,1	<0,1	-	<0,2
Toxiska förändringar	Inga	Inga	Inga	-	
Hb (g/L)	121	105	105	-	84–120

4.2.5. Nöt 5: Bursit has

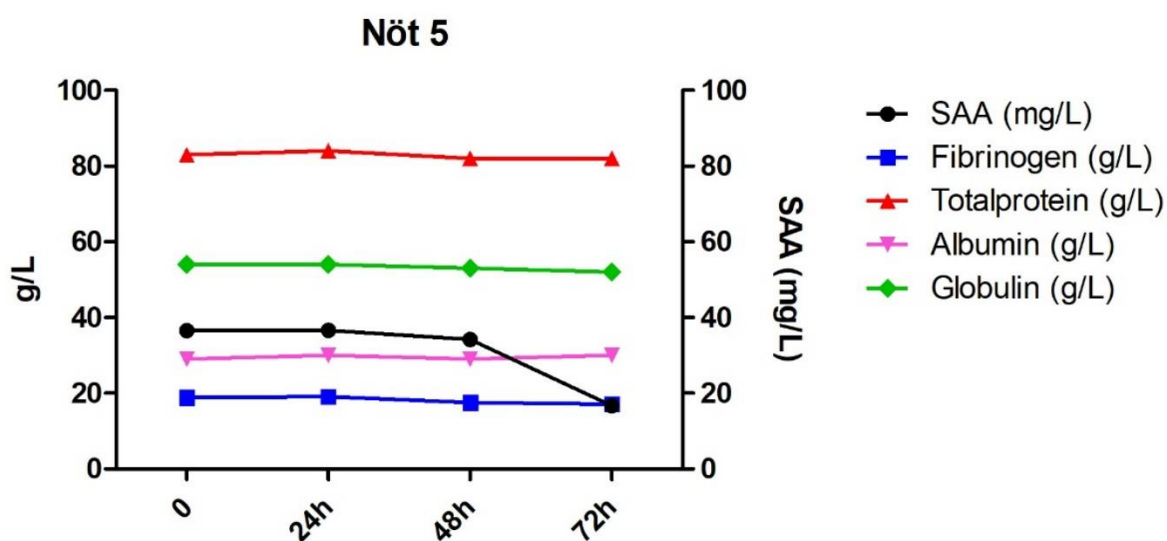
Nöt 5 befann sig på kliniken under hela planerade provtagningsperioden och alla prover togs enligt plan. Vid ankomst till kliniken bedömdes djuret ligga på 3 på den 5-gradiga skalan för mående. Hennes inflammerade bursor vid hasen spolades med jodlösning och hon sattes på 0,5 mg meloxicam/kg kroppsvikt/dygn samt 20 mg bensylpenicillin/ kg kroppsvikt/dygn. Bursan fortsattes att spolas dagligen med jodlösning. Hon blev gradvis bättre under behandlingen. Efter provtagningsens slut fortsatte kvigan behandlas på kliniken.

Kvigans glutavac stelnade vid ankomst på 2 minuter. Dagarna efter stelnade det ytterligare snabbare, men efter 72 timmar återgick det till att stelna på 2 minuter. Fibrinogenet steg från första till andra provtagningen, men sjönk sedan lite var dag. Detsamma gällde SAA och totalproteiner. Albuminet pendlade en enhet upp och ner från dag till dag. Globulinerna sjönk något dag 2 och dag 3, men var hela tiden förhöjda.

Hematologin på detta djur var hela tiden utan anmärkning. Leukocyterna sjönk från dag till dag inom referensintervallet. Den röda blodbilden var utan klinisk relevans.

Tabell 10. Provresultat nöt 5, värdet på serumamyloid A är ett medelvärde av två replikat.

NÖT 5	0-prov	24 h	48 h	72 h	Referens-intervall
Klinisk bild	3	3	2	2	
Glutavac (min)	2	1	1	2	≥15
Fibrinogen (g/L)	18,9	19,1	17,5	17,1	<7
Serumamyloid A (mg/L)	37	37	34	17	<7
Totalprotein (g/L)	83	84	82	82	58–75
Albumin (g/L)	29	30	29	30	32–38
Globuliner (g/L)	54	54	53	52	26–40



Figur 6. Diagram över provresultat nöt 5.

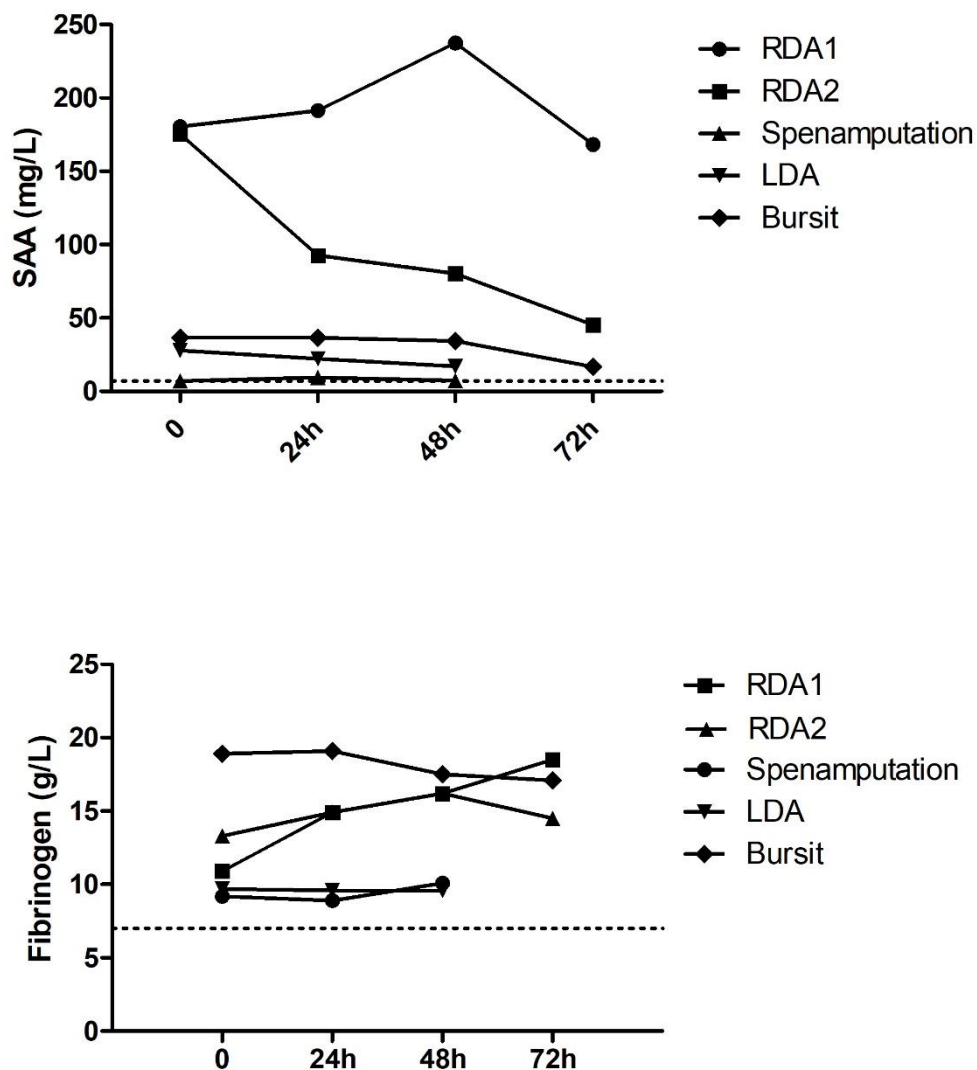
Tabell 11. Hematologiresultat nöt 5. Endast hemoglobin är inkluderat från den röda blodbilden, då övrigt var utan klinisk relevans. Alla leukocytantal utgår från manuell differentialräkning.

