



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Pilotstudie av en ny metod för mätning av endotoxinaktiviteten i blodet hos tikar med pyometra

Sebastian Abrahamsson

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:37*

Pilot study of a new method for measuring endotoxin activity in the blood of bitches with pyometra

Sebastian Abrahamsson

*Handledare: Ragnvi Hagman, Institutionen för kliniska vetenskaper, Avd. för hund, katt och andra smådjur
Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: endotoxin, endotoxinaktivitet, pyometra, tik, hund, EAA, Endotoxin Activity Assay

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:37*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	5
Summary	6
Inledning	7
Syfte	7
Litteraturoversikt	8
Endotoxiner	8
Hur verkar endotoxiner?	8
Prostaglandiner och endotoxiner	9
Metoder för analys av endotoxinaktiviteten i blodet	9
Sepsis och Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)	10
Patogenes vid sepsis	10
Symtom	11
Diagnostik	12
Gemensamma riktlinjer	12
Mikrobiell odling	12
Analys av endotoxinhalten i blodet	13
Behandling	13
Chock	14
Olika typer av chock	14
Vad händer i kroppen vid septisk chock?	14
Behandling	15
Pyometra	15
Patogenes av pyometra	16
Symtom	17
Diagnostik	17
Behandling	18
Kirurgisk behandling	18
Medicinsk behandling	18
Komplikationer	19
Material och metoder	20
Etisk prövning	20
Djur	20
Klinisk undersökning	20
Provtagning och analyser	20
EAA™	21
Materiel	21
Utförande	21
Hur fungerar analysen?	21
Statistiska beräkningar	22
Resultat	23
Klinisk undersökning och blodprov	23
EAA	26
Laktat	28
Bakterieodling från livmoderinnehåll	28
Diskussion	29
EAA-värden hos friska kontrollhundar	29
Möjliga felkällor	30
Behov av modifiering av metoden	31
Bakterieodling från livmoderinnehåll	31
Hematologi och klinisk kemiska parametrar	31
Leukocyter	31
Röd blodbild	32
Övriga blodparametrar	33
Konklusion	34
Referenser	35

SAMMANFATTNING

Förhöjda halter av endotoxin i blodet förekommer ofta vid sjukdomen pyometra hos tik och kan orsaka många av de allmänna symtom som ses vid sjukdomen. Endotoxin Activity Assay (EAA) är en ny, snabb metod för mätning av endotoxinaktivitet i helblod. EAA-metoden är anpassad för humanpatienter, men har testats i forskningsstudier och visats fungera även för hundar och efter viss modifiering också för hästar. Två olika apparaturer från finns att tillgå för EAA (från Spectral Diagnostics Incorporated). Den apparatur som utvärderas i den här studien har aldrig tidigare testats på djurslaget hund. Resultaten som erhållits i denna pilotstudie har dock inte varit lika positiva som förväntat. Inkonsekventa EAA-värden uppmättes hos friska tikar, vilket gör att liten tillit kan sättas till de värden som erhållits hos tikarna med pyometra. Analysen fungerar därmed i dagsläget inte tillförlitligt för djurslaget hund. Dock kan sannolikt metoden modifieras och möjligen därefter fungera även för hundar.

SUMMARY

Increased blood levels of endotoxin have previously been demonstrated in bitches with pyometra, and are believed to induce many of the systemic effects and clinical signs observed in dogs with the disease. Endotoxin Activity Assay (EAA) is a new, rapid method for measuring endotoxin activity in whole blood. Two different apparatuses are commercially available (from Spectral Diagnostics Incorporated). Despite the EAA-analysis being intended for human patients, one of the apparatuses has been proved functional also for dogs and, after certain modifications, for horses as well. The apparatus evaluated in the present study has not previously been tested in dogs. The results from this pilot study however, have not been as positive as expected. Inconsistent EAA values measured in healthy bitches lead to the conclusion that EAA results in bitches with pyometra are not to be trusted. The analysis as performed with the apparatus tested in this study does not presently function reliably in dogs. If the method is modified to be better adapted to be used in dogs and thereby might function more satisfactory, remains to be determined.

INLEDNING

Pyometra (varbildande livmoderinflammation) är en av de vanligast förekommande genitala sjukdomarna hos tik. I vissa hundraser drabbas över hälften av alla tikar av sjukdomen före 10 års ålder (Egenvall et al., 2001). Sjukdomen karakteriseras av en tillväxt av bakterier i livmodern med påföljande inflammation och varbildning (Børresen, 1975). Patogenesen är komplex och involverar både hormoner och bakterier. Den bakterieart som oftast isoleras vid pyometra är *Escherichia coli* (*E. coli*) (Hagman och Kühn, 2002). Endotoxiner är lipopolysackarider (LPS) som ingår som en komponent i alla Gram-negativa bakteriers cellväggar (Foster et al., 2004; Marshall et al., 2004). Fria endotoxiner i blodet (endotoxinemi) orsakar många av de symptom som ses vid sepsis (Foster et al., 2004). Analys av endotoxiner i blodet hos människa används för att påvisa sepsis eftersom endotoxinemi i regel föregår sepsis. Snabb diagnos av endotoxinemi och därmed också sepsis, möjliggör insättande av behandling i ett tidigt skede av sjukdomsförloppet, vilket i sin tur minskar mortaliteten. (Otto, 2007)

Frisättning av endotoxiner från bakterier förekommer vid många olika slags sjukdomar. Om endotoxinaktiviteten är förhöjd kan behandling mot endotoxinerna vara indikerat och i så fall har denna analys ett stort kliniskt värde. Att tidigt kunna identifiera de hundar som har hög risk att utveckla sepsis, skulle sannolikt öka överlevnaden.

Snabbanalysmetoden EAA™ (Endotoxin Activity Assay, Spectral Diagnostics Incorporated, Toronto, Canada) använder chemiluminescens för mätning av endotoxinaktiviteten i helblod. Analysen är utvecklad för användning inom humanmedicinen, men har även testats på hund (Kjelgaard-Hansen et al., 2008) och häst (Koenig et al., 2009) med goda resultat. Även om analysens princip är densamma, finns det två olika varianter av apparatur, Berthold Smartline TL och Berthold LB 953, tillgängliga från Spectral Diagnostics Inc., Toronto, Canada. Det som skiljer varianterna åt är, enligt tillverkaren, framförallt anskaffningskostnaden samt kapaciteten för antalet mätningar som kan utföras samtidigt. (Spectral Diagnostics Inc., 2006 [online]) I studierna utförda av Kjelgaard-Hansen et al. (2008) och Koenig et al. (2009) användes Berthold LB 953, vilket är en dyrare apparatur med högre kapacitet vad gäller antalet mätningar per gång. I den här studien används Berthold Smartline TL, vilken tidigare inte testats på djurslaget hund.

Syfte

Syftet med detta arbete är att utvärdera och bedöma det kliniska värdet av snabbanalysmetoden EAA för hund. Om metoden är applicerbar även på hund kan den komma att fungera som diagnostiskt hjälpmedel för att identifiera hundar som har höga halter av endotoxiner i blodet och som därmed löper stor risk att utveckla sepsis.

LITTERATURÖVERSIKT

Endotoxiner

Endotoxiner beskrevs först 1892 av Richard Pfeiffer, som observerade att då mikroorganismen *Vibrio cholerae* dog, frisattes ett gift som orsakade samma reaktion i kroppen som den levande bakterien. Detta gift som kom inifrån bakterierna kallades för endotoxin (Pfeiffer, 1892). Endotoxiner är lipopolysackarider (LPS) som ingår som byggstenar i Gram-negativa bakteriers cellväggar (Foster et al., 2004; Marshall et al., 2004). Lipopolysackarider består av en O-specifik polysackaridkedja, en oligosackaridkärna och en lipiddel som benämns "Lipid A". (Rietschel et al., 1994; Whitfield och Valvano, 1993). Det är framförallt lipiddelen som är toxisk och därmed orsakar det ospecifika immunsvaret hos den drabbade individen (Rietschel et al., 1994).

Hur verkar endotoxiner?

När Gram-negativa bakterier växer eller dör frigörs endotoxiner (Børresen, 1975; De Schepper et al., 1987). Fritt förekommande endotoxiner i blodbanorna (endotoxinemi) kan orsaka allvarliga systemiska effekter genom direkt påverkan på vävnad eller genom att orsaka frisättning av många inflammatoriska mediatorer (Hagman et al., 2006). Endotoxinerna orsakar därmed många av de symtom som ses vid sepsis. Endotoxinemi är oftast kopplat till infektioner med Gram-negativa bakterier (Foster et al., 2004), men det har också visats att endotoxiner som normalt finns i mag-tarmkanalen kan gå ut i blodet (Foster et al., 2004; Van Deventer et al., 1988) oberoende av vilken bakterieart som ligger bakom infektionen. Denna frisättning av endotoxiner till blodet från mag-tarmkanalen underlättas av faktorer som försämrat blodflöde till mag-tarmkanalen och ökad permeabilitet sekundärt till lokal inflammation. Endotoxiner går att uppmäta i blodet hos många patienter med bakteriell infektion, men det förekommer också att det inte går att identifiera endotoxinemi ens hos patienter med Gram-negativ bakteriemi. (Foster et al., 2004)

Mycket tyder på att endotoxiner är en utlösande faktor vid patogenesen av sepsis. Endotoxinmolekylen, bunden till serumbärarproteinet Lipopolysaccharide binding protein (LBP), binder till en specifik endotoxinreceptor, CD14, på immunvärdceller. Bindning till CD14 och aktivering av TLR4 (toll-like receptor 4) leder till aktivering av immuncellen med syntes och frisättning av en kaskad av mediatorer, som initierar de kliniska symtom som ses vid sepsis. (Foster et al., 2004)

Tikar med pyometra har visats ha signifikant högre endotoxinnivåer i blodet jämfört med friska tikar (Hagman et al., 2004; Okano et al., 1998). Tikar med pyometra som bedömts ha dålig prognos hade dessutom i en av dessa studier signifikant högre nivåer av endotoxiner än de som bedömdes ha god prognos för överlevnad (Okano et al., 1998). Analys av endotoxinnivåerna- eller aktiviteten i blodet skulle alltså kunna användas vid bedömning av prognos för patienter med pyometra (Okano et al., 1998). Även i en studie av endotoxinemi hos människa (Marshall et al., 2004) visades det att höga endotoxinnivåer var kopplat till ökad dödlighet. Kronisk exponering för låga doser av endotoxiner, som t.ex. vid långsam utveckling av pyometra eller en prostataabscess, kan orsaka skador på njurtubuli med oförmåga att koncentrera urinen som följd (Hardie och Rawlings,

1983). Eventuellt sker också påverkan på glomeruli med minskad GFR (glomerular filtration rate) till följd av cirkulerande endotoxinantigen-antikroppskomplex (Root Kustritz, 2005). Endotoxiner har också visats kunna försämra funktionen av det retikuloendoteliala systemet (Okano, 1993) och även gallflödet, vilket kan ge upphov till gulsot (Hardie och Rawlings, 1983). Endotoxinemi kan också orsaka koagulationsrubbningar med DIC (disseminerad intravaskulär koagulation) som följd (Hardie och Rawlings, 1983; Yilmaz et al., 2010). Resultaten av studier utförda av Kjelgaard-Hansen et al. (2008) samt Marshall et al. (2002) visade att endotoxinaktiviteten effektivt kunde hämmas genom tillsats av Polymyxin B, som är ett antimikrobiellt medel och som i dessa studier också fungerade som en endotoxinneutralisator. Administrering av antibiotika leder annars, beroende på typ av antibiotika, vanligen till att bakteriernas cellväggar förstörs, vilket kan öka frisättningen av endotoxin. Patientens tillstånd kan följaktligen förvärras trots lyckad antibiotikabehandling av bakterierna. (Shenep et al., 1988)

Prostaglandiner och endotoxiner

Prostaglandiner bildas från arakidonsyra och spelar en viktig roll i bl.a. uppkomsten av inflammation (Bottoms et al., 1983). Plasmakoncentrationen av prostaglandinmetaboliten 15-keto-13,14-dihydro-PGF_{2α}-metabolit (PG-metabolit) har visats vara förhöjd i blodet vid pyometra och även vara signifikant korrelerad till koncentrationen av endotoxin. Analys av PG-metabolitnivåerna i blodet kan därmed fungera som en indikator för endotoxinfrisättningen hos tikan med pyometra. (Hagman, 2004; Hagman et al., 2006)

Metoder för analys av endotoxinaktiviteten i blodet

Den mest använda metoden för mätning av endotoxin i blodet är *Limulus amoebocyte assay* (LAL), vilken baseras på koagulation av ett lysat från hästskokrabban, *Limulus polyphemus* (Marshall et al., 2002; Romaschin et al., 1998). Denna assay detekterar dock inte bara lipopolysackarider utan även svampantigener och kan dessutom störas av i blodet cirkulerande proteininhibitorer, vilket i viss mån begränsar analysens tillförlitlighet (Foster et al., 2004; Marshall et al., 2002; Romaschin et al., 1998). EAA är en relativt ny snabbtest för analys av endotoxinaktiviteten i helblod. Analysen baseras på detektion av neutrofilers ökade utsläpp av reaktiva syremolekyler till följd av primning med endotoxin-antiendotoxinantikroppskomplex (Marshall et al., 2002; Romaschin et al., 1998). Analysen detekterar endotoxiner från alla Gram-negativa organismer, både levande och döda, men korsreagerar inte med svampars eller Gram-positiva bakteriers beståndsdelar. EAA är dessutom både billigare och snabbare än LAL och därmed kliniskt mycket mer potentiellt värdefull. EAA fungerar på humansidan och används som hjälpmedel för att identifiera patienter med hög risk att utveckla sepsis (Foster et al., 2004; Marshall et al., 2002). I en studie av Romaschin et al. (1998) där blod från människa undersöktes, jämfördes analyserna EAA och LAL. Resultaten visade att EAA hade en sensitivitet på 98% och en specificitet på 100%, jämfört med LAL, vars sensitivitet och specificitet var 63% respektive 38% (Romaschin et al., 1998).

