



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Haptoglobin som biomarkör för inflammatoriska luftvägstillstånd hos häst

Mikaela Mårtensson



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014:44

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2014



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Haptoglobin som biomarkör för inflammatoriska luftvägstillstånd hos häst

Haptoglobin as a biomarker for inflammatory respiratory condition in horses

Mikaela Mårtensson

Handledare:

Clarence Kwart, SLU, Institutionen för Anatomi, Fysiologi och Biokemi

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2014

Omslagsbild: Paul Robertsson

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 44
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Häst, Haptoglobin, Biomarkör, Diagnostik, Inflammatoriska luftvägstillstånd, RAO, IAD

Key words: Horse, Haptoglobin, Biomarker, Diagnostic, Inflammatory respiratory condition, RAO, IAD

Innehåll

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	4
Litteraturoversikt.....	5
Akutfas reaktion och Akutfasprotein	5
Haptoglobin.....	5
Diagnostik av luftvägssjukdomar.....	5
Endoskopi.....	5
Bronchoalveolar Lavage	6
Luftvägssjukdomar hos häst.....	6
Inflammatory Airway Disease	6
Recurrent Airway Obstruction	6
Haptoglobin vid patologiska tillstånd	7
Luftvägssjukdomar.....	7
Kolik.....	7
Gräsbetessjuka.....	7
Fång.....	8
Icke-infektiös artrit.....	8
Inducerad inflammation	8
Kirurgi	8
Olika sjukdomstillstånd.....	8
Haptoglobin vid icke-patologiska tillstånd	9
Kliniskt friska hästar	9
Dräktighet.....	9
Träning	9
Transport	10
Haptoglobin hos andra djurslag.....	10
Idisslare	10
Gris	10
Hund.....	10
Haptoglobin hos människa	11
Diskussion	12
Konklusion	14
Litteraturförteckning	15

SAMMANFATTNING

Luftvägsproblem är vanligt hos häst. Enklare diagnostik för att diagnosticera subkliniska sjukdomar hos högpriesterande hästar är eftertraktat. Att använda sig av biomarkörer inom veterinärmedicin är ett effektivt sätt för att få underlag för att ställa diagnos, ge prognos samt att följa olika sjukdomars utveckling. På marknaden finns idag ett instrument för att mäta Haptoglobinvärdet i blodet hos häst. Denna litteraturstudie uppmärksammar vilken information som finns angående Haptoglobin (Hp) idag samt möjligheten att använda denna som biomarkör för lunglidande hos häst.

Haptoglobin är ett positivt akutfasprotein. Det finns alltid en liten mängd i hästens blod. Vid inflammation, infektion och trauma fås cytokinbildning, vilket stimulerar hepatocyterna i levern att börja producera akutfasprotein. Hp värdet i blodet kommer då att stegras, relativt till den grad av sjukdom hästen åsamkats. Denna ökning kommer att hålla i sig under tiden för inflammationen och når sin maxkoncentration några dagar senare, för att sedan återgå till normalnivå. Funktionen av Hp är att skydda mot reaktiva syreföreningar, stimulera angiogenesen vid sårsläkning samt förhindra järnförlust. Förhindrandet av järnförlust sker genom att Hp bildar komplex med fritt Hemoglobin som frisätts i samband med att erythrocyter bryts ned. Komplexet förs till levern där det bryts ner, och kroppen kan då återanvända järnet samt aminosyror.

Idag diagnosticeras luftvägsproblem hos häst framförallt med hjälp av endoskopi och lungsköljprov (BAL). Dessa metoder kräver specifik utrustning och för att med säkerhet ställa diagnos av perifera lungproblem även cytologisvar från ett labb. Hästar som vistas i en dammig miljö får en negativ påverkan avseende sina luftvägar. De får en systemisk reaktion, vilket har visats ge förhöjda Hp värden. Hästar som tidigare haft luftvägsproblem får högre nivåer av Hp och mer kliniska symtom än hästar utan tidigare problem. De förhöjda värdena ses även då sjukdomens symtom avtar.

Olika naturligt uppkomna sjukdomstillstånd samt av människan inducerade tillstånd, vilka gav upphov till inflammation ledde till höga koncentrationer av Hp. Exempel på dessa var icke-infektiös artrit, olika former av kirurgi, samt intramuskulära injektioner. Pneumoni, muskeltrauman, transportsjuka, cellulit samt gräsbetessjuka med flera. Olika studier på hästar med kolik har gjorts med varierande resultat där koncentrationerna av Hp både har sjunkit, stigit samt varit oförändrade. Däremot finns indikationer på att Hp-nivåer i bukvätska skulle kunna vara användbart att analysera i samband med kolik. Omständigheter som dräktighet, träning och transport har även de visats påverka Hp värdet i blodet, vilka kan ge nivåer vilka motsvarar värdena som ses vid inflammatoriska tillstånd. Variationer i koncentrationen av Hp kan ses vid olika årstider samt variera med hästens vikt. Vid analys ska hänsyn tas till hästens ålder då yngre individer har ett högre värde.