Hematologi Nöt 5	0- prov	24 h	48 h	72 h	Referens- intervall
Leukocyter ($\times 10^9$ celler/L)	11,93	10,1	9,68	9,38	5,1–13,3
Segmentkärniga neutrofiler ($\times 10^9$ celler/L)	3,7	3,84	3,87	2,7	1,7–6,0
Stavkärniga neutrofiler ($\times 10^9$ celler/L)	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,2
Lymfocyter ($\times 10^9$ celler/L)	6,8	5,35	4,55	5,91	1,8–8,1
Monocyter ($\times 10^9$ celler/L)	0,72	0,61	0,58	0,38	0,1–0,7
Eosinofiler ($\times 10^9$ celler/L)	0,72	0,2	0,58	0,38	0,1–1,2
Basofiler ($\times 10^9$ celler/L)	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,2
Toxiska förändringar	Inga	Inga	Inga	Inga	
Hb (g/L)	102	100	100	101	84–120

4.2.6. Serumamyloid A och fibrinogen hos alla provtagna djur

Preliminära data i mixed model-analysen visade att residualerna för SAA inte var normalfördelade och SAA logtransformerades. Modellen visade en signifikant skillnad mellan provtagningarna för SAA ($p=0,039$) men inte för fibrinogen ($p=0,51$). Tukey's HSD multiple comparisons test visade att SAA vid provtagning efter 72 h låg signifikant lägre ($p=0,028$) än vid 0-provet.

Figur 7 visar en jämförelse mellan samtliga djur över hur SAA och fibrinogen förändrades över tid.



Figur 7. Jämförande bild av samtliga provtagna djur där kinetik av serumamyloid A och fibrinogen illustreras. SAA – serumamyloid A, RDA – högersidig löpmage, LDA – vänstersidig löpmage. Den streckade linjen representerar angivna referensintervall.

5. Diskussion

Huvudfyndet i denna studie var att metoden med LATIA fungerar för att detektera SAA hos nöt. Vidare kan man med denna studie även konstatera att SAA-nivåerna hos djuren stämde väl överens med förväntad grad av inflammation.

För att kunna använda den nya analysmetoden med LATIA gjordes som tidigare nämnts först en utvärdering av analysmetoden. Reagenset i denna studie är detsamma som Otsuka *et al.* (2021) undersökte i sin studie, varför dessa två studier nedan jämförs med varandra.

Den första delen av denna studie gick ut på att utvärdera analysmetoden. Otsuka *et al.* (2021) bedömde testets precision genom kalkylering av variationskoefficienten med hjälp av inomkörningstester på tre poolade serumprov. Vid inomkörningstesterna i studien av Otsuka *et al.* kalkylerades variationskoefficienten (CV) att variera mellan 1,08 % och 1,31 %, vilket bedöms som mycket god precision. Vid utvärdering av analysmetoden i denna studie kalkylerades CV till 0,89 %. Detta innebär mycket hög precision av testet. Resultatet stämmer även väl överens med utvärderingen gjord av Otsuka *et al.* Detta är något man förväntat sig eftersom utvärdering gjorts på liknande vis och av samma test.

Vid utvärdering av en analysmetod bör även mellankörningsvariabiliteten undersökas. Samma prov analyseras då på flera olika dagar för att sedan, på samma vis som inomkörningsvariabiliteten, kalkylera en variationskoefficient. Eftersom proverna i denna studie analyserades alla vid ett och samma tillfälle var denna variabilitet ingenting som påverkade resultatet. Däremot var det intressant att undersöka för att ytterligare bestämma testets precision inför eventuell vidare klinisk användning av analysmetoden. Vid undersökning av mellankörningsvariationen, som blev 7,6 % och 3,2 %, kan man konstatera att denna variabilitet är något större än inomkörningsvariationen men anses vara bra för en metod som är baserad på antikroppar. Jämför man de två proverna där mellankörningsvariationen undersöktes var CV lägre för provet med medelvärde 50,8 mg/L, där CV var 3,17 %, än för provet med medelvärdet 9,83 mg/L, där CV var 7,6 %. Detta tyder på att testets precision blir bättre vid högre koncentrationer.

I denna studie gjordes samma typ av spädningsserie i steg om 20 % som Otsuka *et al.* (2021) gjorde i sin studie. Proverna späddes med NaCl eftersom detta skulle användas under den riktiga provanalysen om spädning av ett prov krävdes. Observerade SAA-nivåer i spädningarna visade ett O/E på 69–89 %, vilket tolkades

som acceptabelt. Spädning med serum har undersökts i en pilotprovtagning till denna studie, och gav liknande resultat på O/E.