Sepsis och Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)

Sepsis kan definieras som närvaro av patogena bakterier eller deras toxiner i blod eller vävnad (Hensyl, 1995). Dock är det enligt mer moderna definitioner kroppens systemiska svar på infektion, vilket karakteriseras av inflammation, som är det avgörande (Odeh, 1996). Detta gäller framförallt när inflammationen blir generell och så pass kraftig att dess effekter blir skadliga för djuret. Termen sepsis används nuförtiden för att beskriva patienter med infektionsorsakad systemisk inflammation (Balk och Bone, 1989; Rackow, 1986; Sibbald et al., 1995). Om organdysfunktion uppkommer sekundärt till sepsis definieras tillståndet som allvarlig sepsis. Om hypotension som inte svarar på vätsketerapi utvecklas som en följd av sepsis definieras tillståndet som septisk chock. Även andra faktorer än infektioner kan orsaka generaliserad systemisk inflammation, organdysfunktion och chock. De effekter som uppstår kallas systemiskt inflammatoriskt responssyndrom, eller systemic inflammatory response syndrome (SIRS). SIRS kan uppkomma både som följd av infektiösa orsaker (som t.ex. peritonit, pyometra, prostatit, prostataabscess, pyelonefrit, pneumoni, pyothorax och endokardit) eller av icke-infektiösa orsaker som t.ex. pankreatit, vävnadstrauma, värmeslag, ischemi, brännskador eller pansystemisk neoplasi. (Barton, 2005) SIRS är dock ett relativt generellt begrepp och allvarlighetsgraden för SIRS-positiva patienters tillstånd kan variera mycket (Otto, 2007).

Patogenes vid sepsis

Infektion eller vävnadsskada leder till aktivering av immunförsvaret för att oskadliggöra eventuell patogen och läka skadan. Infektiösa komponenter som t.ex. endotoxiner, exotoxiner eller aminofosfolipider från skadade cellmembran stimulerar lokal frisättning av inflammatoriska mediatorer. Om inflammationen generaliseras blir reaktionerna mer omfattande. Systemisk inflammation utvecklas lättare då kroppen utsätts för en kraftig påfrestning i form av t.ex. en allvarlig infektion eller vid flera på varandra följande påfrestningar eller infektioner. De kliniska symtom som uppkommer beror på balansen mellan proinflammatoriska och antiinflammatoriska mediatorer. Normalt är inflammationssvaret i jämvikt men råder obalans med exempelvis överskott av antiinflammatoriska cytokiner leder detta till reell immunosuppression. Om det istället blir ett överskott av proinflammatoriska mediatorer kan resultatet av påfrestningen orsaka utvecklandet av sepsis/SIRS. (Barton, 2005)

Feber uppkommer till följd av att fagocyter, då de stöter på främmande organismer, frisätter endogena pyrogener. Pyrogenerna stimulerar produktion av enzymet cyklooxygenas (COX) 2 som i sin tur stimulerar produktion av prostaglandin E₂ (PGE₂), vilket påverkar termoregulatoriska neuron i hypothalamus att öka kroppstemperaturen. (Dalal och Zhukovsky, 2006) Om antalet fagocyter i blodet är lågt eller om hypovolemisk chock föreligger kan feber utebli vid sepsis eller SIRS (Hardie et al., 1986). De effekter som ses på kardiovaskulära systemet vid SIRS är perifer vasodilatation, vilket leder till minskat systemiskt vaskulärt motstånd, och möjlig hjärtmuskeldysfunktion (Barton, 2005). Hjärtfrekvensen är ofta förhöjd vid sepsis till följd av smärta, chock, förhöjda katekolaminnivåer eller ökat metaboliskt behov med förhöjd hjärtminutvolym (cardiac output) som följd. Dock kan exempelvis okänslighet för katekolaminer eller hjärtmuskelsvikt hindra hjärtfrekvensen att öka trots att patienten lider av sepsis. (Hardie et al., 1986) Kärlendotelskador, till följd av

neutrofilaktivering- och adhesion, resulterar oftast i ökad vaskulär permeabilitet. Koagulationskaskaden påverkas genom frisättning av stora mängder "tissue factor" (TF) till följd av endotelskada samt från cytokinstimulerade neutrofiler och makrofager samt p.g.a. konsumtion av naturligt förekommande antikoagulanter. Ökad trombinformation leder till trombbildning i mikrocirkulationen med försämrat blodflöde och hypoxi i drabbad vävnad. Detta tillstånd kan utvecklas till disseminerad intravaskulär koagulation (DIC). (Barton, 2005) Ökad andningsfrekvens vid sepsis kan uppkomma till följd av akut andningssvikt, metabolisk acidosis eller ökad konsumtion av syre i kroppen. Hund har stora lungreserver och drabbas sällan av andningssvikt, varvid ökad andningsfrekvens inte alltid kan iaktas vid sepsis. Katter däremot har lättare att drabbas för andningssvikt. Leverfunktionen påverkas vid sepsis med minskad utrensning av ämnen, gulsot till följd av kolestas, försämrad retikuloendotelial funktion, påverkan på glukoneogenes samt ökade leverenzymnivåer som följd. Hepatocellulär nekros ses ofta hos patienter som avlidit till följd av sepsis eller endotoxemi. Orsaken till leversvikt vid sepsis är ännu inte helt klarlagd, om den uppstår till följd av försämrat blodflöde och hypoxi eller om den cellulära funktionen påverkas innan blodflödet minskar. Mediatorerna som orsakar cellulär dysfunktion är ännu okända, men frisättning av substanser vid interaktion mellan makrofager och mikroorganismer kan vara involverat. (Hardie et al., 1986)

Vid sepsis ses ofta en akut minskning av antalet neutrofiler i blodet till följd av ansamling i lungor, lever och mjälte (Hinshaw et al., 1982). Därefter ökar antalet neutrofiler över referensnivåerna inom 12-24 h, men kan förbli lågt om extremt stort antal neutrofiler fortsätter att ansamlas vid infektionsstället. Lymfocytopeni kan ses vid allvarlig malnutrition som kan uppstå vid sepsis och monocytos ses oftast vid kroniska infektioner. Trombocytantalet är vanligen lågt vid sepsis, vilket kan bero på både ökad aggregation och minskad produktion. Blodglukosnivåerna vid sepsis kan variera beroende på infektionens utveckling. Vid uppkomsten av akut septisk chock ses först en kort period med hyperglykemi som därefter följs av hypoglykemi inom ca 2 h. Vid kronisk sepsis ses normala eller ökade glukoskoncentrationer, förutom i det terminala stadiet då hypoglykemi utvecklas. Hyperglykemi uppstår till följd av ökad glukoneogenes i levern, vilket underlättas av förhöjda glukagon- och katekolaminnivåer. Glukosupptaget i perifera celler ökar också och upphör att vara relaterat till blodets insulinivåer. Både ökat perifert glukosupptag och begynnande leversvikt kan orsaka hypoglykemi. Sänkta albuminnivåer i blodet vid sepsis kan bero på malnutrition, leversvikt, ökad kapillär permeabilitet och ansamling av vätska i kroppskaviteter. Tillfällig sänkning av blodets albuminnivåer kan också ses vid vätsketerapi till följd av spädningsseffekt. Förhöjda nivåer av alkaliskt fosfat ses ofta vid kolestas men kan också uppkomma till följd av förhöjda kortikosteroidnivåer. Ökade bilirubinnivåer har demonstrerats vid kronisk peritonit hos hund. Förhöjda nivåer av leverenzymmer kan också ses i sena stadier av sepsis, vilket gör att dessa enzymer lämpar sig bättre för fastställande av sjukdomens allvarlighetsgrad snarare än för tidig diagnostisering. (Hardie et al., 1986)

Symtom

De kliniska symtomen vid sepsis påverkas i hög grad av bakterieart, plats för infektionen och infektionens omfattning. Att upptäcka sepsis i tidigt skede och snabbt kunna sätta in behandling är viktigt för att öka överlevnaden. (Otto, 2007)

Symtom som ses vid SIRS är förändringar i kroppstemperatur, hjärtfrekvens, andningsfrekvens och antal vita blodkroppar. Drabbade hundar kan dessutom vara avtrubbade, ha hypotension, påverkad puls, trombocytopeni, hypoalbuminemi, hypoglykemi, påverkan på koagulationsfaktorer och förlängd koagulationstid, ökade nivåer av bilirubin, leverenzymmer och kreatinin, oliguri, mjölksyraacidosis och/eller syrebrist. Symtom kopplade till en eventuell underliggande lokal infektion kan också, men måste inte, vara närvarande. (Barton, 2005)

Diagnostik

SIRS till följd av infektion är den vanligaste dödsorsaken för intensivvårdspatienter inom humansjukvården. Då SIRS kan ha både infektiös och icke-infektiös bakgrund, kan det dock vara svårt att avgöra om infektion föreligger hos en patient eller inte. (Foster et al., 2004) Diagnostisering av sepsis försvåras dessutom av att de undersöknings- och laboratoriefynd som kan observeras hela tiden förändras med sjukdomsförloppet (Hardie et al., 1986).

Gemensamma riktlinjer

Enligt resultaten av en enkätundersökning var incidensen av sepsis i förhållande till totalantalet sjukdomsfall i USA 6-10% hos hund och 1-5% hos katt (Otto, 2007). Andelen som överlevde vid sepsis i samma studie var 25-50% för hund och 10-25% för katt. Den relativt stora spridningen i resultaten ovan tyder på att gemensamma riktlinjer för diagnostisering och behandling av sepsis i dagsläget delvis saknas inom veterinärmedicinen. På humansidan har man sammanställt flera gemensamma riktlinjer vad gäller diagnostisering och behandling av sepsis. Riktlinjerna bygger på fyra olika områden, har akronymen "PIRO" och kan liknas vid hur man inom onkologin fastställer behandlingsplaner för onkologipatienter. "P" i PIRO står för "predisponering", att vissa individer är känsligare och drabbas allvarligare än den genomsnittliga individen. Orsakerna till detta kan vara t.ex. gener, kön, ålder och hälsostatus. "I" i PIRO står för "infektion", att infektionstyp och plats för infektionen har betydelse. "R" i PIRO står för "respons", kroppens svar på sepsis. Här används ofta SIRS som kriterium varvid man tittar på framförallt hjärtfrekvens, andningsfrekvens, temperatur och antal vita blodkroppar. Bedömningen av SIRS varierar mellan olika personer vilket gör att denna parameter varken är känslig eller specifik. På humansidan är rekommendationen att två av fyra parametrar ska vara onormala för att SIRS ska föreligga. (Otto, 2007) Liknande kriterier används för att diagnostisera SIRS inom veterinärmedicinen (Hauptman et al., 1997). Rutinmässiga undersökningar och biokemiska tester leder sällan till att sepsis kan konstateras eller uteslutas, varför mer forskning behövs kring lämpliga biomarkörer som kan kopplas till sepsis. "O" i PIRO står för "organsvikt". Djur drabbas relativt lätt av organsvikt vid sepsis. Tillstånd som kan uppstå är t.ex. ARDS (acute respiratory distress syndrome) och då dessa tillstånd ofta är mycket akuta är det viktigt att kliniska tecken uppfattas i ett tidigt skede så att åtgärder som t.ex. mekanisk ventilering kan sättas in i tid. Det är fördelaktigt om gemensamma djurslagsspecifika riktlinjer för kliniska tecken och behandlingar vid misstänkt sepsis finns utarbetade. (Otto, 2007)

Mikrobiell odling

Positiv blododling (bakterieväxt) ses oftast hos patienter med kronisk sepsis, som t.ex. vid bakteriell endokardit eller diskospondylit. Orsaken till detta kan vara att

blododling sällan utförs för patienter med akut sepsis eller begynnande sepsis till följd av exempelvis kirurgi eller trauma, utan att den bakteriella infektionen i istället konstateras utifrån odling från organprov eller sår eller med hjälp av cytologi. (Hardie et al., 1986) Bakterieodlingar tar dock relativt lång tid och när svaret fås kan patientens infektionsstatus ha ändrats. Liten tillit sätts därför ofta till negativa blododlingsresultat, då risken finns att provet togs i initialt sjukdomsskede och att bakterierna därefter kan ha vuxit till. Bakteriemi är ovanligt hos intensivvårdspatienter och bakterieodling från blodet kan dessutom ge falskt negativt svar i de fall bakterietillväxten är hämmad av faktorer som t.ex. antibiotika. Man kan också få falskt positiva odlingar vid t.ex. abnorm bakterieväxt hos den normala bakteriefloran på den plats som provet togs ifrån, utan att infektion för den sakens skull behöver föreligga. (Foster et al., 2004)

Analys av endotoxinhalten i blodet

Peritonit hos hund är förknippat med en mortalitet på ca 60% (Bentley et al., 2007). För tikar med pyometra är dödligheten ca 3-4% (Egenvall et al., 2001). Trots den relativt låga mortaliteten vid pyometra uppvisade mer än hälften av hundarna i en forskningsstudie tecken på SIRS och 98% hade förhöjda plasmakoncentrationer av akutfasproteinet C-reaktivt protein (Fransson et al., 2007). Vid tillstånd med låg mortalitet kan biomarkörer istället kopplas till sjuklighet. Det är väl känt att endotoxin kan initiera sepsis. Att mäta förekomsten av endotoxiner i blodet kan därför tänkas vara en bra markör för tidig diagnostisering av sepsis hos såväl människor som hundar. En studie på människa visade att det var relativt ovanligt att erhålla mikrobiellt bevis på förekomst av infektion men att endotoxinemi påvisades hos 70% av patienterna med misstänkt infektion (Foster et al., 2004). Resultaten från samma studie visade dessutom att patienter med allvarlig sepsis hade signifikant högre endotoxinaktivitet jämfört med de patienter som inte led av sepsis, samt att patienter med hög endotoxinaktivitet löpte tre gånger så hög risk att drabbas av sepsis inom 24 h jämfört med de patienter som hade låg endotoxinaktivitet (Foster et al., 2004).