Flertalet studier har visat att koncentrationen av Hp stiger vid olika sorters sjukdomar och fysiologiska tillstånd. Ytterligare studier behöver göras för att fastställa säkra referensintervall till det instrument som ska kunna användas kliniskt. För hästar med lungproblem vore studier på individer som innehar subkliniska sjukdomar av intresse, för att kunna följa hästens hälsostatus och identifiera underliggande sjukdomar i tid.

SUMMARY

Airway diseases are a common disorder in horses. Veterinary medicine is always striving to find better diagnostics, which ought to be simpler, more efficient and economical to use. The use of biomarkers is an effective way of getting data to be able to confirm diagnoses, of prognostic value and to monitor the development of the disease. On the veterinary equipment market today there is a device for field use that can measure the levels of Haptoglobin (Hp) in blood samples from horses. This literature study reviews how much information there is about Hp today and is an attempt to evaluate its potential as a biomarker for airway diseases in horses.

Hp is a positive acute phase protein. It is always present in a small amount in the blood of horses. In cases of inflammation, infections or trauma the body produces cytokines, which stimulates the hepatocytes in the liver to produce acute phase proteins. The levels of Hp in the blood increases usually in relation to the severity of the disease. The increase will sustain and reach maximum after a few days. It will then begin to decrease when the horse recover. Hp protects the body against reactive oxygen species, it stimulates the angiogenesis in wound healing and prevents the loss of iron. This is done by Hp forming complexes with hemoglobin that is released by the breakdown of erythrocytes. The complex is brought to the liver where it is broken down, and the body can then reuse the iron and amino acids.

Today, endoscopy and lung washing samples (BAL) are used to diagnose airway diseases in horses. These methods require special equipment and the presence of a cytology lab to confirm diagnose. The airways of horses will react in a negative way when they're held in a dusty environment, resulting in a systemic reaction followed by raised Hp levels. Horses with previous airway conditions will react more than healthy horses and high levels will be seen even after recovery.

Studies has shown that natural resulting disease as well as experimental induced has give raise to inflammation resulting in high concentrations of Hp. Examples of these were non-infectious arthritis, various types of surgery and intramuscular injections. But also pneumonia, muscle trauma, shipping fever, cellulitis as well as grass sickness. Various studies in horses with colic have been done with varying results. Hp has increased, been reduced or remained unchanged. However, there are indications that Hp levels in peritoneal fluid could be useful to analyse in cases of colic. Physiological conditions like pregnancy, exercise and transportation have also been shown to affect the Hp value in blood. Some to the extent that corresponds to levels for inflammatory condition. Variations in concentration can be seen at different seasons and vary with the horse's weight. Consideration must be given to the horse's age in the analysis, since younger individuals normally have higher concentrations than adults.

Several studies confirm the increase of Hp in different types of diseases but also during physiological conditions. Further studies are needed to get reliable reference intervals for the analyze method concerning subclinical diseases to improve the clinical use. Trainers and veterinarians of racing horses are more interested in better diagnostic possibilities concerning diagnosis of subclinical diseases. This to be able to monitor the health status of the horses and to especially identify diseases in an early stage.

INLEDNING

Luftvägssjukdomar hos häst är en vanlig diagnos. Symtomen kan variera i stor grad, allt från nedsatt prestation, till att hästen har svårt att andas vid vila. De hästar som har kliniskt tydliga symtom som hosta, ansträngd andning och nässekret är ofta lätta att diagnostisera, medan de hästar som inte visar några tydliga definierbara symtom är betydligt svårare. Den diagnostik som används idag är endoskopi av hästens luftvägar samt lungsköljprov (BAL). Att få reda på om hästen har en underliggande sjukdom är värdefullt dels för de som arbetar med hästar som ska prestera, och inte minst för hästens egen skull. Att tränas hårt eller transporteras långa sträckor med subklinisk luftvägssjukdom kan göra att problemen utvecklas och i vissa fall ger allvarliga konsekvenser.

De diagnostiska metoder som används idag är bra, men att istället för att använda endoskopi och BAL kunna analysera ett blodprov för att se om individen har en subklinisk sjukdom skulle vara betydligt enklare. Att få fram billiga, snabba och icke invasiva metoder för att kunna ställa diagnos och följa individens hälsostatus är eftertraktat inom veterinärmedicin. På marknaden finns det numera möjlighet att använda sig av ett enkelt mätinstrument som marknadsförs till tränare av tävlingshästar för att mäta Haptoglobinvärdet i blodet hos hästar. Syftet med denna litteraturstudie är att undersöka vad det finns för underlag för haptoglobinvärdet i blod som en möjlig biomarkör för lunglidande hos häst.

Hp – Haptoglobin

pHp – Pulmonärt Haptoglobin

IAD – Inflammatory Airway Disease

RAO – Recurrent Airway Obstruction

COPD – Chronic Obstructive Pulmonary Disease

BAL – Bronchoalveolar Lavage

BALF – Bronchoalveolar Lavage Fluid

Hb - Hemoglobin

MATERIAL OCH METODER

Denna litteraturstudie är baserad på vetenskapliga artiklar och veterinärmedicinska böcker. Databaser som använts för litteratursökning har varit Primo, Web of science, PubMed och Scopus. De sökord som kombinerats i dessa databaser är; Haptoglobin, Horse OR Equine OR human, Biomarker, RAO OR Recurrent airway obstruction OR IAD OR inflammatory airway disease OR COPD OR Chronic obstructive pulmonary disease OR heaves. Vissa artiklar har hittats via referenser i artiklar från ovan nämnda sökord.