Otsuka *et al.* (2021) gjorde även en linjär regressionsanalys för att undersöka användbarhet av serum respektive plasma. Resultatet blev att serum och plasma korrelerade väl till varandra, varpå slutsatsen drogs att både serum och plasma kan användas för analysen. I denna studie valdes serum, då övriga analyser som skulle köras på samma prov krävde serumprov.

Otsuka *et al.* (2021) hade även en del i sin studie som gick ut på att kliniskt tillämpa analysen, och då att provta djur med mastit. Eftersom Otsuka *et al.* gjorde nämnd avgränsning fokuserades denna studie på att undersöka SAA under behandling av olika diagnoser där man förväntar en systemisk inflammation. Otsuka *et al.* jämförde stegringen av SAA med haptoglobin och α 1glykoprotein. Dessa akutfasprotein är inga som ingår i rutindiagnostiken som utförs på Klinisk kemiska laboratoriet vid UDS idag. Därför valdes andra inflammationsmarkörer att ha för jämförelse i denna studie. För analysen av fibrinogen användes i studien ett reagens utvecklat för häst, vilken enligt tillverkaren skulle kunna fungera för att analysera även fibrinogen hos nöt. Denna analysmetod är däremot inte validerad. Detta är något som bör göras om analysmetoden ska användas på nöt.

Fokus i denna studie var att följa djuret under behandling, det vill säga detektera akutfasproteiner under insatt behandling. Eftersom akutfasproteinernas stegring inte är beroende av vilken orsak inflammationen har spelar det inte någon roll att djuren hade olika diagnoser. Så länge djuren hade en konstaterad systemisk inflammation och fick korrekt behandling för sin åkomma, samt provtagningen skedde med samma tidsintervall, gick resultaten för de olika grupperna att kombinera.

Eftersom variationskoefficienterna i samtliga analysmetoder är så låga (<5 %) och det skedde upprepad provtagning på samma djur, behövde inte studiepopulationen vara så stor för att se om metoderna klarade av att identifiera en ökning av akutfasproteiner eller inte. En statistisk signifikant skillnad för minskning av SAA i samband med behandling kunde säkerställas trots få fall (n=4). Eftersom kon som var inskriven för spenamputation klassades som klinisk frisk och inte hade systemisk inflammation exkluderades den i analysen.

Stress har som tidigare nämnts visats påverka nivåer av akutfasproteiner hos både unga och vuxna djur (Alsemgeest *et al.* 1995; Lomborg *et al.* 2008). Även hematologin kan påverkas med ett så kallat stressleukogram vilket innebär neutrofili, lymfopeni, eosinopeni och monocytos (Roland *et al.* 2014). Stress var därmed något som fick tas hänsyn till vid tolkning av proverna. Huruvida SAA faktiskt påverkas av stress eller ej kan dock diskuteras. I studien av Lomborg *et al.* (2008) visades ett medel-SAA på 137 mg/L, vilket är kraftigt förhöjt. Däremot har studien av Lomborg *et al.* haft en väldigt liten studiepopulation på endast åtta djur. I studien uppges värdena på SAA vid 48 timmar, då det beräknats vara som högst, vara mellan 30 mg/L och 482 mg/L (Lomborg *et al.* 2008), men det går inte att utläsa

förändringen hos den enskilda individen. Eftersom studiepopulationen är så liten kommer ett enda djur med så kraftigt förhöjt SAA som 482 mg/L dra upp medelvärdet i populationen rejält. Även studierna av Alsemgeest *et al.* (1995) och Giannetto *et al.* (2011) är gjorda på en väldigt liten studiepopulation på endast 10 djur samt utan att redovisa individuella resultat. Hos exempelvis häst har ökningsar, men inte lika höga, setts vid stress (Casella *et al.* 2012). De publicerade sambanden mellan SAA och stress hos nöt är intressant men en studie med större population bör göras.

Nöt 1 hade vid ankomst, baserat på klinisk bild, hematologi och akutfasproteiner, en systemisk inflammation, vilken ökade efter operationen. Hematologiskt förbättrades dock inflammationen redan till dagen efter operationen, med exempelvis minskade nivåer av stavkärniga neutrofiler. Detta djur transporterades cirka 2 timmar till kliniken, vilket får tas i beaktning när man tittar på hematologin. Stress kan ha bidragit till ökning i totala antalet leukocyter och neutrofiler vid ankomst, men påverkar däremot inte att en vänsterförskjutning förelåg. Någon slutsats gällande huruvida ankomstvärdet på SAA påverkats av stress från transporten kan ej dras eftersom underlagen för att stress skulle påverka SAA som tidigare nämnts är något bristfälliga. Minskningen av neutrofiler som uppstod till dagen efter operationen berodde sannolikt alltså dels på korrekt insatt behandling, och dels att stresspåslaget från transporten minskat. Tiden för stelmande av glutavactestet sjönk dag för dag i takt med att fibrinogenet och globulinerna ökade. Sänkningen av totalprotein och albumin i samband med operationen berodde sannolikt på att djuret var dehydrerat vid ankomst, med förhöjt Hb, och behandlades med intravenös vätska i samband med operationen. Dehydrering kan ge falskt höga värden på totalprotein och fibrinogen (Wilson 2012). Den sanna sänkningen av totalprotein och sanna stegringen av fibrinogen i samband med kirurgin kan därför vara mindre respektive större än den som ses på provsvaret. Enligt Wilson (2012) kan man skilja en hyperfibrinogenemi orsakad av inflammation och av dehydrering genom att kalkylera totalprotein-/fibrinogenkvoten (Wilson 2012). Om man gör det på detta djurs 0-provsresultat hamnar kvoten under hyperfibrinogenemi orsakad av inflammation, det vill säga att fibrinogen är högt i förhållande till totalprotein (Wilson 2012). Däremot måste man ta i beaktning att analysmetoden för fibrinogen inte är validerad, och tillförlitligheten därmed är okänd. Dagen efter operationen hade totalprotein, albumin och globuliner sjunkit och Hb var inom referensintervall igen. Detta tyder på att kon blivit rehydrerad. SAA har i en studie på får visats inte påverkas av dehydrering (Ay & Ulutas 2020).