Behandling

Den kliniska manifestationen vid sepsis eller SIRS, etiologi, patogenes och därmed också optimerad behandling varierar beroende på den grundläggande orsaken. Även individuellt fysiologiskt inflammationssvar samt sjukdomens duration kan ha betydelse för vilken behandling som ska sättas in. (Otto, 2007) Behandling mot sepsis inriktar sig på tre områden: 1) Den bakomliggande infektionen måste lokaliseras och utplånas. 2) Understödjande behandling ges för att upprätthålla blodcirkulationen och minimera organskador. 3) Behandling sätts in för att åtgärda en okontrollerad inflammationskaskad. Prognosen försämras om SIRS/sepsis övergår i septisk chock och MODS (multiple organ dysfunction syndrome), varför det är viktigt att snabbt kunna identifiera dessa tillstånd och sätta in behandling. (Barton, 2005) Inom humanvården har man sett positiva resultat vid administrering av rekombinant protein C till patienter med sepsis (Bernard et al., 2001). Denna behandling är dock kostsam och hos hund ger den upphov till antigena effekter (Hopper och Bateman, 2005). Ett annat problem vid sepsis är hypotension och där kan nya behandlingsstrategier med exempelvis vasopressin bli aktuellt i framtiden (Otto, 2007).

Chock

Chock är ett komplext fysiologiskt tillstånd som uppkommer till följd av kroppens systemiska svar på en skada. Chock är också ett dynamiskt tillstånd och patientens status kan ändras under minuter, timmar eller t.o.m. dagar. Då kroppen in i det längsta försöker kompensera hjärtminutvolymen och upprätthålla blodtillförseln till vävnaderna, kan det vara svårt att identifiera tidiga stadier av chock. I chockens senare stadier kollapsar de kompensatoriska mekanismerna och den systemiska inflammationen leder till svikt i flera organsystem och slutligen död. I dessa stadier av chocken är det oftast för sent att påbörja behandling. Chock kan delas in i flera huvudkategorier beroende på vad det är för mekanism som orsakar försämrad vävnadsperfusion: t.ex. kardiogen, hypovolemisk eller distributiv chock. (Otto, 2005)

Olika typer av chock

Kardiogen chock uppkommer framförallt vid otillräckligt blodflöde till följd av obstruktion, antingen i diastoliska eller systoliska fasen. Hypovolemisk chock uppkommer till följd av otillräcklig blodvolym, vilket leder till minskad transport av syre och näring till, samt biprodukter bort från, vävnader. Orsaken kan vara akut eller kronisk vätskeförlust eller ansamling av vätska i tredje rummet. Distributiv chock uppkommer då den effektiva cirkulerande volymen är otillräcklig för nödvändig vävnadsgenomblödning. Detta sker till följd av vasodilatation, vilket ger en relativ hypovolemi. Till denna kategori räknas septisk chock, men även andra tillstånd som resulterar i vasodilatation, som t.ex. värmeslag, anafylaxi, neurogen chock och SIRS, kan ge distributiv chock. Sepsis och värmeslag kompliceras dessutom av en omfattande systemisk inflammation samt otillräckligt blodflöde och mitokondriell dysfunktion, vilket ger ytterligare försämrad syretillförsel till vävnader. De olika typerna av chock varierar vad gäller etiologi, kliniska symtom och behandling. Ofta överlappar de olika typerna varandra, som t.ex. då många djur med distributiv chock även drabbas av hypovolemi, framförallt eftersom SIRS leder till ökad vaskulär permeabilitet och vätskeförluster. Mediatorer som frisätts vid SIRS samt från ischemisk vävnad som återfår syretillförsel innehåller substanser som kan bidra till hjärtdysfunktion, varför både distributiv och hypovolemisk chock kan leda till kardiogen chock. Patienter med hjärtproblem har ofta vätskebrist, otillräcklig blodtillförsel av mag-tarmkanalen kan leda till bakteriell translokation och sepsis, osv. Många olika händelser är ihopkopplade i utvecklingen av chock. (Otto, 2005)

Vad händer i kroppen vid septisk chock?

Sepsis orsakar omfattande förändringar hos värddjuret och kan snabbt leda till chock. Septisk chock kan uppkomma till följd av infektion med Gram-positiva mikroorganismer i ytliga sår men det är vanligare till följd av Gram-negativa infektioner med exempelvis *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* eller *Pseudomonas spp.* i urogenitalia eller gastrointestinalkanalen. Gram-negativa mikroorganismer innehåller endotoxiner, vilket kan ge systemisk påverkan då dessa frisätts vid skada på bakteriernas cellväggar. Mycket kraftig aktivering av individens försvarssystem kan leda till skadliga effekter och svikt för flera organsystem. Omfattande förändringar i metabolism och blodflöde kan orsaka cellulär hypoxi och energibrist. (Hardie och Rawlings, 1983) Det normala fysiologiska svaret på dålig vävnadsgenomblödning är sympatikuspåslag, vilket

ger ökad hjärtfrekvens och andningsfrekvens samt vasokonstriktion. I chockens tidiga stadier (de kompensatoriska stadierna) kan tachykardi vara det enda symtomet. Allteftersom chocken blir värre och når de mellersta stadierna (de tidigt icke-kompensatoriska stadierna), försöker kroppen att genom kraftig vasokonstriktion, genom t.ex. frisättning av vasokonstriktorer som vasopressin, öka det venösa återflödet och tillgodose att en tillräcklig blodvolym pumpas ut från hjärtat. Även aktivering av renin-angiotensin-aldosteronsystemet (RAAS) och frisättning av antidiuretiskt hormon (ADH) kan ses, vilket ger retention av salt och vatten till blodet. Symtomen som ses i kardiogen och hypovolemisk chock, vilket är bleka till vita slemhinnor, ökad kapillär återfyllnadstid, kalla extremiteter, normal till sänkt rektaltemperatur, nedsatt medvetenhetsgrad, tachypné och hypotension. Distributiv chock uppkommer när kroppens försök att åstadkomma vasokonstriktion misslyckas. De cirkulerande mediatorer som frisätts vid t.ex. sepsis eller SIRS ger vasodilatation, vilket leder till en effektiv hypovolemi. Kliniska symtom som kan ses innefattar hyperemiska slemhinnor, snabb kapillär återfyllnadstid och normal eller ökad rektaltemperatur. Distributiv chock leder också till störningar i kroppens svar på stress och även om hyperglykemi eventuellt kan ses initialt så blir resultatet i slutänden hypoglykemi. (Otto, 2005) Obehandlad chock leder till döden (Hardie och Rawlings, 1983).

Behandling

Målet med behandling vid chock är att återställa effektiv genomblödning till vävnaden och därmed också syretillförsel. I de senare stadierna av chock räcker detta sällan för att bromsa inflammationskaskaden utan omfattande understödjande behandling krävs för upprätthållande av organfunktioner samt att förhindra ytterligare komplikationer, som t.ex. hypotension, hypoxi och infektion. Behandlingen inriktas alltid på att åtgärda grundorsaken. Syrgas ges oftast initialt oberoende av chockens karaktär, medan annan behandling som t.ex. vätsketerapi med kristalloida alternativt kolloidala lösningar och blodtransfusion ges beroende på chockens typ och patientens tillstånd. Monitorering av parametrar som hjärtfrekvens, slemhinnefärg, pulskvalitet, kapillär återfyllnadstid, andningsfrekvens, temperatur, medvetenhetsgrad, blodtryck, hematokrit, elektrolyter, blodgaser, base excess och laktat är viktigt. Även bedömning av centralt venttryck, hjärtminutvolym, syretillförsel- och borttransport samt pulmonärt kapillärkiltryck kan ge viktig information. (Otto, 2005)

Pyometra

Pyometra är en kronisk sjukdomsprocess med akut manifestation av kliniska symtom. Kliniska symtom ses oftast i östralcykelns lutealfas inom 8 veckor efter höglöpning. Pyometra uppkommer till följd av att bakterier koloniserar en progesteronpåverkad uterus som även kan ha förändringar som progressiv hormonmedierad cystisk endometriehyperplasi (CEH). Pyometra ska ej förväxlas med metrit som inträffar postpartum, trots att båda tillstånden beror på infektion i livmodern samt systemisk inflammation. (Root Kustritz, 2005) I Sverige kastreras ca 7% av alla tikar (Egenvall et al., 1999), vilket är förhållandevis få jämfört med andra länder som t.ex. USA och Australien, där kastration utförs på 85% (Manning och Rowan, 1992) respektive över 50% av alla tikar (Blackshaw och Day, 1994). Följaktligen är sjukdomar som pyometra betydligt mer förekommande i länder som Sverige, där tikar vanligtvis inte kastreras om de inte får genitala sjukdomar eller besvär. Enligt resultaten av en epidemiologisk studie

utvecklar i genomsnitt ca 23-24% av alla tikar i Sverige pyometra innan de är 10 år gamla (Egenvall et al., 2001). Förutom ålder utgör också ras och valpning faktorer som kan påverka uppkomsten av sjukdomen pyometra (Hagman et al., 2010). Raser som långhårig collie, rottweiler, cavalier king charles spaniel, golden retriever, berner sennenhund och engelsk cocker spaniel är predisponerade för att i högre grad drabbas av pyometra medan raser som drever, schäfer, dvärgtax, tax och hamiltonstövare drabbas i mindre utsträckning. (Egenvall et al., 2001) Tikar som inte haft någon valpkull löper också en något ökad risk för att drabbas (Niskanen och Thrusfield, 1998), medan skendräktighet däremot kan innebära en något minskad risk för att utveckla sjukdomen (Fidler et al., 1966).

Patogenes av pyometra

Det är en utbredd teori att utvecklingen av pyometra sker genom infektion med bakterier i en förändrad livmoder, t.ex. med cystisk endometriehyperplasi (CEH). Pyometra kan dock också förekomma utan CEH och CEH kan förekomma utan påföljande sekundärinfektion eller i samband med ansamling av steril intrauterin vätska, s.k. hydro- eller mukometra. CEH är en hormonberoende förändring som utvecklas med upprepade östralcykler hos tiken. Det histopatologiska tillståndet kan även framkallas experimentellt. Administrering av exogena hormoner som t.ex. östrogener och progestiner kan initiera uppkomsten av CEH och därmed även öka risken för pyometra hos tikar. Experimentellt kan man orsaka pyometra om östrogen administreras följt av progesteron, precis som det sker i den normala löpningssykel. Hundar som spontant utvecklar pyometra har dock inte högre koncentrationer av progesteron i blodet än friska hundar. Eventuellt kan det vara så att nedregleringen av östrogenreceptorer som normalt sker då progesteronnivåerna i blodet ökar, uteblir hos hundar som senare utvecklar CEH och pyometra. Uterus blir under progesteronpåverkan mer mottaglig för infektion. Andra hormoner som kan vara involverade i uppkomsten av pyometra är insulinlike growth factor I (IGF-I) och prostaglandiner. Vid utvecklingen av pyometra infekteras livmodern med bakterier. Vaginans normala bakterieflora letar sig in i uterus under proöstrus och östrus då cervix är öppen. I metöstrus, under lutealfasen då progesteronnivåerna i blodet är höga, slutar cervix, myometriekontraktiliteten minskar och sekretionen från livmoderns körtlar ökar. De vaginala bakterier som kommit in i uterus oskadliggörs vanligen i en frisk livmoder. Vid CEH kan bakterier gömma sig i den onormala livmoderslemhinnan och i dilaterade körtlar. När cervix väl är sluten sker en kolonisering av mikroorganismer i livmodern, vilket leder till infektion i livmodern. (Root Kustritz, 2005) Den vanligaste bakterien som isoleras vid pyometra är *Escherichia coli* (*E. coli*) (Fransson et al., 1997; Hagman och Kühn, 2002) och oftast förekommer samma bakteriestam också i djurets tarmflora. Andra bakterier som kan isoleras från livmodern vid pyometra är t.ex. *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Proteus mirabilis* och *Pseudomonas aeruginosa*. Tikar med pyometra kan utveckla lymfopeni och få försämrad lymfocytfunktion samt skador på neutrofiler med minskad fagocyteringskapacitet som följd. Allvarliga tillstånd som kan utvecklas sekundärt till pyometra är bl.a. livshotande septisk chock och njursvikt. (Root Kustritz, 2005) Även om en viss påverkan på njurarna ofta kan ses hos tikar med pyometra är det ovanligt med allvarliga njurskador. I de flesta fall då njurskador uppkommit till följd av pyometra är skadorna reversibla och vid lyckad behandling av pyometra återfår njurarna sin normala funktion. Få tikar

uppvisar dock symtom kopplade till njurskada efter kirurgisk behandling av pyometra. (Heiene et al., 2007; Root Kustritz, 2005).