LITTERATURÖVERSIKT

Akutfas reaktion och Akutfasprotein

I samband med en inflammation ses en systemisk reaktion. Celler reagerar på skada genom att frisätta produkter bildat av den oxidativa stress cellen utsätts för. På platsen produceras proinflammatoriska cytokiner (framförallt IL-1, IL-6 och TNF α) av monocyter och makrofager. Dessa cirkulerar i blodbanan, vilket stimulerar kroppen att svara med en så kallad "akutfasreaktion". En icke-specifik reaktion som innebär en förändring i koncentration av plasmans akutfasproteiner (Crisman et al., 2008). Dessa produceras i levern och släpps snabbt ut i blodet vid inflammation, infektion eller trauma. Vilken mängd beror på skadan eller infektionens omfattning. Deras uppgift är att minska vävnadsskada, starta reparationsprocessen samt återställa kroppens homeostas. För att klassas som ett akutfasprotein ska koncentrationen i plasma öka med ett minimum av 25% i samband med en akutfasreaktion (Gabay & Kushner, 1999). Vid akuta tillstånd kommer feedbackmekanismer begränsa reaktionen, vilket gör att den avtar inom några dagar om inget ytterligare stimuli tillförs. Vid kroniska tillstånd fås upprepad inflammatorisk stimulering, detta ger förhöjda nivåer, men inte i lika hög koncentration som ses vid akuta tillstånd (Petersen et al., 2003). Olika akutfasprotein reagerar i olika mängd vid olika tillstånd beroende på vilka mediatorer som frigörs och i vilken mängd. Deras individuella variation är värdefull och utnyttjas av läkare och veterinärer för att ställa diagnos samt ge prognostisk information (Gabay & Kushner, 1999; Crisman et al., 2008).

Haptoglobin

Haptoglobin (Hp) är ett glykoprotein som består av en alfa och en betakedja som subenheter (Lavoie-Lamoureux et al., 2012). Det är ett akutfasprotein som produceras i levern av hepatocyterna. Den skyddar mot reaktiva syreföreningar och stimulerar angiogenesen vid sårsläkning. Dess primära funktion är dock att förhindra järnförlust. Detta görs genom att bilda ett komplex med fritt hemoglobin (Hb) vilket frisätts då erythrocyter bryts ned. Komplexet förs till levern där det bryts ned av hepatocyterna, vilka återanvänder järnet och aminosyror (Crisman et al., 2008). Systemet kan mättas och då kommer Hb filtreras ut via njuren (Petersen et al., 2003).

Hemolytiska tillstånd ger en ökad mängd fritt Hb i blodet, på grund av detta fås en minskad mängd Hp, då komplexet snabbt elimineras från blodbanan (Petersen et al., 2003). Vid en inflammation däremot fås högre nivåer Hp i blodet vilket binder upp järnet i blodbanan och ger en bakteriostatisk effekt. Hp är ett positivt akutfasprotein, då det ökar i koncentration vid inflammation. Hos häst anses Hp vara en måttlig indikator, vilket innebär att den alltid finns i liten mängd i blodet hos friska individer. Koncentrationen stiger 1-9 gånger vid akutfasreaktion och svaret är ofta långsamt, det vill säga stegringen och återgång till normalvärde tar dagar till veckor (Crisman et al., 2008).

Diagnostik av luftvägssjukdomar

Endoskopi

Fiberoptiskt endoskop är en av de vanligaste metoderna som används för att studera hästens luftvägar. Detta ger en visuell bild av luftvägarna som kan följas från näsborrharna ända ner till lungorna. Sederling används oftast inte eftersom detta kan påverka vissa icke-normala tillstånd som kan vara av intresse vid undersökningen. Däremot kan en brems ge en lugnande effekt på

hästen. Endoskopi är bra för att undersöka de övre luftvägarna, samt för att upptäcka mukus eller blod i trakea (Rose & Hodgson, 1999).

Bronchoalveolar Lavage

Bronchoalveolar Lavage (BAL) är en metod användbar för att diagnosticera perifera luftvägssjukdomar. Hästen sederas för att kunna föra ner en slang till de nedre luftvägarna. Detta kan göras i blindo eller i samband med endoskopi. Detta för att säkerställa att provet tas från luftvägarna. Mellan 50 och 300 ml natriumklorid infunderas och aspireras med en gång. I provet finns vätskan bronchoalveolar lavage fluid (BALF) med de celler som förekommer i lungan. En cytologisk bedömning görs genom mikroskopi för att ställa diagnos. Provet ger endast information från den del av lungan som provtagits. Komplikationer kan uppstå i samband med BAL genom kontaminering av provet med debris eller mikroorganismer från pharynx (Rose & Hodgson, 1999).