Kirurgin i sig skulle även kunna vara en bidragande faktor till sänkta värden på totalprotein, albumin och globuliner. Albumin är som tidigare nämnt ett negativt akutfasprotein och sjunker i samband med exempelvis trauma, vilket bukkirurgi kan klassas som. Eftersom både albumin och globulinerna sjönk precis efter operationen bidrog detta till sänkt totalprotein. Sänkningen av globuliner skulle,

enligt vissa studier på människa och djur, kunna förklaras med att en typ av α -globulin som kallas GC-globulin, sjunker precis i samband med kraftig muskelskada så som omfattande kirurgi. Vid cellskadan av muskelceller läcker muskelproteinet aktin ut i cirkulationen. GC-globulin uppges då ha som roll att binda aktin för att förhindra att den polymeriserade formen av aktin orsakar en disseminerad intravaskulär koagulation, även kallad DIC. DIC är ett livshotande tillstånd som kan försätta kroppen i ett tillstånd kallat MODS, eller multisystemisk organsdysfunktionssyndrom, och ge organsvikt. Eftersom en stor andel av GC-globulinerna enligt författarna förbrukas precis vid muskelskadan skulle totala antalet globuliner sjunka vid traumat (Dahl *et al.* 2001; Meier *et al.* 2006).

Denna ko visade upp ett oväntat mönster med förbättrat allmäntillstånd trots fortsatt högt SAA. Alltså finns tecken på att en systemisk inflammation fortfarande förelåg, trots förbättrat mående. Dock förbättrades hematologin något före hemgång. Djuret hade då neutrofili med lindrig vänsterförskjutning utan toxiska förändringar samt monocytos.

Sammantaget kan man konstatera att djuret fick en förväntad inflammatorisk respons på sin sjukdom och kirurgi, men hade oförväntat bra mående trots sina höga värden. Vid kontakt med djurägaren två veckor efter operationen uppges djuret vara fullt tillfrisknat. Hon var då pigg, åt bra och mjölkade.

Nöt 2 inkom med systemisk inflammation till följd av sin högersidiga löpmagsförskjutning. Tecken på detta var förhöjt fibrinogen och SAA, samt kraftig degenerativ vänsterförskjutning med kraftiga toxiska förändringar. Däremot var hon negativ på glutavactestet, trots att hon hade förhöjt fibrinogen. Hon hade dock inte förhöjda globuliner. Hennes fibrinogen steg lindrigt efter operationen och SAA sjönk gradvis ganska kraftigt. Hematologiskt förbättrades inflammationen successivt. Hennes inflammation sjönk alltså vartefter tiden gick. Trots att hennes inflammation dämpades måste hon inte bättra. Något annat än systemisk inflammation tros ha fått henne att må dåligt. Obduktionen visade som tidigare nämnt att denna ko hade ulcerativ retikulorumenit samt ett extensivt hematom i omentum. Detta har sannolikt orsakat smärta och nedsatt aptit utan att orsaka systemisk inflammation.

Nöt 3, vilken var inskriven för spenamputation, tolkades som kliniskt frisk och var inskriven på kliniken för elektiv kirurgi. Dock sågs en lindrig leukocytos med en lindrig neutrofili utan vänsterförskjutning vid inskrivning. Detta tros bero på stress från en lång transport till kliniken.

Kon hade även ett lindrigt förhöjt fibrinogen, men eftersom analysmetoden för fibrinogen ej är validerad, samt att höjningen är mycket låg, kan detta ej tolkas som en hyperfibrinogenemi. Hon var negativ på glutavactestet vid inskrivning. Efter 24 timmar var både fibrinogen och globuliner lägre än vid inskrivning, men trots detta stelnade glutavactestet snabbare. Det kan eventuellt bero på att testet var falskt positivt vid 24 timmar efter ingreppet. Eftersom testet visats ha högre tillförlitlighet

ju kraftigare inflammationen är, och detta djurs test tydde på en lindrig inflammation, styrker det misstanken om ett falskt positivt test. SAA-kurvan hos detta djur följer fullt det kliniska förloppet. Hon hade normala värden vid ankomst, en liten topp i SAA efter kirurgin, sedan en sänkning igen. Den snabba sänkningen kan relateras till att läkningen gick som förväntat utan tecken på infektion eller liknande i såret.

Nöt 4, med vänstersidig löpmagsförskjutning, hade en lindrig sänkning av totalprotein, albumin och globuliner i samband med operationen. Det kan förklaras på samma vis som för nöt 1. Fibrinogenet steg inte som förväntat efter kirurgin som hos övriga bukkirurgipatienter, vilket kan relateras till djurets allvarliga leversjukdom som diagnostiserades genom obduktion. Akutfasproteinerna produceras som tidigare nämnts primärt av hepatocyterna i levern. Ett lågt värde på akutfasproteinerna skulle alltså i teorin inte innebära låggradig eller ingen systemisk inflammation alternativt felaktighet i analysen av akutfasproteiner. Det skulle i teorin kunna bero på leverinsufficiens och minskad möjlighet till produktion av akutfasproteiner. I praktiken har man dock kunnat konstatera i studier på människa att SAA inte är lägre hos patienter med leversjukdom, utan snarare är högre (Yuan *et al.* 2019). Även studier på nöt med löpmagsförskjutning och leverlipidos har visat att SAA är förhöjt vid leverlipidos (Guzelbektes *et al.* 2010). Syntesen av fibrinogen har dock i studier på människa visats kunna minska av allvarlig leversjukdom (Shao *et al.* 2015). Detta är sannolikt orsaken till avsaknad av stegring i fibrinogen hos nöt 4. Alternativt har inte analysmetoden fungerat optimalt. Optimalt vore att undersöka leverfunktionen hos alla provtagna djur, men det gjordes inte till följd av ekonomiska skäl.