Symtom

Tikar med CEH eller hydro- eller mukometra kan vara helt utan symtom på sjukdom. Kliniska symtom som ses vid pyometra varierar, bl.a. beroende på om cervix är öppen eller slutet. Hos tikar med öppen cervix ses variga flytningar från vulva medan tikar med slutet cervix saknar detta klassiska sjukdomssymtom. De vaginala flytningarna är ofta variga, trögflytande, rödbruna till gröna till färgen och illaluktande. (Root Kustritz, 2005) Buksmärta förekommer också ofta vid pyometra, antingen till följd av den inflammerade livmodern eller p.g.a. peritonit (Børresen, 1975; Root Kustritz, 2005). Systemiska effekter av sjukdomen pyometra, vilka till stor del troligen orsakas av endotoxemi, är nedsatt allmäntillstånd, sänkt aptit, kräkningar, polyuri och polydipsi (Børresen, 1975; Hardy och Osborne, 1974). Polyuri kan uppstå vid pyometra till följd av endotoxininducerad frisättning av PGE₂, som minskar njurtubulis känslighet för antidiuretiskt hormon (ADH) (Whitlock, 1992). Även dehydrering, feber eller hypotermi kan förekomma. Kliniska symtom kan komma akut eller gradvis med flera löpningcykler och generellt anser man att tikar med pyometra och slutet cervix oftast uppvisar allvarligare symtom än de som har öppen cervix. (Root Kustritz, 2005)

Diagnostik

Vid misstänkt pyometra görs i regel först en allmän klinisk undersökning, följt av en röntgen- eller ultraljudsundersökning av bukorganen. Även blod- och urinprovstagning för laboratorieanalyser och bakterieodling från livmoderinnhållet bör utföras. (Root Kustritz, 2005) Röntgenundersökning samt bukpunktat och buksköljning är användbara tekniker vid misstanke om infektion i bukhålan eller bukhinneinflammation (peritonit) (Hardie et al., 1986). En förstörd livmoder kan, men behöver inte, vara palperbar vid pyometra. Livmodern kan vara skör och tunnväggig om infektion föreligger, varför försiktighet bör iakttas vid palpation av buken samt vid eventuellt bukpunktat så att inte livmodern skadas. Är livmoderförstoringen inte palperbar kan den påvisas vid röntgen- eller ultraljudsundersökning. Före 42-45 dagar postöstrus kan det dock vara svårt att med enbart röntgenundersökning skilja en patologisk livmoderförstoring från en dräktighet. Ultraljudsundersökning är det bästa alternativet för att påvisa en förstörd, vätskefylld livmoder som vid pyometra eller mukometra. Ultraljudsundersökning ger också information om livmoderväggens utseende, om äggstockarna är normala och om CEH har utvecklats. Med ultraljud kan en patologisk livmoderförstoring skiljas från dräktighet från och med dag 24-25 efter parning. Observera att det inte med säkerhet, varken kliniskt eller med röntgen- eller ultraljudsundersökning, går att särskilja en pyometra från en hydro- eller mukometra. (Root Kustritz, 2005)

Hematologiska förändringar som ofta kan ses till följd av pyometra är leukocytos med neutrofil och regenerativ vänsterförskjutning (Børresen, 1980; Fransson et al., 1997; Hagman et al., 2006; Wheaton et al., 1989). Även anemi till följd av t.ex. kronisk inflammation samt monocytos kan ofta observeras (De Schepper et al., 1987). Ibland förekommer även lymfopeni och/eller trombocytopeni. Azotemi (till följd av dehydrering eller njursvikt), hyperproteinemi (till följd av produktion

av gammaglobuliner), förhöjda koncentrationer i blodet av alkaliskt fosfat (ALP) och alaninaminotransferas (ALAT) kan också ibland ses. Urinprovsanalyser kan påvisa proteinuri som kan orsakas av sekundära njurskador. Urindensiteten kan variera beroende på dehydreringsgrad och eventuell förekomst av polyuri. (Root Kustritz, 2005) Ibland förekommer även en subklinisk urinvägsinfektion och ofta med samma bakteriestam som i livmodern (Hagman och Kühn, 2002).

Behandling

Kirurgisk behandling

Kirurgisk ovariohysterektomi (OHE) är den säkraste och effektivaste behandlingen vid pyometra (Root Kustritz, 2005). Enligt svenska rekommendationer administreras antibiotika till kirurgiskt behandlade tikar med pyometra med antibiotika endast om deras allmäntillstånd är måttligt till kraftigt påverkat, peritonit föreligger eller om andra komplikationer uppstått (SVF/SVS, 2009).

Medicinsk behandling

Andra möjliga behandlingsmetoder kan vara insättande av intrauterina katetrar för dränering i kombination med adekvat antibiotikaterapi (Funkquist et al., 1983). Eventuella underliggande patologiska förändringar i livmodern kommer dock att finnas kvar vilket gör att tiken löper ökad risk att drabbas av pyometra efter löpning. Medicinsk behandling med preparat med livmodersammandragande effekt som ger utflöde av det variga livmoderinhållet, förutsätter att cervix är fysiologiskt öppen. Är cervix slutet ökar risken för uterusruptur, varför enbart medicinsk behandling i dessa fall inte är att rekommendera. Den bakteriella infektionen i livmodern kan vara svår att utrota helt och hållet p.g.a. formation av glykokalyxbiofilm (ett skikt av kolhydrater) som kan binda till antibiotikan och därmed också hindra den från att nå bakterierna inne i livmodern. Vid måttligt till kraftigt påverkat allmäntillstånd eller om andra sekundära lidanden som t.ex. njurskador uppkommit, är det därför nödvändigt att välja kirurgisk behandling framför medicinsk, både för prognos och med hänsyn till etiska aspekter och djurlidande. Medicinsk behandling av pyometra kan övervägas då cervix är öppen, hunden är en avelstik och ej för gammal för att få valpar samt då inga sekundära lidanden till livmoderinflammationen föreligger. Antibiotika är inte som enda behandling effektivt mot pyometra utan måste kombineras med preparat som möjliggör uttransport av den variga vätskan i livmodern. Sådana preparat är t.ex. PGF_{2α} eller aglepristone. PGF_{2α} har livmodersammandragande effekt men ger ofta biverkningar varför man strävar efter att endast ge låga doser fördelade över flera tillfällen på dygnet. Biverkningar vid behandling med PGF_{2α} är kopplade till stimulering av glatt muskulatur i kroppen och inkluderar effekter som hypersalivering, kräkningar och diarré. Aglepristone är en progesteronreceptorantagonist som blockerar progesteronreceptorerna (har högre affinitet än progesteron) och har minimala bieffekter. I Sverige väljs därför på senare år aglepristone oftare än PGF_{2α}. Oavsett preparat ska behandlingen pågå tills uterus har normal storlek och utseende, vilket fastställs genom palpation, röntgen eller ultraljud. (Root Kustritz, 2005)

Komplikationer

Tikar med pyometra tillfrisknar ej utan behandling. Efter en enbart medicinsk behandling är risken för recidiv relativt stor. (Root Kustritz, 2005) Komplikationer som rapporterats i anknytning till kirurgisk behandling av hundar med pyometra är t.ex. peritonit, cervixabscess, njurskador, anemi, sänkt aptit, kräkningar, feber och ikterus (Wheaton et al., 1989). Pyometra i kvarvarande livmodervävnad (cervix) efter OHE är sällsynt men kan uppstå till följd av kvarstående ovarievävnad eller administrering av exogent östrogen eller progesteron. En cervixabscess diagnosticeras bäst med ultraljud. Behandling innefattar kirurgisk borttagning av den infekterade vävnaden samt eventuell kvarstående ovarievävnad. (Root Kustritz, 2005)

MATERIAL OCH METODER

Etisk prövning

Innan studien påbörjades var ansökan om etiskt tillstånd godkänd av Uppsala djurförsöksetiska nämnd. Varje djurägare blev informerad om studien och gav sitt medgivande till att deras djur kunde ingå i studien.

Djur

Studien omfattade 11 tikar med pyometra samt 17 friska kontrolltikar. Inklusionskriterier för samtliga hundar var att de skulle väga över 10 kg. Tikarna i kontrollgruppen var kliniskt friska och okastrerade. Tikar med pyometra diagnostiserades med röntgen- och/eller ultraljudsundersökning och sjukdomen verifierades genom identifiering av en varfylld livmoder vid operation.

Klinisk undersökning

Alla tikar genomgick en allmän klinisk veterinärundersökning. De friska kontrolltikarna undersöktes vid ett tillfälle, i samband med provtagning. Tikarna med pyometra undersöktes vid minst två tillfällen, dels före operation och dels dagen efter operation. Fokus lades på variabler som allmäntillstånd, kroppstemperatur, hjärtfrekvens, andningsfrekvens, slemhinnefärg och kapillär återfyllnadstid, eventuell smärta vid bukpalpation, dehydreringsgrad samt förekomst av vaginal flytning och uppgifter om dessa variabler fylldes i på ett speciellt formulär.

Provtagning och analyser

I samband med den allmänna kliniska undersökningen togs blodprov från distala v. cephalica från alla hundarna. Vid varje provtagningstillfälle användes rör med EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)-antikoagulantia, heparin som antikoagulantia och rör utan tillsats (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Tyskland). De parametrar som analyserades i blodet hos alla tikar innan operation var endotoxinaktiviteten (EAA), blodbild inklusive manuell differentialräkning av leukocyter (erytrocytpartikelkoncentrationen (EPK), hemoglobinhalt (Hb), erytrocytvolymfractionen (EVF, hematokriten), mean corpuscular volume (MCV, genomsnittstorleken hos erytrocyterna), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC, medelkoncentrationen hemoglobin hos erytrocyterna), retikulocyter, leukocytpartikelkoncentrationen (LPK, totalantal leukocyter), neutrofiler stavkärniga, neutrofiler segmentkärniga, eosinofiler, basofiler, lymfocyter och monocyter), klinisk kemiska analyser för stressrespons och olika organfunktioner (kortisol, alaninaminotransferas (ALAT), alkaliskt fosfatas (ALP), albumin (ALB), urea, kreatinin, glukos och f-gallsyror (fasteprov)) samt laktat. De blodparametrar som analyserades för tikarna med pyometra dagen efter operation var endotoxinaktiviteten i blodet, hematologiparametrar inklusive manuell differentialräkning av leukocyter samt blodlaktat. Bakterieodling från livmoderinnehållet utfördes hos åtta av elva tikar med pyometra.

Endotoxinaktiviteten analyserades inom 60 minuter efter provtagning (EAA™, Spectral Diagnostics Incorporated, Toronto, Canada). Blodlaktatnivån analyserades i samband med blodprovstagningen med Lactate Pro enligt tillverkarens rekommendationer (Arkray, Kyoto, Japan). Övriga parametrar analyserades på Klinisk kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset, SLU.

EAA™

EAA-analysen är en snabbtest som mäter endotoxinaktiviteten i helblod. Resultat av analysen kan fås inom 30 minuter från provtagningstillfället. (Romaschin et al., 1998) Analysen är utvecklad för humanblod, men också studier på hund (Kjelgaard-Hansen et al., 2008) och häst (Koenig et al., 2009) har visat på lovande resultat. I den här studien används Berthold Smartline TL, vilken tidigare inte testats på djurslaget hund.

Materiel

Materiel som användes vid analysen utgjordes av en luminometer (Berthold Smartline TL), en inkubator, en vortexer, en timer, en kombipipett inställd på 10 ml, två mikropipetter inställda på 40 µL respektive 500 µL, sterila mikropipettspetsar, åtta provrör och EDTA-blodprovsvrör. De åtta provrören bestod av en dubbel uppsättning rör märkta med "Tube 1", "Tube 2" respektive "Tube 3" och dessutom två rör märkta med "LPS MAX Tube" och "Aliquot Tube". "Tube 1" innehöll stabiliserande ämnen och luminol-zymosan. "Tube 2" och "Tube 3" innehöll båda 1.0-2.0 µg av murinmonoklonala antiendotoxinantikroppar, stabiliserande ämnen och luminol-zymosan. "LPS MAX Tube" innehöll 2.3 ng endotoxin (*E. coli* 055:B5) med stabiliserande ämnen. "Aliquot Tube" var utan tillsats.

Utförande

Analysen utfördes enligt tillverkarens instruktioner enligt följande: först tillsattes 1.0 mL EAA-reagens till vardera av rören märkta "Tube 1", "Tube 2" respektive "Tube 3". Efter vortexning överfördes 0.5 mL av det helblod som skulle analyseras till vardera av rören märkta "LPS MAX tube" och "Aliquot tube". "LPS MAX tube" vortexades och detta rör samt "Aliquot tube" inkuberades därefter i 37 °C i 10 minuter. Därefter vortexades "Aliquot tube" och 40 µL blod pipetterades ner i vardera av rören märkta "Tube 1" och "Tube 2". "LPS MAX tube" vortexades och 40 µL pipetterades ner i vardera av rören märkta "Tube 3". Alla provrör märkta "Tube 1", "Tube 2" och "Tube 3" vortexades och inkuberades i 37 °C i 15 minuter inuti en rörlig inkubator som blandade runt innehållet i provrören. Därefter vortexades rören märkta "Tube 1", "Tube 2" och "Tube 3" återigen och fördes in ett och ett i luminometern för analys. Luminometern skriver sedan direkt ut resultaten på en pappersremsa. (Spectral Diagnostics Incorporated)

Hur fungerar analysen?