Luftvägssjukdomar hos häst

Inflammatory Airway Disease

Inflammatory Airway Disease (IAD) är en inflammation i hästens luftvägar (Couetil et al., 2007). Hästarna svarar inte på träningen och har en längre återhämtningstid, de upplevs inte prestera på sin normala nivå. Individer som drabbas är ofta unga till medelålders och högpresterande (Couetil et al., 2007; Ghio et al., 2006). Hos hästar som inte tränas och presterar likvärdigt med elithästar inom trav och galoppsporten, kan IAD ses hos hästar i hög ålder. Etiologin är ej fastställd och åsikterna om vad som orsakar IAD är delade, men forskare tror att det har att göra med att de får en icke-specifik irritation i luftvägarna eller en överkänslighetsreaktion då de utsätts för damm, allergener och endotoxin (Couetil et al., 2007).

De kliniska symtom en häst med IAD visar är varken tydliga eller utmärkande endast för denna sjukdom, vilket leder till att den blir svårare att diagnosticera. De har ofta mukus i trakea och kan eventuellt ha hosta. Diagnostiken består av ett lungsköljprov, BAL. Hästarna har en mild neutrofil $< 20\%$, samt ökat antal lymfocyter och monocyter (Couetil et al., 2007; Ghio et al., 2006). Ökat antal mastceller och eosinofiler har setts hos unga hästar med IAD. Inflammationen är nonseptisk, därav har hästen inte feber (Couetil et al., 2007).

Recurrent Airway Obstruction

Recurrent Airway Obstruction (RAO) kallades tidigare för Chronic Obstruction Pulmonary Disease (COPD). Det är en inflammation i de nedre luftvägarna som drabbar medelålders till äldre hästar. En vanlig orsak är att hästarna exponerats för en dammig miljö. Ofta är det partiklar i stallet från hö och strö, men även vid hagvistelse under sommarhalvåret kan "summer pasture-associated obstructive pulmonary disease" utvecklas. Den typiska RAO-hästen har svårt att andas även i vila. Vid svåra fall börjar hästen att använda buken för att pressa ut luften vid utandning, detta benämns i dagligt tal kvickdrag. Till den kliniska bilden hör hosta och ibland näsflöde men ingen feber. Vid endoskopi ses ofta mukus i trakea. RAO diagnosticeras med hjälp av BAL. Det cytologiska svaret visar att hästen har en måttlig till svår neutrofil $>20\%$ (Couetil et al., 2007). Kronisk RAO associeras med hyperplasi av både bägarceller och bronkiella epitelceller. Det uppstår hypertrofi av glatta muskelceller samt en

deposition av kollagen vilket försvårar luftflödet och till slut kan ge alveolära emfysem (Ghio et al., 2006).

Haptoglobin vid patologiska tillstånd

Luftvägssjukdomar

I en studie gjord i Kanada jämfördes kliniskt friska hästar med hästar som hade en historik av RAO. Båda grupperna var vid studiestart fria från luftvägssjukdom och testades genom att de utsattes för en dammig miljö. I studien upptäcktes att koncentrationen Hp i blodprov var högre hos hästar med historik av RAO, än hos friska hästar vid alla provtillfällen, utan överlappning av data. Detta stämmer överens med den kliniska bedömning som gjordes där RAO-hästarna visade mer symtom än kontrollgruppen. Att värdena var högre redan vid den inledande provtagningen innan hästarna utsatts för den dammiga miljön föreslogs bero på att hästarna hade en subklinisk luftvägssjukdom (Lavoie-Lamoureux et al., 2012).

Alla hästar som medverkade vid studien fick en ökad koncentration av Hp i samband med installningen. Detta tyder på att hästar som står i en dammig miljö får en systemisk reaktion med förhöjda Hp värden som följd. Hästarnas mätvärden var högre dag 7 jämfört med dag 0. Kontrollhästarna återhämtade sig snabbare och uppvisade normalvärde dag 30, medan RAO hästarnas Hp värden hade börjat sjunka, men inte nått de nivåerna som uppmättes vid studiens start. Resultaten av studien tyder på att en systemisk inflammation fås i samband med den kliniska utvecklingen av luftvägssjukdom och fortskrider även när symtomen avtar och hästarna tillfrisknar (Lavoie-Lamoureux et al., 2012).

Kolik

Mätning av Hp koncentrationer i samband med kolik har gett olika resultat. Milne et al., (1991) såg ingen signifikant ökning vid kolik hos hästar, där duration och anledning till kolik varierade. I studien gjord av Taira et al., (1992) sågs en höjning av Hp värdet i samband med kolik, medan nivåerna sjönk i studien gjord av Pihl et al., (2013). I den sistnämnda uppmättes koncentrationen Hp i blodprov samt bukpunktat hos friska hästar och hos hästar med kolik. Bukpunktatets Hp värden steg, vilket förklarades av den lokala inflammation som uppstod i bukhålan. Koncentrationen uppnådde inte lika höga värden som i blodet men ansågs användbar då referensintervallet var litet och att en höjning sågs hos alla hästar som testades. Blodprovskoncentrationerna hade individuella skillnader vilka påverkade de referensintervall som togs fram. Dessa var bredare än i studien gjord av Pollock et al.,(2005), trots att de använt samma analysmetod, (dock hade små justeringar gjorts för att få reagenterna mer stabila) (Pihl et al., 2013).