SAA hos nöt 4 var mycket lägre vid ankomst än hos övriga patienter med löpmagsförskjutning. Övriga två patienter med löpmagsförskjutning hade dock diagnosen RDA, vilket ofta är förknippat med ett mer akut och allvarligt förlopp än LDA. Enligt en studie av Maden *et al.* gjord 2012 där akutfasproteiner hos nöt med löpmagsförskjutning åt höger respektive vänster undersöktes, kom man fram till att kor med RDA generellt hade en något högre stegring av SAA än kor med LDA före operation.

Nöt 5, med bursit vid en has, var på kliniken med ett mer kroniskt förlopp. Glutavactestet stelnade mycket snabbt samt hon hade höga nivåer av fibrinogen och globuliner. Däremot visar inte hematologin på så kraftig inflammation. Inget av hennes hematologiska värden låg utanför referensintervallen. Trots detta kan man med den kliniska bilden sammantaget med blodkemin diagnosticera djuret med en systemisk inflammation. SAA följer djurets förbättring i detta fall. Vartefter behandlingen fortgår blir måendet på djuret bättre och SAA sjunker. Detsamma gäller för fibrinogenet. De mycket små skillnaderna i totalprotein, albumin och globuliner från dag till dag anses oväsentliga. Sammantaget kan man säga att både fibrinogen och SAA följer den kliniska bilden väl i detta fall.

Samtliga djur låg relativt lågt i albumin jämfört med referensintervallet från laboratoriet. Även kon som var inskriven för spenamputation och klassades som frisk hade låga nivåer. Det skulle kunna tyda på att laboratoriet kan behöva göra en ny verifiering av sina referensintervall för friska kor.

Höga globuliner tycks enligt min studie vara viktigast för utslag på glutavactestet. Om fibrinogen är högt men globuliner låga (exempelvis som hos nöt 2), tycks det i denna studie inte gett lika kraftigt utslag på glutavactestet som om globulinerna är höga och fibrinogenet lågt. Om man tittar på nöt 1 och nöt 2 är fibrinogenet är samma (16,2 g/L) vid 48 timmar, men hos nöt 1 är globulinerna 40 g/L och hos nöt 2 är de 34 g/L. Glutavactestet är positivt på 5 min hos nöt 1, men negativt hos nöt 2. Som tidigare nämnts är dock glutavactestet med sina egenskaper allra bäst på att utesluta en inflammation. Enligt litteraturen (Yuan *et al.* 2019) måste detta relateras till leverfunktion. Man måste återigen ha i åtanke att fibrinogenanalysen inte är validerad för användning på nöt, och för att dra säkra slutsatser behövs både fler fall och en validerad analysmetod.

Glutavac är som beskrivet en relativt grov metod. De tre kor med löpmagsförskjutning i denna studie hade normalt glutavactest vid ankomst, men ökat SAA och en konstaterad systemisk inflammation. SAA kan därmed antas vara lättare att monitorera en patient med, än glutavactest. SAA har som tidigare nämnts även beskrivits vara högre hos nöt med högersidig löpmagsförskjutning än hos djur med en vänstersidig löpmagsförskjutning. Trots att det i denna studie endast provtogs tre djur, sågs samma mönster.

Sammanfattningsvis kan man säga att en ko där en spene amputerats och en ko med bursit inte förväntas ha lika hög grad av systemisk inflammation som kor med högersidig löpmagsförskjutning. Korna i denna studie där en spene amputerats respektive hade bursit låg lägre i SAA än djuren med RDA. SAA-nivåerna, men inte fibrinogen, stämde därmed överens med förväntad grad av inflammation och låg signifikant lägre efter behandling. Detta överensstämmer även med resultaten Otsuka *et al.* (2021) fick i sin studie där SAA var signifikant högre hos kliniskt sjuka djur än hos friska djur.

5.1. Slutsats

Analys av serumamyloid A med LATIA är enligt denna studie en fungerande analysmetod på nöt, som gör det lättare att monitorera en patient än med exempelvis glutavactest och analys av fibrinogen. SAA-nivåerna stämde väl överens med förväntad grad av inflammation. Studien visade även att det fanns en statistisk signifikant skillnad på SAA under behandling jämfört med fibrinogen, där ingen statistisk signifikant skillnad förelåg.

Referenser

- Alsemgeest, S.P.M., van 't Klooster, G.A.E., van Miert, A.S.J.P.A.M., Hulskamp-Koch, C.K. & Gruys, E. (1996). Primary bovine hepatocytes in the study of cytokine induced acute-phase protein secretion in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 53 (1), 179–184. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(96\)05602-4](https://doi.org/10.1016/0165-2427(96)05602-4)
- Alsemgeest, S.P.M., Lambooy, I.E., Wierenga, H.K., Dieleman, S.J., Meerkerk, B., van Ederen, A.M. & Niewold, Th.A. (1995). Influence of physical stress on the plasma concentration of serum amyloid-a (SAA) and haptoglobin (HP) in calves. *Veterinary Quarterly*, 17 (1), 9–12. <https://doi.org/10.1080/01652176.1995.9694521>
- Ay, C.D. & Ulutas, B. (2020). The effects of water deprivation-induced dehydration on serum acute phase protein concentrations in sheep. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 71 (4), 2515–2524. <https://doi.org/10.12681/jhvms.25930>
- Berg, L.C., Thomsen, P.D., Andersen, P.H., Jensen, H.E. & Jacobsen, S. (2011). Serum amyloid A is expressed in histologically normal tissues from horses and cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144 (1), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.037>
- Bernarski, E.E., Silva, K.G. da, Nascimento, L.V., Weber, S.H., Sotomaior, C.S., Filho, I.R. de B., Starke, A. & Ollhoff, R.D. (2019). The glutaraldehyde test and its use in dairy cattle. *Semina: Ciências Agrárias*, 40 (5), 1891–1900. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n5p1891>
- Bertoni, G., Minuti, A., Trevisi, E., Bertoni, G., Minuti, A. & Trevisi, E. (2015). Immune system, inflammation and nutrition in dairy cattle. *Animal Production Science*, 55 (7), 943–948. <https://doi.org/10.1071/AN14863>
- Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X. & Bionaz, M. (2008). Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91 (9), 3300–3310. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-0995>
- Brink, P., Wright, J. & Schumacher, J. (2005). An Investigation of the ability of the glutaraldehyde test to distinguish between acute and chronic inflammatory disease in horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 46 (2), 69. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-46-69>
- Burmester, H.B.C., Aulton, K. & Horsfield, G.I. (1970). Evaluation of a rapid method for the determination of plasma fibrinogen. *Journal of Clinical Pathology*, 23 (1), 43–46. <https://doi.org/10.1136/jcp.23.1.43>