Endotoxinaktiviteten (endotoxin activity, EA) fås genom mätning av hur neutrofilerna i blodet reagerar på immunkomplex bestående av endotoxiner och exogena antikroppar. Hur kraftigt neutrofilerna reagerar fungerar som ett mått på endotoxinaktiviteten i patientens blod. Det som händer är att en reaktion mellan endotoxiner och specifika anti-endotoxinantikroppar leder till att endotoxin-antiendotoxinantikroppskomplex bildas. Dessa opsoniseras sedan av komplementproteiner. De opsoniserade immunkomplexen gör att neutrofiler ökar sitt utsläpp av reaktiva syremolekyler (t.ex. superoxidasradikaler eller väteperoxid) då de utsätts för enzymet zymosan. Detta utsläpp av reaktiva syremolekyler (s.k. "respiratory burst") ger oxidanter som, i reagenslösningen, reagerar med luminol och utstrålar ljus (chemiluminescens). Mängden ljus avläses i

en fotonräknande luminometer och ett värde, angett i EA units, erhålls. (Foster et al., 2004; Romaschin et al., 1998; Spectral Diagnostics Incorporated)

”Tube 1” och ”Tube 3” är kontrollrör. Basalaktiviteten i frånvaro av den specifika antiendotoxinantikroppen, alltså den ospecifika oxidativa reaktionen hos patientens neutrofiler, fås vid mätning av ”Tube 1”. Den andra kontrollmätningen, som inkluderar den specifika antiendotoxinantikroppen samt ett överskott av exogent endotoxin, fås via mätning av ”Tube 3” och visar den maximala oxidativa reaktionen hos patientens neutrofiler. Testmätningen som visar den egentliga endotoxinaktiviteten hos patienten fås via ”Tube 2”, som innehåller den specifika antiendotoxinantikroppen men inget exogent endotoxin. EAA-nivån räknas ut genom att chemiluminescensen i testmätningen (”Tube 2”) normaliseras mot den maximala chemiluminescensen (”Tube 3”) och båda mätningarna korrigeras mot basalaktiviteten chemiluminescens (”Tube 1”). (Spectral Diagnostics Incorporated)

Följande nivåer används för bedömningen av eventuell endotoxemi: 0.0-0.4 representerar en låg nivå, 0.4-0.6 representerar en medelhög nivå med risk för sepsis och > 0.6 representerar hög endotoxinaktivitetsnivå med hög risk för sepsis (Spectral Diagnostics Incorporated).

Statistiska beräkningar

Deskriptiv statistik och oparade t-tester (Student’s t-tests) utfördes med Minitab[®] for Windows version 15 (Minitab Inc., Pennsylvania, USA). I denna studie bedömdes skillnader som signifikanta för samtliga test om $p < 0,05$.

RESULTAT

Klinisk undersökning och blodprov

Tabell 1. Översikt över kliniska fynd vid undersökning av samtliga hundar i de tre grupperna: friska tikar (kontroll), tikar med pyometra före operation (pyometra pre-op) och tikar med pyometra efter operation (pyometra post-op). Resultaten i tabellen presenteras som andel hundar (%) av totala antalet undersökta hundar (n). Alla undersökta hundar hade kapillär återfyllnadstid under tre sekunder

		Kontroll (n=17)	Pyometra pre-op (n=10)	Pyometra post-op (n=10)
Allmäntillstånd	Normalt	100% (17)	40% (10)	60% (10)
	Lindrigt nedsatt	0% (17)	30% (10)	30% (10)
	Måttligt nedsatt	0% (17)	30% (10)	10% (10)
	Kraftigt nedsatt	0% (17)	0% (10)	0% (10)
Hjärtfrekvens (slag/min)	< 70	6% (17)	0% (10)	11% (9)
	70-120	71% (17)	90% (10)	89% (9)
	> 120	23% (17)	10% (10)	0% (9)
Andningsfrekvens (andetag/min)	Normal	76% (17)	33% (9)	50% (10)
	Förhöjd	24% (17)	67% (9)	50% (10)
Slemhinnefärg	Normal	100% (17)	100% (10)	67% (9)
	Hyperemisk	0% (17)	0% (10)	22% (9)
	Blek	0% (17)	0% (10)	11 (9)
Smärta vid bukpalpation		6% (17)	33% (9)	30% (10)
Dehydrerad		12% (17)	67% (9)	22% (9)
Vaginal flytning		0% (17)	80% (10)	13% (8)

Tabell 2. Översikt över ålder, kroppstemperatur samt blodprovresultat för samtliga hundar i de tre grupperna: friska tikar (kontroll), tikar med pyometra före operation (pyometra pre-op) och tikar med pyometra efter operation (pyometra post-op). Resultaten i tabellen presenteras som medelvärde \pm standardavvikelsen (Medel \pm SD) samt resultatintervallet (Min-Max) för samtliga undersökta hundar (n). P-värden har erhållits från t-tester mellan friska tikar och tikar med pyometra innan operation (P-värde ^{a)}) samt mellan tikar med pyometra innan operation och tikar med pyometra efter operation (P-värde ^{b)}). *=statistiskt signifikant skillnad mellan grupperna

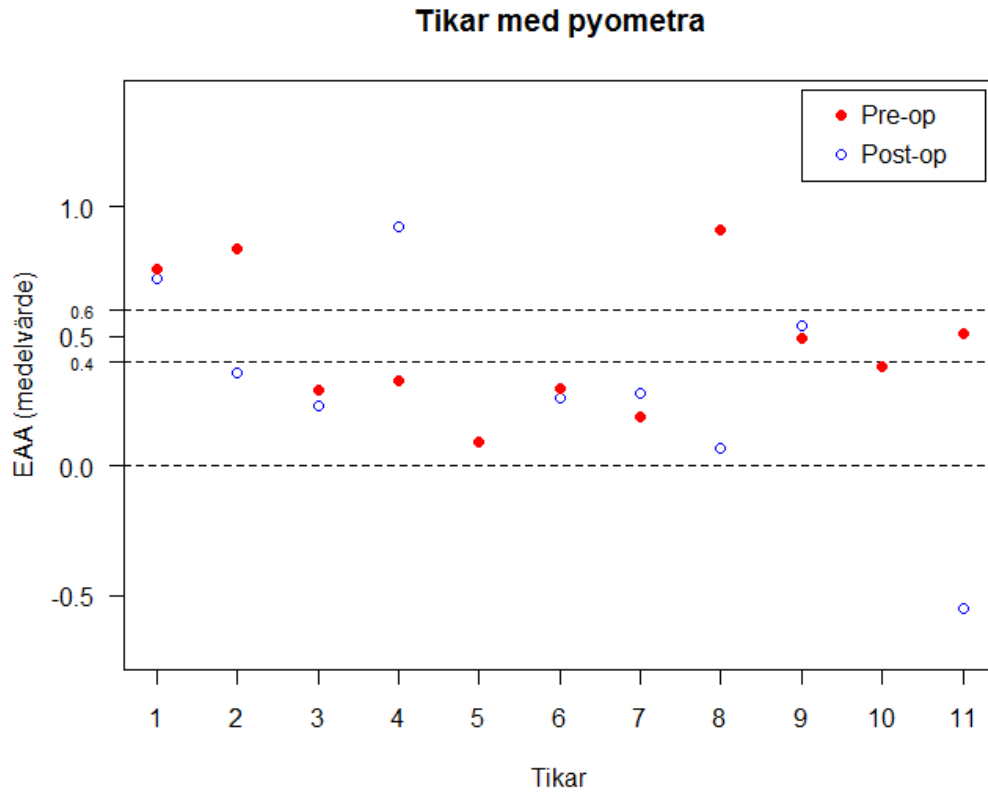
	Kontroll		Pyometra pre-op		P-värde ^{a)}	Pyometra post-op		P-värde ^{b)}
	n	Medel \pm SD (Min-Max)	n	Medel \pm SD (Min-Max)		n	Medel \pm SD (Min-Max)	
Ålder (år)	17	5.6 \pm 3.6 (1.1-16.1)	10	7.9 \pm 3.5 (1.0-13.4)	0.122			
Temperatur (°C)	17	38.1 \pm 0.5 (36.6-38.7)	10	39.1 \pm 1.1 (38.2-41.9)	0.033*	10	38.1 \pm 0.6 (36.9-39.1)	0.028*
Laktat (mmol/l)	17	1.2 \pm 0.5 (0.0-2.1)	7	1.3 \pm 0.9 (0.0-3.0)	-	9	0.9 \pm 0.7 (0.0-2.0)	-
EPK (x10 ¹² /l)	14	7.1 \pm 1.0 (5.5-8.6)	10	5.7 \pm 0.7 (4.5-6.9)	0.001*	10	5.4 \pm 0.7 (4.3-6.3)	0.271
Hb (g/l)	17	167 \pm 19 (127-199)	10	142 \pm 17 (107-166)	0.002*	10	130 \pm 17 (106-155)	0.124
EVF	17	0.46 \pm 0.05 (0.35-0.54)	10	0.39 \pm 0.05 (0.30-0.45)	0.001*	10	0.36 \pm 0.05 (0.30-0.45)	0.279
MCV (fl)	14	65 \pm 3 (59-73)	10	68 \pm 3 (65-73)	0.071	10	68 \pm 3 (65-72)	0.934
MCHC (g/l)	14	359 \pm 6 (350-371)	10	371 \pm 39 (338-478)	0.392	10	357 \pm 8 (347-372)	0.296
Retikulocyter (x10 ⁹ /l)	14	48 \pm 22 (17-91)	10	47 \pm 44 (5-131)	0.941	10	37 \pm 39 (4-115)	0.598
Retikulocyter (%)	14	0.7 \pm 0.3 (0.3-1.0)	10	0.8 \pm 0.7 (0.1-2.0)	0.557	10	0.7 \pm 0.7 (0.1-2.0)	0.716
LPK (x10 ⁹ /l)	17	9.9 \pm 2.9 (6.0-16.6)	10	23.1 \pm 16.9 (7.4-56.9)	0.037*	10	42.8 \pm 25.8 (16.6-91.3)	0.061
Neutrofiler stavkärniga (x10 ⁹ /l)	11	0.2 \pm 0.3 (0.0-0.8)	9	9.7 \pm 14.1 (0.0-41.0)	-	9	5.2 \pm 6.1 (0.0-15.7)	-
Neutrofiler segmentkärniga (x10 ⁹ /l)	17	6.2 \pm 1.7 (3.7-10.3)	10	10.4 \pm 4.7 (5.6-19.9)	0.022*	10	32.7 \pm 18.3 (14.5-71.2)	0.004*
Eosinofiler (x10 ⁹ /l)	17	0.9 \pm 0.7 (0.1-2.2)	8	0.3 \pm 0.4 (0.0-1.0)	0.008*	9	0.7 \pm 0.8 (0.0-2.6)	0.149
Basofiler (x10 ⁹ /l)	17	0.1 \pm 0.1 (0.0-0.3)	9	0.0 \pm 0.1 (0.0-0.3)	0.528	9	0.0 \pm 0.0 (0.0-0.1)	0.373
Lymfocyter (x10 ⁹ /l)	17	2.2 \pm 1.1 (0.9-5.1)	10	1.7 \pm 1.1 (0.5-3.4)	0.277	10	1.5 \pm 0.6 (0.6-2.8)	0.689
Monocyter (x10 ⁹ /l)	17	0.5 \pm 0.2 (0.2-1.0)	10	1.8 \pm 1.2 (0.4-3.7)	0.009*	10	3.3 \pm 2.8 (0.4-9.1)	0.147

Kortisol (nmol/l)	16	73 ± 37 (20-139)	10	136 ± 73 (59-279)	0.029*	-	-	-
ALAT (µkat/l)	17	0.7 ± 0.2 (0.4-1.1)	10	0.5 ± 0.1 (0.2-0.6)	0.003*	-	-	-
ALP (µkat/l)	17	2.0 ± 1.2 (1.0-5.7)	10	5.3 ± 5.0 (0.4-16.9)	0.069	-	-	-
ALB (g/l)	17	29.5 ± 2.6 (22-33)	10	25.1 ± 5.3 (18.0-35.0)	0.032*	-	-	-
Urea (mmol/l)	11	5.6 ± 1.2 (3.2-7.6)	7	4.8 ± 3.5 (2.1-12.3)	0.586	-	-	-
Kreatinin (µmol/l)	17	74 ± 18 (50-113)	9	84 ± 54 (44-197)	0.592	-	-	-
Glukos (mmol/l)	17	5.3 ± 0.6 (4.5-6.8)	8	4.8 ± 0.7 (3.7-5.9)	0.067	-	-	-
f-Gallsyror (µmol/l)	17	18 ± 20 (1-64)	9	12 ± 32 (1-97)	0.629	-	-	-