Gräsbetessjuka

Milne et al., (1991) undersökte Hp värdet i samband med gräsbetessjuka. Gräsbetessjuka är en dödlig sjukdom, med okänd etiologi, men det anses inte vara ett inflammatoriskt tillstånd. Den ger kliniska symtom från magtarmkanalen, hästen får svårt att svälja, dilatation av magsäcken, koprostas och koliksymtom. Hp koncentrationen i blodet steg i alla faser av gräsbetessjuka. Dock var det i det subakuta stadiet som de högsta nivåerna uppmättes.

Fång

Hos ponnyer inducerades fång genom att de sondades med kolhydratrik föda. Hp värdena mättes och steg signifikant redan vid första mättillfället efter 4 timmar. Forskarna tror att det inflammatoriska svaret med förhöjda värden av akutfasproteiner kunde bero på att toxiner absorberats från tarmarna i samband med den kolhydratrika födan (Fagliari et al., 1998). I samband med studier gjorda på ponnyer som tidigare hade haft fång samt kontrollponnyer, upptäcktes att Hp koncentrationen ej påverkades av fångstatus. Däremot hittades att Hp värdet varierade med årstid och vikt. Där värdet var högre under vintern än under sen vår, samt att Hp koncentrationen minskade vid ökad vikt (Wray et al., 2012).

Icke-infektiös artrit

Vid icke-infektiös artrit fås en akutfasreaktion på grund av att det uppstår en lokal inflammation i leden med vävnadsskada. Denna skada ger upphov till synovit och kapsulit, vilket ger en cytokinproduktion som i sin tur gav en Hp stegring. Hp ökade från 24 h och nådde sitt max efter 2-4 dagar. Åter normala värden uppmättes efter 14 dagar trots att det fortfarande fanns radiologiska och lokala kliniska tecken på artrit (Hultén et al, 2002).

Inducerad inflammation

Hos 9 hästar inducerades inflammation efter det att ett normalprov tagits. De injicerades intramuskulärt med terpentinolja, kastrerades eller utsattes för experimentell jejunostomi. En ökning av Hp koncentrationen med upp till 9 gånger kunde identifieras. Efter 6 timmar sågs en höjning. Det högsta mätvärdet uppnåddes 5 dagar efter inducerad skada. Nivåerna ansågs signifikanta från dag 1-21. Värdet var åter inom normala referensnivåer efter 4 veckor. Det fanns individuella skillnader i mätvärdena, vilka antogs vara relaterade till graden av inflammation hos individen (Taira et al., 1992).

Kirurgi

Haptoglobinvärdet registrerades hos hästar som antingen hade en bokad operationstid utan tecken på inflammation ex kastration, eller hos hästar som på grund av en sjukdom skulle opereras ex avlägsnande av abscess. Prover togs innan kirurgi samt uppföljande vid specifika tidpunkter efter operationen. Hp värdena hos hästarna ökade mellan 24-48 timmar och hade inte börjat sjunka vid studiens slut efter 72 timmar (Pollock et al., 2005).

Olika sjukdomstillstånd

I studien gjord av Taira et al, (1992) togs blodprov från 83 hästar med kliniska tecken på inflammation. Sjukdomarna vilka gav förhöjda Hp nivåer hos vuxna hästar var transportsjuka, pneumoni, kolik, abortering och cellulit. Hos föl var det enterit, pneumoni, och diarré. Graden av sjukdom noterades ej. Även Milne et al., (1991) provtog hästar med olika inflammatoriska tillstånd, exempelvis muskeltrauma, pneumoni och rhabdomyolys. De flesta provtogs under den akuta delen av sjukdomstillståndet. Även i denna studie visades att Hp koncentrationerna stiger vid normalt uppkomna sjukdomstillstånd.

Cray & Belgrave, (2013) jämförde kliniskt friska hästar med sjuka. Hp steg signifikant med 3,3 gånger hos de kliniskt onormala hästarna. En svag men signifikant korrelation fanns mellan Hp och antalet vita blodkroppar, vars medelvärde steg men höll sig inom referensintervallet. Det sågs ett högre värde på Hp hos de hästar vilka visade kliniska symtom i 7 dagar än hos de som visade tecken på sjukdom under mindre än 4 dagar. I vissa fall var det dock svårt att avgöra då djurens ägare ej var säkra på när symtomen startade. Sjukdomstillstånden varierade men patienten kom in på grund av inflammatoriska eller infektiösa tillstånd.

Haptoglobin vid icke-patologiska tillstånd

Kliniskt friska hästar

Blodprov togs från 205 hästar i olika åldrar. Vid jämförelse av de olika mätvärdena med avseende på Hp koncentrationen i blodet upptäcktes att föl upp till 1 års ålder hade de högsta mätvärdena. Värdet sjönk med stigande ålder och hos vuxna hästar över 18 månader låg värdet betydligt lägre (Taira et al, 1992). Även i studien gjord av Pollock et al., (2005) konstaterades att föl hade en högre Hp koncentration än äldre individer. De provtog en grupp om 50 hästar i olika åldrar från samma stall. 48 av dessa var inom det referensintervall som laboratoriet angett för analysmetoden. Övriga två individer hade förhöjda Hp värden och drabbades senare av en infektion i luftvägarna.