- Casella, S., Fazio, F., Giannetto, C., Giudice, E. & Piccione, G. (2012). Influence of transportation on serum concentrations of acute phase proteins in horse. *Research in Veterinary Science*, 93 (2), 914–917. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.01.004>
- Ceciliani, F., Ceron, J.J., Eckersall, P.D. & Sauerwein, H. (2012). Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics*, 75 (14), 4207–4231. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.004>
- Chen, K. & Cerutti, A. (2011). The function and regulation of immunoglobulin D. *Current Opinion in Immunology*, 23 (3), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.01.006>
- Christensen, M., Jacobsen, S., Ichiyanagi, T. & Kjølgaard-Hansen, M. (2012). Evaluation of an automated assay based on monoclonal anti-human serum amyloid A (SAA) antibodies for measurement of canine, feline, and equine SAA. *The Veterinary Journal*, 194 (3), 332–337. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.05.007>
- Dahl, B., Gehrchen, F.V.S., P.M. & Kiær, J.R., T. (2001). Gc-globulin is an acute phase reactant and an indicator of muscle injury after spinal surgery. *Inflammation Research*, 50 (1), 39–43. <https://doi.org/10.1007/s000110050722>
- Davalos, D. & Akassoglou, K. (2012). Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*, 34 (1), 43–62. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0290-8>
- Dilda, F., Pisani, L.F., Rahman, M.M., Modina, S., Tessaro, I., Sartorelli, P., Ceciliani, F. & Lecchi, C. (2012). Distribution of acute phase proteins in the bovine forestomachs and abomasum. *The Veterinary Journal*, 192 (1), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.05.005>
- Eckersall, P.D., Young, F.J., Nolan, A.M., Knight, C.H., McComb, C., Waterston, M.M., Hogarth, C.J., Scott, E.M. & Fitzpatrick, J.L. (2006). Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89 (5), 1488–1501. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72216-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72216-0)
- Gaur, A., Augustyn, A., Zedian, A., Batra, A., Zelazko, A., Eldridge, A., McKenna, A. & Tikkanen, A. (2019). *Globulin*. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/globulin> [2021-09-22]
- Gella, F.J., Serra, J. & Gener, J. (1991). Latex agglutination procedures in immunodiagnosis. *Pure and Applied Chemistry*, 63 (8), 1131–1134. <https://doi.org/10.1351/pac199163081131>
- Giannetto, C., Fazio, F., Casella, S., Marafioti, S., Giudice, E. & Piccione, G. (2011). Acute phase protein response during road transportation and lairage at a slaughterhouse in feedlot beef cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73 (11), 1531–1534. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0157>
- van Gool, J., van Vugt, H., Helle, M. & Aarden, L.A. (1990). The relation among stress, adrenalin, interleukin 6 and acute phase proteins in the rat. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 57 (2), 200–210. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(90\)90034-N](https://doi.org/10.1016/0090-1229(90)90034-N)

- Green, D. (2006). Coagulation cascade. *Hemodialysis International*, 10 (S2), S2–S4. <https://doi.org/10.1111/j.1542-4758.2006.00119.x>
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A. & Koopmans, S.J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6 (11), 1045–1056. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B1045>
- Guzelbektes, H., Sen, I., Ok, M., Constable, P.D., Boydak, M. & Coskun, A. (2010). Serum amyloid A and haptoglobin concentrations and liver fat percentage in lactating dairy cows with abomasal displacement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24 (1), 213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0444.x>
- Higuchi, H., Katoh, N., Miyamoto, T., Uchida, E., Yuasa, A. & Takahashi, K. (1994). Dexamethasone-induced haptoglobin release by calf liver parenchymal cells. *American Journal of Veterinary Research*, 55 (8), 1080–1085
- Hiraoka, S., Takashima, S., Inokuchi, T., Nakarai, A., Takahara, M., Harada, K., Seki, Y., Watanabe, K., Kato, J. & Okada, H. (2019). The novel latex agglutination turbidimetric immunoassay system for simultaneous measurements of calprotectin and hemoglobin in feces. *Intestinal Research*, 17 (2), 202–209. <https://doi.org/10.5217/ir.2018.00086>
- Horadagoda, N.U., Knox, K.M.G., Gibbs, H.A., Reid, S.W.J., Horadagoda, A., Edwards, S.E.R. & Eckersall, P.D. (1999). Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Veterinary Record*, 144 (16), 437–441. <https://doi.org/10.1136/vr.144.16.437>
- Jacobsen, S., Niewold, T.A., Kornalijnslijper, E., Toussaint, M.J.M. & Gruys, E. (2005). Kinetics of local and systemic isoforms of serum amyloid A in bovine mastitic milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104 (1), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.031>
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W. & Bruss, M.L. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press.
- Kawakami, T. & Galli, S.J. (2002). Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nature Reviews Immunology*, 2 (10), 773–786. <https://doi.org/10.1038/nri914>
- Kushner, I. (1982). The phenomenon of the acute phase response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 389, 39–48. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb22124.x>
- Lee Rodkey, F. (1964). Binding of bromocresol green by human serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 108 (3), 510–513. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(64\)90435-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(64)90435-7)
- Locke, M., Francis, R.J., Tsaousi, E. & Longstaff, C. (2020). Fibrinogen protects neutrophils from the cytotoxic effects of histones and delays neutrophil extracellular trap formation induced by ionomycin. *Scientific Reports*, 10 (1), 11694. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68584-0>
- Lomborg, S.R., Nielsen, L.R., Heegaard, P.M.H. & Jacobsen, S. (2008). Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Veterinary Research Communications*, 32 (7), 575–582. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9057-7>