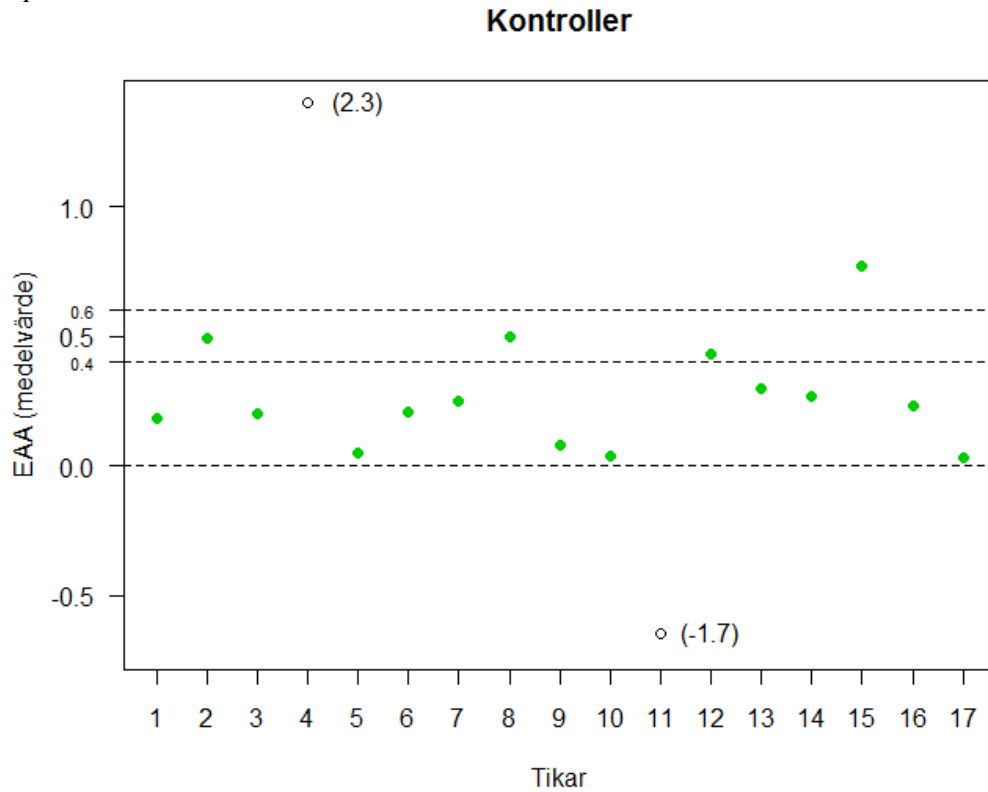
Temperatur=kroppstemperatur; EPK=erythrocytpartikelkoncentrationen; Hb=hemoglobinhalten; EVF=erythrocytvolymlfraktionen (hematokriten); MCV=mean corpuscular volume (genomsnittstorleken hos erythrocyterna); MCHC=mean corpuscular hemoglobin concentration (medelkoncentrationen hemoglobin hos erythrocyterna); LPK=leukocytpartikelkoncentrationen (totalantal leukocyter); ALAT=alaninaminotransferas; ALP=alkaliskt fosfatas; ALB=albumin; f-Gallsyror=gallsyror (fasteprov).

EAA

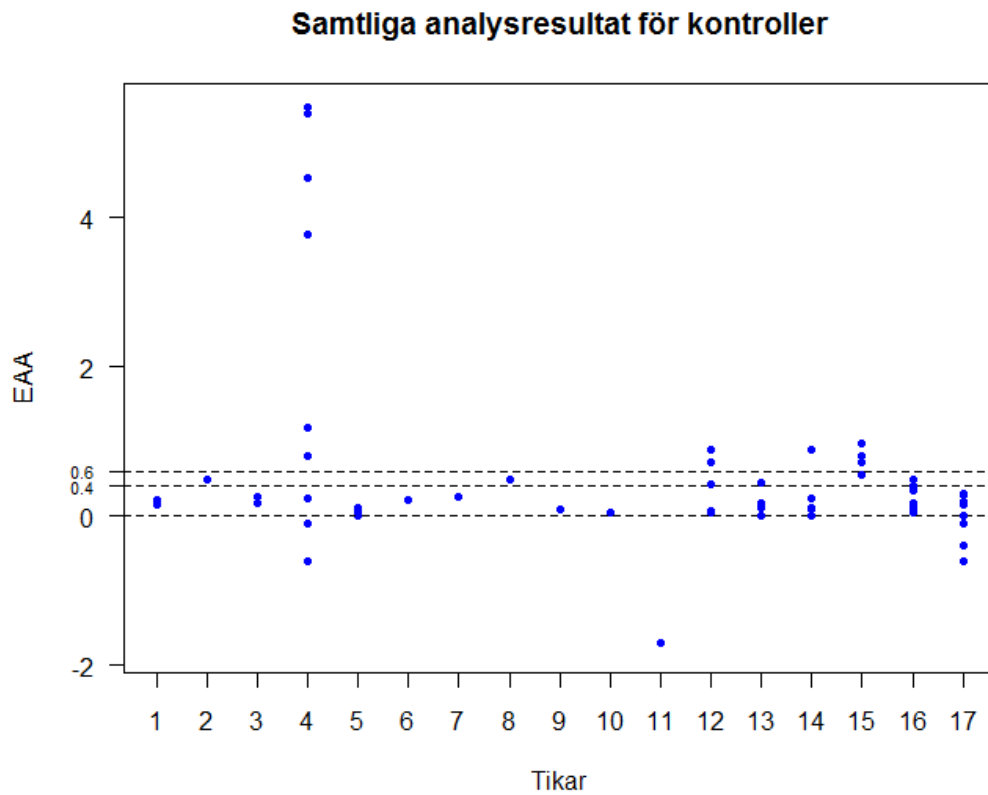
Figur 1. Medelvärden av samtliga EAA-resultat som erhöles för var och en av tikarna med pyometra (EA units). Prickar representerar prover som tagits innan operation, ringar representerar prover som tagits efter operation. De streckade linjerna vid 0.0, 0.4 respektive 0.6 på y-axeln representerar nivåerna för bedömningen av endotoxinemins allvarlighetsgrad. 0.0-0.4 representerar en låg nivå, 0.4-0.6 representerar en medelhög nivå med risk för sepsis och > 0.6 representerar hög endotoxinaktivitetsnivå med hög risk för sepsis. För tik nr. 5 erhöles endast felmeddelande vid analys av endotoxinaktiviteten efter operation. För tik nr. 10 analyserades ej endotoxinaktiviteten i blodet efter operation



Figur 2. Medelvärden av samtliga EAA-resultat som erhöles för var och en av de friska tikarna (EA units). De streckade linjerna vid 0.0, 0.4 respektive 0.6 på y-axeln representerar nivåerna för bedömningen av endotoxinemins allvarlighetsgrad. 0.0-0.4 representerar en låg nivå, 0.4-0.6 representerar en medelhög nivå med risk för sepsis och > 0.6 representerar hög endotoxinaktivitetsnivå med hög risk för sepsis



Figur 3. Samtliga EAA-värden som erhöles för var och en av de friska tikarna (EA units). De streckade linjerna vid 0.0, 0.4 respektive 0.6 på y-axeln representerar nivåerna för bedömningen av endotoxinemins allvarlighetsgrad. 0.0-0.4 representerar en låg nivå, 0.4-0.6 representerar en medelhög nivå med risk för sepsis och > 0.6 representerar hög endotoxinaktivitetsnivå med hög risk för sepsis



Laktat

Laktatnivåerna var förhöjda (> 2.2 mmol/l) hos en tik med pyometra före operation och inom normalgränserna vid samtliga övriga provtagningstillfällen av tikarna i studien.

Bakterieodling från livmoderinhåll

Sex av åtta bakterieodlingar från livmodern från tikar med pyometra visade växt av bakterier. I dessa fall påvisades måttlig (1/6) till riklig (5/6) växt av *E. coli* i renkultur (1/6), sparsam blandflora (3/6) eller måttlig blandflora (1/6). Ett av fallen visade växt av två makroskopiskt olika *E. coli*-stammar. Från två livmödrar isolerades inga bakterier.

DISKUSSION

Studien inleddes med att påbörja analyser av prover tagna från tikar med pyometra, vilket är anledningen till att antalet EAA-analyser utförda per hund är färre för dessa hundar än för kontrollerna. Resultaten från en dansk studie (Kjelgaard-Hansen et al., 2008) visade att analysen, trots att den var utvecklad för humanblod, även fungerar för hundblod. Det var först när prover från kliniskt friska kontrolltikar började analyseras som det upptäcktes att upprepade mätningar från samma prov gav varierade värden (Figur 3). Eftersom inkonsekventa värden erhöles för de friska tikarna, minskade tillförlitligheten för analysen i sig. Medelvärden för var och en av tikarna med pyometra, både före och efter operation, visar att de är spridda mellan nivåerna för låg, medelhög respektive hög endotoxinaktivitetsnivå (Figur 1). Inga välgrundade slutsatser kan därmed dras av EAA-resultaten för tikar med pyometra eftersom analysen inte fungerade tillförlitligt och metoden inte är validerad för hund. Det finns flera tänkbara orsaker till vad som kan ha orsakat de inkonsekventa EAA-värdena hos kontrolltikarna.

EAA-värden hos friska kontrollhundar

Medelvärden för friska kontrolltikar visar att resultaten är relativt samlade till nivåer under 0.4-strecket, vilket motsvarar en låg endotoxinaktivitetsnivå (Figur 2). Enligt denna illustration kan det tyckas att analysen verkar relativt säker med endast sex tikars EAA-värden antingen över eller under nivån för låg endotoxinemi. Det är dock viktigt att tänka på att de värden som redovisas i denna figur är medelvärden. Tittar man istället på de friska tikarnas individuella värden ser man att 65% (11/17) av tikarna uppvisar antingen en eller flera noteringar utanför referensnivån för låg endotoxinemi (Figur 3). De kontrolltikar vars värden ligger innanför intervallet för låg endotoxinemi är dessutom framförallt de som endast provtagits en eller ett fåtal gånger. De som provtagits flera gånger uppvisar större spridning av resultaten mellan de olika mätningarna. I en studie av EAA hos människa av Marshall et al. (2004) erhöles även där en viss andel (9.9%) otillförlitliga EAA-värden och i 7.1% av alla fall var orsaken inkonsekventa resultat. Även om det i den här studien är svårt att identifiera trovärdiga resultat, delvis på grund av avsaknad av analys svar från referensmetod, kan man se att andelen inkonsekventa resultat är betydligt högre. Då provet från kontrollhund 4 analyserades erhöles först två negativa värden, sen ett normalt värde (0.24) och därefter högre och högre svarsvärden allteftersom tiden gick (Figur 3). När provet stått 20 minuter efter sista inkubationen uppmättes värdet 5.49. En liknande kraftig ökning sågs inte för någon av de övriga kontroll- eller pyometrahundarna där analysen kördes flera gånger för varje prov. Kontamination misstänktes, men inte ens medvetna försök till kontamination av prover efter sista inkubationen, efter det att proverna först analyserats normalt, uppvisade något mönster som kunde liknas vid denna stegvisa ökning som setts. Att orsaken till de stegrande värdena kan vara kontamination som skett under något av analysens tidigare steg innan sista inkubationen, kan dock inte uteslutas. Resultaten för övriga kontrolltikar som provtagits fyra eller fler gånger, kontrolltikar 12-17, kan tyckas vara relativt samlade om man jämför med resultaten för kontrolltik 4, men fokus bör vara gränsvärdena för låg, medelhög respektive hög endotoxinaktivitetsnivå (Figur 3). Den grafiska redovisningen av de höga värden som uppmätts hos kontrolltik 4 och delvis också det låga värdet för kontrolltik 11 gör att värden för kontrolltikarna 12-17 upplevs som mer samlade än vad de egentligen är.

Kontrolltik 12 har, om än inte så extrema värden som kontrolltik 4, ändå värden som varierar från låg endotoxinnivå till hög endotoxinnivå. Kontrolltikarna 13 och 16 har värden som varierar mellan låg endotoxinnivå och medelhög endotoxinnivå. Kontrollhundarna 4, 11, 14 och 17 uppvisar ett eller flera negativa värden, vilket inte borde vara möjligt att erhålla. Hos kontrolltik 15 sågs en viss kontinuerlig ökning av EAA-värdena, dock inte alls i den storleksordning som hos kontrolltik 4. Även medelvärdet för kontrolltik 15 var högt (Figur 2), men tiken uppvisade inte några avvikande kliniska fynd då hon undersöktes och hade inga avvikande värden på övriga blodprovresultat bortsett från lindrigt förhöjda gallsyror. Kontrolltik 12 och 13 erhöll höga och låga värden i en till synes slumpmässig ordning (Figur 3). Kontrolltik 17 uppvisade också slumpmässigt mönster men värdena varierade där mellan att vara låga och negativa. Kontrolltikarna 14 och 16 erhöll först höga värden och därefter låga värden. Då det inte är särskilt troligt att endotoxinaktiviteten i blodet pendlar så pass mycket som resultaten antyder, betyder detta sannolikt att något fel inträffar i samband med apparaturens avläsningar. Kvalitetstest av luminometern gjordes dock kontinuerligt under hela den period då studien pågick och dessa kvalitetstester visade att avläsningen av proverna fungerade som den skulle. Det finns tillgång till en metod för analys av endotoxinhalten via en kinetisk turbidometrisk analys av hundserum. Om provresultaten för endotoxinaktiviteten i denna studie hade varit pålitliga hade även prover skickats till Danmark för analys av endotoxinnivåerna även med den metoden.