Dräktighet

Hos dräktiga ston uppmättes högre koncentrationer av Hp en månad innan partus, med en maxkoncentration precis efter födseln, för att sedan sjunka i värde tills det lägsta uppmätta värdet nåddes efter 3 månader. Stegringarna innan partus tros bero på hormonella förändringar, i samband med förhöjda östrogennivåer, medan andra faktorer anses orsaka de höga värdena efter partus (Taira et al., 1992).

Träning

Under en 80-dagars period provtogs galopphästar i träning med regelbundna intervall. Resultaten visar att Hp nivåerna ökar i samband med träning, för att nå nivåer motsvarande en akutfasreaktion under dag 60-80 (Fazio et al., 2010). Vid distansridning sågs ingen ökning av Hp koncentrationer i serum (Cywinska et al, 2012). I samband med polotävlingar upptäcktes däremot en stegring av Hp koncentrationen. Ökningen inträffade i samband med matchen och syntes i blodprovet redan efter 5 minuter. Efterföljande blodprov togs efter 6 timmar, då hade nivåerna sjunkit och ansågs vara normala. Ökning ansågs ej bero på något inflammatoriskt tillstånd, utan istället vara fysiologiskt sammankopplad med den stress hästarna utsätts för i samband med träning, samt att hästar vid intensiv träning kan tömma sin mjälte på erythrocyter. Dessa är skörare och mer permeabla, vilket gör att fritt Hb läcker ut i blodbanan. Kroppen svarar på den ökade mängden fritt Hb genom att producera mer Hp och därav fås ett högre värde (Gondin et al., 2013). Denna teori stöds även i studien gjord av Hanzawa et al,(2002). Där det visats att den fysiska och kemiska stress som erythrocyterna utsätts för i samband med träning leder till osmotiskt sköra erythrocyter, vilket i sin tur leder till ökad mängd fritt Hb i blodet och en intravaskulär hemolys. Hos hästar där mjälten kirurgiskt hade avlägsnats upptäcktes att dessa hade en minskad hemolystakt jämfört med kontrollhästar. Vid

träning sågs en ökad hemolystakt hos båda grupperna, men fortfarande var den signifikant högre hos kontrollhästarna. Efter träning sågs en ökad nivå av Hp–Hb komplex hos kontrollhästarna, medan denna nivå ej förändrades hos hästarna utan mjälte. Haptoglobinvärdet i samband med ansträngning har studerats även av (Pellegrini et al., 2003). Här mättes koncentrationerna av Hb och Hp före träning, 5 och 10 minuter efter träning samt dagen efter. Här uppmättes höjningar av hemoglobin både vid 5 och 10 minuter efter, för att sedan ha sjunkit till dagen efter. Hp nivåerna hade stigit efter 5 minuter och sedan sjunkit lite efter 10 minuter, för att nå normalvärden dagen efter. I denna studie togs hänsyn till att ansträngningen påverkar blodets sammansättning, med sänkning av plasmavolym. Därav jämfördes värdena av Hb och Hp som en del av totalprotein i blodet. Resultatet innebar fortfarande en stegring av Hb nivåerna, medan det innebar en minskning av Hp koncentrationen. Dessa värden överensstämmer med det förlopp som en intravaskulär hemolys innebär.

Transport

Haptoglobin har även setts öka efter transport av hästar. Detta ansågs inte bero på inflammation eller vävnadsskada, utan vara orsakat av den stress hästen utsatts för i samband med transporten (Casella et al, 2012).

Haptoglobin hos andra djurslag

Idisslare

Hos idisslare är Hp ett akutfasprotein som fungerar väl som indikator. Det ökar i koncentration mer än 10 gånger vid stimulering (Eckersall, 2000). Sammansättningen hos nötkreatur består av α - och β -kedjor vilka sammankopplas och tillsammans med albumin fås en polymer med en vikt av 100kDa (Petersen et al., 2003). Hos nötkreatur används Hp värdet vid pneumoni, mastit och metrit, samt för att avgöra effekten av olika antibiotikabehandlingar (Eckersall, 2000). Höga Hp-koncentrationer har upptäckts vid olika metaboliska tillstånd och vid kastration, men har även förknippats med lesioner som hittats vid besiktning efter slakt (Petersen et al., 2003).

Gris

Hp hos gris anses vara ett bra akutfasprotein. Det liknar människans typ 1-1 och väger ungefär 120kDa. Låga Hp koncentrationer ses hos nyfödda kulingar, för att efter 2-3 veckor motsvara normalnivåer för vuxna individer. Höga Hp nivåer har upptäckts i samband med luftvägsproblem, diarré, hälta, samt öronnekros och svansbitning (Petersen et al., 2003). Hp värdena har även använts till att identifiera subkliniska sjukdomar. Detta har varit värdefullt vid besättningsutredningar, då just subkliniska sjukdomar ofta orsakar en minskad tillväxt (Eckersall, 2000). Upprepade blodprovstagningar har visat att det finns en individuell variation från dag till dag hos individer, men det har ej visats att upprepade blodprovstagningar skulle påverka Hp nivåerna (Petersen et al., 2003).