- Luyendyk, J.P., Schoenecker, J.G. & Flick, M.J. (2019). The multifaceted role of fibrinogen in tissue injury and inflammation. *Blood*, 133 (6), 511–520. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-818211>
- Mack, D.R., McDonald, T.L., Larson, M.A., Wei, S. & Weber, A. (2003). The conserved TFLK motif of mammary-associated serum amyloid A3 is responsible for up-regulation of intestinal MUC3 mucin expression in vitro. *Pediatric Research*, 53 (1), 137–142. <https://doi.org/10.1203/00006450-200301000-00023>
- Maden, M., Ozturk, A.S., Bulbul, A., Avci, G.E. & Yazar, E. (2012). Acute-phase proteins, oxidative stress and enzyme activities of blood serum and peritoneal fluid in cattle with abomasal displacement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26 (6), 1470–1475. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.01018.x>
- McDonald, T.L., Larson, M.A., Mack, D.R. & Weber, A. (2001). Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 83 (3), 203–211. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00380-4)
- McSherry, B.J., Horney, F.D. & deGroot, J.J. (1970). Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 34 (3), 191
- Meier, U., Gressner, O., Lammert, F. & Gressner, A.M. (2006). Gc-globulin: roles in response to injury. *Clinical Chemistry*, 52 (7), 1247–1253. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.065680>
- Metzner, M., Horber, J., Rademacher, G. & Klee, W. (2007). Application of the glutaraldehyde test in cattle. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 54 (9), 449–454. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2007.00939.x>
- Murata, H., Shimada, N. & Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, 168 (1), 28–40. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00119-9](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00119-9)
- Nazifi, S., Ansari-Lari, M., Asadi-Fardaqi, J. & Rezaei, M. (2009). The use of receiver operating characteristic (ROC) analysis to assess the diagnostic value of serum amyloid A, haptoglobin and fibrinogen in traumatic reticuloperitonitis in cattle. *The Veterinary Journal*, 182 (2), 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.07.002>
- Orro, T., Jacobsen, S., LePage, J.-P., Niewold, T., Alasuutari, S. & Soveri, T. (2008). Temporal changes in serum concentrations of acute phase proteins in newborn dairy calves. *The Veterinary Journal*, 176 (2), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.02.010>
- Otsuka, M., Nishi, Y., Tsukano, K., Tsuchiya, M., Laktritz, J. & Suzuki, K. (2020). Sequential changes in hepatic mRNA abundance and serum concentration of serum amyloid A in cattle with acute inflammation caused by endotoxin. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 82 (7), 1006–1011. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0629>
- Otsuka, M., Sugiyama, M., Ito, T., Tsukano, K., Oikawa, S. & Suzuki, K. (2021). Diagnostic utility of measuring serum amyloid A with a latex agglutination turbidimetric immunoassay in bovine mastitis: Comparison with haptoglobin and alpha 1 acid glycoprotein. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83 (2), 329–332. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0550>

- Phalipon, A., Cardona, A., Kraehenbuhl, J.-P., Edelman, L., Sansonetti, P.J. & Corthésy, B. (2002). Secretory component: a new role in secretory iga-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity*, 17 (1), 107–115. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00341-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00341-2)
- Philippidis, P., Mason, J. c., Evans, B. j., Nadra, I., Taylor, K. m., Haskard, D. o. & Landis, R. c. (2004). Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis. *Circulation Research*, 94 (1), 119–126. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000109414.78907.F9>
- Punchard, N.A., Whelan, C.J. & Adcock, I. (2004). The journal of inflammation. *Journal of Inflammation (London, England)*, 1, 1. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-1-1>
- Roland, L., Drillich, M. & Iwersen, M. (2014). Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26 (5), 592–598. <https://doi.org/10.1177/1040638714546490>
- Sánchez Rojas, F. & Cano Pavón, J.M. (2005). Spectrophotometry | Biochemical Applications. I: Worsfold, P., Townshend, A., & Poole, C. (eds.) *Encyclopedia of Analytical Science*, 2. ed. Oxford: Elsevier, 366–372. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00722-6>
- Sandholm, M. (1974). A preliminary report of a rapid method for the demonstration of abnormal gammaglobulin levels in bovine whole blood. *Research in Veterinary Science*, 17 (1), 32–35. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)33703-2](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)33703-2)
- Saremi, B., Al-Dawood, A., Winand, S., Müller, U., Pappritz, J., von Soosten, D., Rehage, J., Dänicke, S., Häussler, S., Mielenz, M. & Sauerwein, H. (2012). Bovine haptoglobin as an adipokine: Serum concentrations and tissue expression in dairy cows receiving a conjugated linoleic acids supplement throughout lactation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146 (3), 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.03.011>
- Shao, Z., Zhao, Y., Feng, L., Feng, G., Zhang, J. & Zhang, J. (2015). Association between plasma fibrinogen levels and mortality in acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *Disease Markers*, 2015, 468596. <https://doi.org/10.1155/2015/468596>
- Smiley, S.T., King, J.A. & Hancock, W.W. (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *The Journal of Immunology*, 167 (5), 2887–2894. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.5.2887>
- Smith, B.P. (2014). *Large Animal Internal Medicine*. 5. ed. St Louis: Mosby Elsevier.
- Solovjov, D.A., Pluskota, E. & Plow, E.F. (2005). Distinct roles for the α and β subunits in the functions of integrin α M β 2. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (2), 1336–1345. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406968200>
- Stoneham, S.J., Palmer, L., Cash, R. & Rossdale, P.D. (2001). Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease. *Equine Veterinary Journal*, 33 (6), 599–603. <https://doi.org/10.2746/042516401776563472>
- Tall, A.R. & Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15 (2), 104–116. <https://doi.org/10.1038/nri3793>