Möjliga felkällor

Kontamination och fel på apparaturens avläsningar har redan diskuterats som orsaker till de inkonsekventa värden, som sågs vid analys av endotoxinaktiviteten hos kontrolltikarna i studien. Andra tänkbara orsaker kan vara att gränsvärdena för de olika endotoxinnivåerna är anpassade för människa och kan tänkas vara annorlunda för hund, vilket skulle kunna vara en felkälla vid tolkning av resultaten. Dock visade Kjelgaard-Hansen et al. (2008) att nivåerna fungerade för hund då den andra EAA-apparaturen användes. Ytterligare förklaringar kan vara skillnader i blodsammansättningen hos hund jämfört med hos människa. Eventuellt kan analysens antiendotoxinantikroppar ha låg specificitet för de endotoxiner som ses vid pyometra hos hund, vilket kan leda till ofullständig bindning då endotoxin-antiendotoxinantikroppskomplexen bildas. Skillnader i blodets neutrofilkoncentration, olika utseende på endotoxinbindningsproteinet CD14 eller olika koncentrationer av endotoxiner och antikroppar, är faktorer som skulle kunna påverka interaktionen mellan endotoxin-antikroppskomplexen och hundens neutrofiler, och därmed också neutrofilernas utsläpp av reaktiva syremolekyler. Detta skulle i så fall leda till att mängden chemiluminescens inte motsvarar den mängd som skulle utstrålas under optimala förhållanden och följaktligen skulle luminometerns avläsning av endotoxinaktiviteten i blodet resultera i osanna värden. Dock är analysen densamma som den som användes av Kjelgaard-Hansen et al. (2008) och Koenig et al. (2009). Det som skiljer dessa två studier från den här är att de i de andra studierna använt sig av en annan apparatur, varför det troligtvis snarare är någonting kopplat till apparaturen som använts i denna studie som orsakat de inkonsekventa endotoxinaktivitetsresultaten. Dock verkade apparaturen som använts i denna studie fungera tillfredsställande då den användes för människa (Novelli et al., 2010).

Inkonsekventa värden mellan olika provtagningstillfällen skulle kunna förklaras med att endotoxiner försvinner från blodbanorna relativt snabbt, bl.a. via leverns retikuloendoteliala funktion, som är en central försvarsmekanism (Okano et al., 1993). Detta skulle kunna leda till varierande värden på endotoxinaktiviteten beroende på graden av utrensning respektive frisättning av endotoxiner. Vid endotoxinemi skadar endotoxinerna dock den retikuloendoteliala funktionen i tidigt skede (Okano et al., 1993) och utrensningen av endotoxiner borde då försämrats. Det är därmed troligt att det är framförallt i de tidiga stadierna av endotoxinemi, då endotoxinnivåerna fortfarande är relativt låga och den retikuloendoteliala funktionen ännu inte skadats, som utrensningen av endotoxiner är mest effektiv och varierande värden på endotoxinaktiviteten i blodet skulle kunna erhållas. I det här fallet rörde det sig ju dock inte om inkonsekventa värden mellan olika provtagningstillfällen utan istället mellan olika avläsningar av samma prov, vilket är en helt annan sak.

Behov av modifiering av metoden

Vid analys av prov från en intensivvårdspatient krävs det, om man ska kunna utgå från EAA-värdet vid utformning av åtgärdsplan, att analysresultatet är tillförlitligt. Ännu är så inte fallet för EAA-analysen med den apparatur som använts i denna studie, varför den i dagsläget inte kan rekommenderas för analys av endotoxinhalten i helblod från hund. Om analysen är känslig för kontamination är det möjligen en fördel om den utförs i laboratoriemiljö och av utbildad laboratoriepersonal, även om det enligt tillverkaren inte skall vara nödvändigt. Dess kliniska användning på djursjukhus- och kliniker kan därmed vara begränsad. Detta gäller särskilt på jourtid, vilket är den tid på dygnet då de flesta akutfall inkommer och då det inte alltid finns utbildad laboratoriepersonal närvarande. Utformning av analysmetoden gjorde att EAA fungerade för häst då Berthold LB 953 användes. De förändringar som då gjordes var att det positiva kontrollröret tillsattes endotoxin till dess LPS-koncentrationen var 9 200 pg/mL, vilket baserades på resultat från en pilotstudie gjord på friska hästar. Dessutom ökades analys tiden från 20 till 40 minuter och integraler räknades ut för den tidsperioden. (Koenig et al., 2009) På djurslaget hund sågs lovande resultat utan att modifiering av metoden var nödvändig, dock användes även då luminometern Berthold LB 953 (Kjelgaard-Hansen et al., 2008). Nästa steg i att få analysen att fungera för hund med apparaturen som användes i denna studie, kan vara att mer detaljerat felsöka analysmetoden och försöka utforma en fungerande alternativ metod för analys av endotoxinaktiviteten i hundblod. Detta rymdes dessvärre inte inom den här studiens tidsram.

Bakterieodling från livmoderinhåll

Sex av åtta bakterieodlingar från livmoderinhåll visade växt av bakterier och i samtliga fall *E. coli*. Detta stämmer väl överens med resultaten från andra studier där *E. coli* isolerats i ca 70% av alla livmödrar från tikar med pyometra (Fransson et al., 1997; Hagman och Kühn, 2002).

Hematologi och klinisk kemiska parametrar

Leukocyter

En kliniskt frisk kontrolltik uppvisade lindrigt förhöjt totalantal leukocyter, stavkärniga neutrofiler och lymfocyter (Tabell 2). Tiken var dock inte positiv för

någon SIRS-parameter, men uppvisade EAA-värden på 0.48 och 0.49, vilket motsvarar mellanhög endotoxinaktivitetsnivå. Denna tik kan ha haft någon kronisk inflammatorisk process i kroppen vid provtagningstillfället, dock ingen så pass uttalad att det uppmärksammades annat än på blodprovresultaten. Lindrigt förhöjt antal stavkärniga neutrofiler sågs även hos ytterligare två kontrolltikar, men överlag uppvisade kontrollerna inga stavkärniga neutrofiler alls. Innan operation hade 50% (5/10) av tikarna med pyometra förhöjt totalantal vita blodkroppar, 40% (4/10) hade förhöjt antal segmentkärniga neutrofiler och 78% (7/9) förhöjt antal stavkärniga neutrofiler (vänsterförskjutning). Av dessa hade en tik degenerativ vänsterförskjutning med fler stavkärniga än segmentkärniga neutrofiler. Efter operation uppvisade 100% (10/10) av pyometratikarna förhöjt totalantal vita blodkroppar, 100% (10/10) förhöjt antal segmentkärniga neutrofiler och 89% (8/9) vänsterförskjutning, dock ingen degenerativ vänsterförskjutning. Antalet leukocyter, och då framförallt antalet neutrofiler, efter operation var därmed betydligt högre än innan operation för samtliga tikar. En möjlig orsak till detta kan vara att det stora antal neutrofiler som bildats i kroppen tidigare inte stannat i så stor utsträckning i blodbanorna utan transporterats till livmodern för att bekämpa infektionen. När sedan livmodern vid operationen avlägsnats stannar neutrofilerna, som fortfarande nyproduceras för fullt, kvar i blodbanorna, vilket ger uttalad neutrofil postoperativt. Vad gäller totalantal vita blodkroppar och segmentkärniga neutrofiler sågs signifikanta skillnader mellan friska tikar och tikar med pyometra innan operation ($p < 0.037$ respektive $p < 0.022$). För totalantalet segmentkärniga neutrofiler sågs även en statistiskt signifikant skillnad mellan tikarna med pyometra innan operation jämfört med efter operation ($p < 0.004$). Förhöjt totalantal vita blodkroppar med vänsterförskjutning är återkommande fynd som observerats även i andra pyometrastudier (Børresen, 1980; Fransson et al., 1997; Hagman et al., 2006; Wheaton et al., 1989). Monocytyt observerades i denna studie hos 50% (5/10) av tikarna med pyometra innan operation och hos 70% (7/10) av samma grupp efter operation, men förekom inte hos någon av de friska tikarna. Detta överensstämmer också med resultat från andra studier av hundar med pyometra (De Schepper et al., 1987; Hagman et al., 2009). Antalet eosinofiler ($p < 0.008$) och monocyter ($p < 0.009$) skiljde sig signifikant mellan de friska tikarna och tikarna med pyometra innan operation.

Röd blodbild

Den röda blodbilden visade sänkta nivåer av EPK, Hb och EVF hos 40% (4/10), 30% (3/10) respektive 30% (3/10) av tikarna med pyometra innan operation. Efter operation var motsvarande värden 60% (6/10), 60% (6/10) respektive 70% (7/10). Alla tikarna med pyometra, utom två innan operation, hade normal volym och hemoglobinkoncentration vad gäller erytrocyterna. Även någon enstaka av de friska tikarna uppvisade lindrigt sänkta värden vad gäller antal erytrocyter, hemoglobinhalt och hematokrit, men detta kan vara kopplat till individuell variation då förändringarna endast var lindriga och hundarna inte uppvisade några symptom i övrigt. Retikulocytos sågs hos både tikarna med pyometra före operation (40%, 4/10) och efter operation (30% 3/10) samt hos de friska tikarna (50%, 7/14). Vad gäller antalet röda blodkroppar ($p < 0.001$), mängden hemoglobin ($p < 0.002$) och hematokrit ($p < 0.001$) så sågs statistiskt signifikanta skillnader mellan de friska tikarna och tikarna med pyometra innan operation, dock inte mellan tikarna med pyometra innan operation jämfört med

efter operation. En icke regenerativ normokrom, normocytär anemi ses ofta vid pyometra och anses bero på sjukdomens kroniska förlopp med minskad erythropoes till följd av toxiska effekter på benmärgen, minskad tillgång på järn (både järnkonzentrationen och total iron-binding capacity (TIBC) i blodet sjunker) samt blödningar i uterus (De Schepper et al., 1987).

Övriga blodparametrar

Hypoalbuminemi sågs hos 70% (7/10) av tikarna med pyometra innan operation och hos 12% (2/17) av de friska tikarna. Detta kan bero på att albumin är ett negativt akutfasprotein eller eventuellt till följd av proteinförlust via njurarna eller nedsatt produktion i levern. Dock kan samtidig hyperproteinemi föreligga, vilket då orsakas av ökad produktion av gammaglobuliner till följd av inflammation. (Børresen, 1980) Totala mängden protein analyserades dock inte i denna studie varför förekomst av eventuell hyperproteinemi i denna studie är okänd. Hos 53% (9/17) av de friska tikarna och 11% (1/9) av tikarna med pyometra innan operation sågs förhöjda nivåer av gallsyror. Endotoxiner kan ge upphov till försämrat gallflöde och kolestas, vilket i sin tur kan ge förhöjda gallsyrenivåer (Hardie och Rawlings, 1983). Då nivåerna var höga även hos flera av de friska tikarna (varierade mellan 1,1-6,4 gånger högre än det övre normala gränsvärdet) beror ökningen dock troligtvis på att tikarna i denna grupp nyligen ätit, vilket inte gällde tikarna med pyometra. Det är också svårt att dra några slutsatser vad gäller den tik med pyometra som uppvisade förhöjda blodnivåer av gallsyror. Vill man undersöka om leversjukdom föreligger kan en gallsyrebelastning göras, men det beror på om tiken uppvisar symptom efter eller under det att den behandlas för pyometra. ALAT låg inom referensintervallet hos samtliga tikar, vilket talar för att hepatocyterna inte är skadade. ALP var förhöjt hos 40% (4/10) av tikarna med pyometra innan operation och hos 6% (1/17) av de friska tikarna. Detta kan ses hos hundar som är utsatta för stress, antingen via miljön de befinner sig i eller p.g.a. sjukdom eller endotoxinemi. Förhöjda nivåer av kortisol, vilket fås vid olika former av stress, sågs hos 40% (4/10) av tikarna med pyometra innan operation, dock inte hos någon av de friska tikarna. Kreatinin var förhöjt hos två tikar med pyometra innan operation, vilket kan tyda på njurpåverkan hos dessa individer. För variablerna kortisol ($p < 0.029$), ALAT ($p < 0.003$) och albumin ($p < 0.032$) i blodet, sågs en signifikant skillnad mellan de friska tikarna och tikarna med pyometra innan operation. De förhöjda kortisolnivåerna hos tikarna med pyometra är sannolikt ett resultat av kroppens svar på stress till följd av sjukdomen. Produktion av kortikotropinfrisättande hormon, corticotropin-releasing hormone (CRH), i hypothalamus leder till frisättning av adrenokortikotropiskt hormon, adrenal corticotrophic hormone (ACTH), från hypofysen, vilket i sin tur stimulerar produktion av kortisol i binjurebarken. Stress i miljön, t.ex. vid veterinärundersökning och provtagning, kan också ge förhöjda kortisolnivåer. Denna orsak är dock mindre trolig då förhöjda kortisolnivåer inte sågs hos de friska tikarna som genomgick samma undersökning och provtagning som tikarna med pyometra. För övriga blodvärden sågs inga statistiskt signifikanta skillnader mellan de tre grupperna. Av samtliga undersökta tikar sågs förhöjd blodlaktatnivå endast hos en tik med pyometra innan operation och i det fallet var förhöjningen endast lindrig. Efter operation låg värdet inom referensintervallet. Liknande resultat har setts i andra studier (Hagman et al., 2009), vilket tyder på att förhöjda blodlaktatnivåer inte är ett vanligt förekommande fynd vid pyometra.