Hund

Hos hund liksom hos häst är Hp en måttlig indikator. Den används för att diagnosticera inflammatoriska tillstånd och kan användas för att skilja mellan olika differentialdiagnoser eftersom koncentrationen av Hp är relativ till graden av inflammation. Den har även prognostiskt värde vid levercirrhos (Eckersall, 2000).

Haptoglobin hos människa

Luftvägslidande hos människa och häst är lika i många avseenden. Hosta, rossliga luftvägar och andningssvårigheter är vanliga kliniska symtom. Hästar utsätts i regel för organiska partiklar i sin miljö, detta sker regelbundet under långa perioder. Människor som drabbas av Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) har framförallt kommit i kontakt med oorganiska partiklar. Dessa förekommer ofta i luftföroreningar, cigarettrök, förbränning av biomassa mm. Hos människa förekommer stora individuella variationer, där rökare utsätts för höga koncentrationer av partiklar. Lantbrukare som kan råka ut för så kallad ”dammlunga” utsätts i större utsträckning för liknande biologiska partiklar som hästarna gör.

Histologiskt syns hos människa liksom hos häst ett ökat antal neutrofiler. Även förekomst av makrofager, eosinofiler, emfysem och parenkymal fibros är vanliga följder av COPD (Ghio et al., 2006).

I motsats till hästarnas Hp värden så har bebisar ett lågt Hp som blir högre med åldern. Värdena hos människa varierar även med det fysiologiska tillståndet och finns i typerna 1-1, 2-1, och 2-2. Det finns även en skillnad i värde mellan kön, där män har högre värden än kvinnor, vilket antas bero på hormonella skillnader (Taira et al., 1992). Hästens Hp är lik humant Hp av typ 1-1 (Lavoie-Lamoureux et al., 2012).

Vid en studie av Abdullah & Goldmann, (2012) där de i samband med kirurgi av lungcancer tog prover av den normala lungvävnaden fann de att Hp finns uttryckt i den humana lungan, pulmonary Haptoglobin (pHp). Det hittas i Alveolära epitelceller typ II, i alveolära makrofager samt i bronkepitelet. Studien visar även att förutom sin antioxidanta roll, har pHp även en roll i immunomoduleringen. De fann att pHp linjerade den alveolära ytan, samma ställe där surfaktantproteinerna finns. Det ansågs att pHp var ett surfaktantprotein, och att dess immunomodulerande egenskaper skulle komplettera de egenskaper som surfaktantproteinerna har. Dess antioxidanta egenskaper skulle ha betydelse vid arteriella skador i lungan, då den skulle hjälpa vid reparationsprocessen. Att pHp inte hittats vid analyser av surfaktantproteinerna tros bero på att reningsprocessen avlägsnat det från provmaterialet.

DISKUSSION

Flertalet studier har visat att koncentrationen av Hp i blodprov kan användas som markör för inflammatoriska tillstånd hos häst. Koncentrationen av Hp i blodet ökar långsamt och har sin peak några dagar efter att inflammationen uppstått. Värdet sjunker sedan i takt med att inflammationen avtar. Dessa resultat kan ha betydelse och ge information angående prognos, diagnostik och för att kunna följa sjukdomens utveckling.

Hästar med luftvägssjukdom får en systemisk påverkan i form av en akutfasreaktion. Då hästarna utsätts för en dammig miljö fås Hp stegring i blodet och hästarna börjar visa kliniska symtom. Hos hästar som inte tidigare har haft luftvägsproblem sågs en snabbare återhämtning, Hp värdena sjönk trots att hästarna visade en cytologisk profil motsvarande IAD. Hos hästar med en historik av RAO sågs vid alla tidpunkter en högre koncentration av Hp. Detta trots att hästarna vid studiens start hade en normal cytologiprofil, efter att under en tid levt med strikta miljöåtgärder. De återhämtade sig inte lika snabbt som kontrollgruppen. Detta antyder att den systemiska inflammation som fås i samband med luftvägssjukdom kvarstår längre hos hästar med tidigare historik av RAO. Anledning skulle kunna vara en defekt i den negativa feedbackmekanismen hos inflammationen, enligt Lavoie-Lamoureux, (2012), vilket skulle bidra till att Hp värdena är högre i alla kliniska faser hos hästar som en gång haft RAO. Huruvida IAD som är en subklinisk sjukdom och mildare än RAO i sin systemiska påverkan, ger tillräckligt höga Hp värden, som kan definieras och skiljas från referensvärdena återstår att utreda. Eftersom det är de subkliniska sjukdomarna som är av störst intresse att detektera. Tänkvärt är dock att Hp värdet skulle kunna vara en potentiell markör för dålig miljö och användas som indikator för att jämföra hästarnas omgivning i olika stallar.