- Tamamoto, T., Ohno, K., Ohmi, A., Goto-Koshino, Y. & Tsujimoto, H. (2008). Verification of measurement of the feline serum amyloid A (SAA) Concentration by human SAA turbidimetric immunoassay and its clinical application. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70 (11), 1247–1252. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.1247>
- Tennent, G.A., Brennan, S.O., Stangou, A.J., O’Grady, J., Hawkins, P.N. & Pepys, M.B. (2006). Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood*, 109 (5), 1971–1974. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040956>
- Thielen, M.A., Mielenz, M., Hiss, S., Zerbe, H., Petzl, W., Schuberth, H.-J., Seyfert, H.-M. & Sauerwein, H. (2007). Short Communication: Cellular localization of haptoglobin mRNA in the experimentally infected bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 90 (3), 1215–1219. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71609-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71609-0)
- Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R.W. & Campbell, T.W. (2012). Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 401–415.
- Tizard, I.R. (2009). *Veterinary Immunology: An Introduction*. 8. ed. Texas: Saunders Elsevier.
- Wang, H., Coligan, J.E. & Morse, H.C. (2016). Emerging functions of natural IgM and its Fc receptor FCMR in immune homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 7, 99. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00099>
- Weaver, D.M., Tyler, J.W., VanMetre, D.C., Hostetler, D.E. & Barrington, G.M. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14 (6), 569–577. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02278.x>
- Wells, F.E., Addison, G.M. & Postlethwaite, R.J. (1985). Albumin analysis in serum of haemodialysis patients: Discrepancies between bromocresol purple, bromocresol green and electroimmunoassay. *Annals of Clinical Biochemistry*, 22 (3), 304–309. <https://doi.org/10.1177/000456328502200314>
- Westhuyzen, D.R. van der, Cai, L., Beer, M.C. de & Beer, F.C. de (2005). Serum amyloid A promotes cholesterol efflux mediated by scavenger receptor B-I *. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (43), 35890–35895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505685200>
- Wilson, D.A. (red.) (2012). Fibrinogen. *Clinical Veterinary Advisor*. Saint Louis: W.B. Saunders, 933. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-9979-6.00394-9>
- Xu, B., Wang, J., Zhang, M., Wang, P., Wei, Z., Sun, Y., Tao, Q., Ren, L., Hu, X., Guo, Y., Fei, J., Zhang, L., Li, N. & Zhao, Y. (2012). Expressional analysis of immunoglobulin D in cattle (*Bos taurus*), a large domesticated ungulate. *PLOS ONE*, 7 (9), e44719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044719>
- Yuan, Z.-Y., Zhang, X.-X., Wu, Y.-J., Zeng, Z.-P., She, W.-M., Chen, S.-Y., Zhang, Y.-Q. & Guo, J.-S. (2019). Serum amyloid A levels in patients with liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 25 (43), 6440–6450. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i43.6440>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Inflammation är ett tillstånd i kroppen som innebär att immunförsvaret reagerat på en skada eller ett angrepp från exempelvis bakterier eller virus. Vid inflammationen samverkar celler och kemiska ämnen för att reparera skadan eller hindra angreppet. De kemiska ämnena läcker ut i kroppen och talar om för de vita blodkropparna att de ska börja försvara eller reparera. Ämnena gör även att blodkärlen vid skadan eller angreppet vidgas så att mer blod kan komma till platsen med fler vita blodkroppar. Platsen blir då varm, röd, svullen och gör ont. Om skadan eller angreppet är väldigt stort kan man få en så kallad systemisk inflammation, då hela kroppen påverkas av inflammationen.

Vid en systemisk inflammation börjar kroppen även producera något som kallas akutfasproteiner, för att ytterligare hjälpa kroppen med skadan. De här ämnena kan man mäta med blodprov för att kontrollera hur allvarlig inflammationen är. Om man sedan tar nya prover efter en tid kan man se om patienten blir bättre eller sämre.

Det finns många olika akutfasproteiner, men hos nöt har ett som heter serum-amyloid A, även kallat SAA, och ett annat som heter fibrinogen visats vara några av de bästa att analysera.

Länge har inte någon billig och snabb metod som enkelt kan användas för att analysera SAA hos nöt funnits. Nyligen var det dock en forskargrupp i Japan som utnyttjade en metod som länge använts för att analysera SAA hos exempelvis häst och katt, för att analysera SAA hos nöt. Metoden kallas LATIA, används för serum eller plasma, och är både snabb och relativt billig.

I denna studie undersöktes hur olika akutfasproteiner sjönk vid behandling av olika inflammatoriska tillstånd hos nöt. Syftet var att undersöka användbarheten hos det nya reagenset för analys av SAA hos nöt med LATIA och jämföra med några andra vanliga akutfasproteiner, exempelvis fibrinogen. Om metoden visades fungera skulle den kunna inkluderas som en del av rutindiagnostiken för nöt på Klinisk-kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset, SLU.

I studien togs upprepade blodprov på fem olika vuxna kor som var inskrivna på idisslarkliniken vid Sveriges lantbruksuniversitet. Fyra av korna skulle opereras av olika anledningar, och en av korna hade en kraftig inflammation i ett ben. Av korna som skulle opereras hade två magomvridning åt höger och en magomvridning åt vänster. Kor har ”fyra magar”, där den sista innan tarmen heter löpmagen. Den kan vridas om exempelvis efter kon har genomgått en förlossning av olika anledningar,

och kon blir då mycket sjuk. För att åtgärda detta måste kon oftast opereras och magen läggas till rätta igen. Den sista kon som skulle opereras var frisk, men skulle ta bort en extraspene som var i vägen vid mjölkningen. Kon hade alltså fem spenar istället för fyra innan operationen. Blodprov togs när korna kom till kliniken. Därefter togs prov 24 timmar, 48 timmar samt 72 timmar efter operation eller efter första provet om kon inte opererades.

Provet analyserades sedan med det nya reagenset för SAA samt några andra akutfasproteiner och blodceller. Hur djuren mårde antecknades också.

Genom att titta på resultaten av de olika analyserna kunde man konstatera att metoden med LATIA fungerar för att se en förändring av SAA hos nöt. Man kan även med denna studie konstatera att SAA-nivåerna hos djuren stämde väl överens med hur kraftig man förväntade sig att inflammationen skulle vara beroende på deras sjukdomstillstånd. Fibrinogen följde inte samma mönster.

Analys av SAA visades vara lättare att övervaka patienternas inflammation med än andra akutfasproteiner, då det stiger och sjunker snabbare vid ökning respektive minskning av inflammation än övriga undersökta akutfasproteiner.