Konklusion

Fördelarna med en snabb och säker analys av endotoxinaktiviteten i blodet är att kunna identifiera begynnande sepsis och därmed också få en bättre uppfattning om patientens status och prognos. Tikar med pyometra som bedömts ha sämre prognos har tidigare visats ha signifikant högre endotoxinaktivitetsnivåer än de som bedömts ha god prognos. Detta stödjer hypotesen att endotoxinaktiviteten skulle kunna ingå som underlag vid bedömning av prognosen för patienter med pyometra, vilket poängterar värdet av en kostnadseffektiv, fungerande EAA-snabbtest för hund. EAA fungerar i dagsläget inte tillförlitligt för hund med den apparatur som användes i den här studien. Om metoden går att anpassa så att analysen fungerar även för djurslaget hund återstår att fastställa.

REFERENSER

- Balk, R.A. & Bone, R.C. (1989) The septic syndrome: definition and clinical implications. *Critical Care Clinics*, Vol. 5, pp. 1-8.
- Barton, L. (2005) Sepsis and the Systemic Inflammatory Response Syndrome. In: Ettinger, S.J. och Feldman, E.C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th edition. St. Louis, Saunders, pp. 452-454.
- Bentley, A.M., Otto, C.M. & Shofer, F.S. (2007) Comparison of dogs with septic peritonitis: 1988-1993 versus 1999-2003. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, Vol. 17, No. 4, pp. 391-398.
- Bernard, G.R., Vincent, J.-L., Laterre, P.-F., LaRosa, S.P., Dhainaut, J.-F., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J.S., Garber, G.E., Helderbrand, J.D., Ely, E.W. & Fisher Jr., C.J. (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 344, No. 10, pp. 699-709.
- Blackshaw, J.K. & Day, C. (1994) Attitudes of dog owners to neutering pets: demographic data and effects of owner attitudes. *Australian Veterinary Journal*, Vol. 71, No. 4, pp. 113-116.
- Bottoms G.D., Johnson, M.A. & Roesel, O.F. (1983) Endotoxin-induced hemodynamic changes in dogs: role of thromboxane and prostaglandin I₂. *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 44, No. 8, pp. 1497-1500.
- Børresen, B. (1975) Pyometra in the Dog - A Pathophysiological Investigation. I. The Pyometra syndrome, a review. *Nordisk veterinærmedicin*, Vol. 27, pp. 508-517.
- Børresen, B. (1980) Pyometra in the Dog - A Pathophysiological Investigation. IV. Functional derangement of extra-genital organs. *Nordisk veterinærmedicin*, Vol. 32, No. 6, pp. 255-268.
- Dalal, S. & Zhukovsky, D.S. (2006) Pathophysiology and Management of Fever (review). *The Journal of Supportive Oncology*, Vol. 4, No. 1, pp. 9-16.
- De Schepper, J., Stock, J. & Capiou, E. (1987) The characteristic pattern of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in the bitch with the cystic hyperplasia-pyometra complex: effect of medical or surgical treatment. *Veterinary research communications*, Vol. 11, No. 1, pp. 65-75.
- Egenvall, A., Hedhammar, A., Bonnett, B.N. & Olson, P. (1999) Survey of the Swedish dog population: age, gender, breed, location and enrollment in animal insurance. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vol. 40, No. 3, pp. 231-240.
- Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett, B.N., Hedhammar, A., Olson, P. & Lagerstedt, A.-S. (2001) Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol. 15, No. 6, pp. 530-538.
- Fidler, I.J., Brodey, R.S., Howson, A.E. & Cohen, D. (1966) Relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy, and pregnancy to canine pyometra. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Vol. 149, No. 8, pp. 1043-1046.
- Foster, D.M., Derzko, A. & Keffer, J.H. (2004) Can Sepsis Be Better Defined? Contribution of a Novel Assay for Endotoxin. *Clinical Microbiology Newsletter*, Vol. 26, No. 3, pp. 17-21.
- Fransson, B., Lagerstedt, A.-S., Hellmen, E. & Jonsson, P. (1997) Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine diseases. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A*, Vol. 44, No. 7, pp. 417-426.

- Fransson, B.A., Lagerstedt, A.-S., Bergstrom, A., Hagman, R., Park, J.S., Chew, B.P., Evans, M.A. & Ragle, C.A. (2007) C-reactive protein, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, Vol. 17, No. 4, pp. 373-381.
- Funkquist, B., Lagerstedt, A.-S., Linde, C. & Obel, N. (1983) Intra-uterine drainage for treatment of pyometra in the bitch. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A*, Vol. 30, No. 1, pp. 72-80.
- Hagman, R. (2004) New Aspects of Canine Pyometra: Studies on Epidemiology and Pathogenesis. Doctoral dissertation. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Veterinaria 182*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Hagman, R. & Kühn, I. (2002) Escherichia coli strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary microbiology*, Vol. 84, No. 1-2, pp. 143-153.
- Hagman, R., Kindahl, H. & Lagerstedt, A.-S. (2006) Pyometra in Bitches Induces Elevated Plasma Endotoxin and Prostaglandin F_{2α} Metabolite Levels. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vol 47, No. 1, pp. 55-68.
- Hagman, R., Reezigt, B.J., Bergstrom-Ledin, H. & Karlstam, E. (2009) Blood lactate levels in 31 female dogs with pyometra. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vol. 51, No. 2.
- Hagman, R., Lagerstedt, A.-S., Hedhammar, A. & Egenvall, A. (2010) A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra. *Theriogenology*, 2010-12-31 [Epub]. [Åtkomst 2011-01-20]
- Hardie, E.M. & Rawlings, C.A. (1983) Septic Shock, Part I. Pathophysiology. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, Vol. 5, No. 5.
- Hardie, E.M., Rawlings, C.A. & Calvert, C.A. (1986) Severe sepsis in Selected Small Animal Surgery Patients. *Journal of the American Animal Hospital Association*, Vol. 22, pp. 33-41.
- Hardy, R.M. & Osborne, C.A. (1974) Canine Pyometra: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment of Uterine and Extra-Uterine Lesions. *Journal of the American Animal Hospital Association*, Vol. 10, pp. 245-268.
- Hauptman, J.G., Walshaw, R. & Olivier, N.B. (1997) Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Veterinary Surgery*, Vol. 26, No. 5, pp. 393-397.
- Heiene, R., Kristiansen, V., Teige, J. & Jansen, J.H. (2007) Renal histomorphology in dogs with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of kidney disease. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vol. 49, No. 13.
- Hensyl, W.R. (1995) Sepsis. *Stedman's Medical Dictionary*. 26th edition. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 1598.
- Hinshaw, L.B., Archer, L.T. & Beller-Todd, B.K. (1982) Hematologic disturbances during sepsis: Platelets and leukocytes. *Advances in Shock Research*, Vol. 7, pp. 1-6.
- Hopper, K. & Bateman, S. (2005) An updated view of hemostasis: mechanisms of hemostatic dysfunction associated with sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, Vol. 15, No. 2, pp. 83-91.
- Kjelgaard-Hansen, M., Wiinberg, B., Aalbaek, B., Olsen, L., Harris, D., Romaschin, A., Kristensen, A.T. & Jensen, A.L. (2008) Endotoxin activity in whole blood measured by neutrophil chemiluminescence is applicable to canine whole blood. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*, Vol. 31, No. 6, pp. 477-485.

- Koenig J.B., Hart, J., Harris, D.M., Cruz, A.M. & Bienzle, D. (2009) Evaluation of endotoxin activity in blood measured via neutrophil chemiluminescence in healthy horses and horses with colic. *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 70, No. 10, pp. 1183-1186.
- Manning, A.M. & Rowan, A.N. (1992) Companion Animal Demographics and Sterilization Status: Results from a Survey in Four Massachusetts Towns. *Anthrozoos*, Vol. 5, No. 3, pp. 192-201.
- Marshall, J.C., Walker, P.M., Foster, D.M., Harris, D., Ribeiro, M., Paice, J., Romaschin, A.D. & Derzko, A.N. (2002) Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Critical Care*, Vol. 6, No. 4, pp. 342-348.
- Marshall, J.C., Foster, D., Vincent, J.L., Cook, D.J., Cohen, J., Dellinger, R.P., Opal, S., Abraham, E., Brett, S.J., Smith, T., Mehta, S., Derzko, A. & Romaschin, A. (2004) Diagnostic and Prognostic Implications of Endotoxemia in Critical Illness: Results of the MEDIC Study. *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 190, No. 3, pp. 527-534.
- Niskanen, M. & Thrusfield, M.V. (1998) Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. *The Veterinary record*, Vol. 143, No. 18, pp. 493-498.
- Novelli, G., Ferretti, G., Poli, L., Pretagostini, R., Ruberto, F., Perrella, S.M., Levi, S., Morabito, V. & Berloco, P.B. (2010) Clinical results of treatment of postsurgical endotoxin-mediated sepsis with polymyxin-B direct hemoperfusion. *Transplantation proceedings*, Vol. 42, No. 4, pp. 1021-1024.
- Odeh, M. (1996) Sepsis, septicaemia, sepsis syndrome, and septic shock: the correct definition and use. *Postgraduate Medical Journal*, Vol. 72, No. 844, p. 66.
- Okano, S., Tagawa, M., Hara, Y., Ejima, H., Motoyoshi, S., Urakawa, N., Furukawa, K., Onda, M. & Ogawa, R. (1993) Changes in Reticuloendothelial Function in Dogs with Endotoxin-Induced Shock. *The Journal of Veterinary Medical Science*, Vol. 55, No. 4, pp. 607-611.
- Okano, S., Tagawa, M. & Takase, K. (1998) Relationship of the Blood Endotoxin Concentration and Prognosis in Dogs with Pyometra. *The Journal of Veterinary Medical Science*, Vol. 60, No. 11, pp. 1265-1267.
- Otto, C.M. (2005) Shock. In: Ettinger, Stephen J. och Feldman, Edward C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th edition. St. Louis, Saunders. pp. 455-457.
- Otto, C.M. (2007) Sepsis in veterinary patients: what do we know and where can we go? *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 17(4), pp. 329-332.
- Pfeiffer, R. (1892) Untersuchungen über das Cholera Gift. *Z Hyg*, Vol 11, pp. 393-411.
- Rackow, E.C. (1986) Clinical definition of sepsis and septic shock. In: Sibbald, W.J. & Sprung, C.L. (eds) *New horizons: perspectives of sepsis and septic shock*. Society of Critical Care Medicine, Fullerton, pp. 1-9.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zahringer, U., Seydel, U. & Di Padova, F. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *The FASEB Journal*, Vol. 8, pp. 217-225.
- Romaschin, A.D., Harris, D.M., Ribeiro, M.B., Paice, J., Foster, D.M., Walker, P.M. & Marshall, J.C. (1998) A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 212, Issue 2, pp. 169-185.

- Root Kustritz, M.V. (2005) Cystic Endometrial Hyperplasia and Pyometra. *In: Ettinger, S.J. och Feldman, E.C. Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th edition. St. Louis, Saunders, pp. 1676-1680.
- Shenep, J.L., Flynn, P.M., Barrett, F.F., Stidham, D.L. & Westenkirchner, D.F. (1988) Serial Quantitation of Endotoxemia and Bacteremia during Therapy for Gram-Negative Bacterial Sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 157, No. 3, pp. 565-568.
- Sibbald, W.J., Doig, G. & Inman, K.J. (1995) Sepsis, SIRS and infection. *Intensive Care Medicine*, Vol. 21, No. 4, pp. 299-301.
- Spectral Diagnostics Incorporated, Endotoxin Activity Assay (EAA™), EAA20-1, EAQC-5, EPIBv2-05.
- Spectral Diagnostics Inc. (2006) *EAA™ Endotoxin Activity Assay: Spectral Diagnostics Inc. hemsida* [online]. Tillgänglig från: <http://www.spectraldx.com/endotoxinmarker.htm> [Åtkomst 2010-10-27].
- SVF/SVS (2009) Sveriges Veterinärförbunds antibiotikapolicy för hund- och kattsjukvård, originalversion 2002, reviderad november 2009 [online]. Tillgänglig från: http://www.svf.se/Documents/S%C3%A4llskapet/Initiativ%C3%A4renden/antibiotikapolicy_2009.pdf [Åtkomst 2011-02-13].
- Van Deventer, S.J., Ten Cate, J.W. & Tytgat, G.N. (1988) Intestinal endotoxemia: clinical significance. *Gastroenterology*, Vol. 94, No. 3, pp. 825-831.
- Wheaton, L.G., Johnson, A.L., Parker, A.J. & Kneller, S.K. (1989) Results and Complications of Surgical Treatment of Pyometra: A Review of 80 Cases. *The Journal of the American Animal Hospital Association*, Vol. 25, No. 5, pp. 563-568.
- Whitfield, C. & Valvano, M.A. (1993) Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 35, pp. 135-246.
- Whitlock, R.H. (1992) Polyuri. *In: Robinson, N.E. (ed) Current Therapy in Equine Medicine*. 3rd edition. Philadelphia, W.B. Saunders Co., pp. 620-622.
- Yilmaz, Z., Ozarda, Y., Cansev, M., Eralp, O., Kocaturk, M. & Ulus, I.H. (2010) Choline or CDP-choline attenuates coagulation abnormalities and prevents the development of acute disseminated intravascular coagulation in dogs during endotoxemia. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, Vol. 21, No. 4, pp. 339-348.