Data angående Hp koncentrationerna vid kolik varierar. Metoderna för analyserna har varit olika i studierna. Även anledningarna och hästens tillstånd har skiljt sig åt både inom och mellan studier. Det är därför svårt att ge en samlad bild av hur mätvärden vid denna typ av sjukdom ska användas. Att de minskade i studien gjord av Pihl et al., (2013) ansågs bero på att de i episoder fick en ökad utsöndring av Hb-Hp komplex vid akut svår kolik. Beror detta på att en hemolys fås i samband med akut kolik? Studien gav individuella skillnader med extremvärden i resultatet, vilket gör att referensintervallet som togs fram endast ska ses som vägledning. Resultaten från provtagning av bukvätskan hos kolikhästarna kan dock vara användbart då den höjdes hos alla hästar med kolik samt hade ett litet referensintervall, vilket är bra egenskaper hos en markör. Mätmetoden som användes ansågs vara bra då den hade en hög kapacitet till en låg kostnad. Dock krävs fler studier för att göra Hp-koncentrationer i blod samt bukvätska applicerbart som biomarkör för kolik.

Koliksymtom fås även vid gräsbetessjuka. Genom att jämföra Hp värden mellan hästar med gräsbetessjuka och kolik hoppades forskarna kunna hitta en metod att särskilja dessa diagnoser. Detta såg ut att kunna användas i studien gjord av Milne et al., (1991), där kolikhästarna inte visade någon förändring i Hp koncentration, medan hästarna med gräsbetessjuka fick förhöjda nivåer. Dock visar senare studier, vilka nämnts ovan att det finns en variation i Hp värdena vid kolik. Detta innebär att teorin måste utredas mer för att säkerställa skillnaden i Hp nivå mellan gräsbetessjuka och kolik. Att en stegring av Hp koncentrationen fås i samband med gräsbetessjuka trots att denna ej är ett inflammatoriskt tillstånd, tros bero på att kortisolnivåerna stiger i samband med att hästen får kliniska symtom, enligt Milne et al., (1991).

Fång visade sig ge en akutfasreaktion med höjda Hp värden. Detta antog författarna bero på absorption av toxin från tarmarna. Fång innebär att hästarna får en inflammation i

lamellranden i hovarna, och enbart detta skulle säkerligen kunna ge upphov till akutfas svaret, även vid avsaknad av toxinupptag. Hos hästar som haft fång någon gång under de tre föregående åren innan studien, visades inget samband mellan fångstatus och Hp koncentrationen i blod. Detta innebär dock inte att en stegring inte ses i samband med att hästen har kliniska tecken på fång, då detta var en exkluderande faktor för att få medverka i studien (Wray et al., 2012).

Höjning av Hp värdet ses vid ett antal olika tillstånd. Det kan ses i studier då hästen åsamkats skada, vilken inte uppkommit på naturlig väg, så som vid experimentella ingrepp och kirurgi. Även hos hästar som drabbats av olika sjukdomstillstånd som vanligen ses på hästkliniker exempelvis transportsjuka, pneumoni, abortering och cellulit, samt hos föl med enterit, pneumoni och diarré (Tiara et al., 1992; Hultén et al., 2002; Pollock et al., 2005). Hur hög Hp koncentration som fås avgörs av sjukdomsgraden (Gabay & Kushner, 1999), men även av hur lång duration sjukdomen har (Cray & Belgrave, 2013). Även tillstånd så som dräktighet ger i perioder höga Hp nivåer, liksom stressen hästen upplever vid transporter. Därav kan ett missvisande värde fås om hästen transporterats dagarna innan provtagning skett. Ytterligare en viktig sak att tänka på vid bedömningen av sina provsvar är att yngre individer har en normalt högre nivå av Hp i blodet enligt Tiara et al., (1992) och Pollock et al., (2005). Likaså att mätvärdena kan variera mellan årstider, och att Hp koncentrationen minskade vid ökad vikt enligt studien gjord av Wray et al., (2012).

Träning är också en faktor som kan påverka Hp koncentrationen i blodet. Det har visats att det höjs under en längre period av intensiv träning och att koncentrationerna kan överskrida referensintervallet (Fazio et al., 2010). Ska detta tolkas som en träningseffekt eller är detta ett tecken på subklinisk sjukdom? Vid intensiv ansträngning kan hästar tömma sin mjälte på erythrocyter, vilket har visats ge ökad mängd fritt Hb i blodet genom hemolys. Detta anses bero på att erythrocyter i samband med mjältekontraktion blir osmotiskt skörare, vilket ger en ökad permeabilitet och att Hb då kommer ut i blodbanan Hanzawa et al., (2002). I studien gjord av Gondin et al., (2013) uppmättes ökade Hp koncentrationer i samband med träning. Hästarna fick en höjning av Hp då levern började producera mer för att neutralisera det Hb som frisatts vid mjälteutlösningen. Detta kunde urskiljas i blodprovet efter 5 minuter. Däremot borde en sänkning av Hp setts i ett senare skede på grund av att komplexen börjat elimineras från blodbanan. Däremot visades samma scenario i studien av Pellegrini et al., (2003), med ökade Hp koncentrationer efter ansträngning. Dock förändrades dessa värden då de tog hänsyn till andra faktorer som påverkar blodets procentuella sammansättning i samband med träning. Där resultatet visar på förloppet vid en intravaskulär hemolys. Både faktorer som mjältekontraktion samt förlust av vätska i samband med ansträngning kommer leda till en högre hematokrit. Att Hp koncentrationen sjunker i samband med hemolys, skulle kunna innebära att ett inflammatoriskt tillstånd maskeras till följd av detta.

Strukturen och användbarheten varierar mellan olika djurslag. Hp är hos svin och idisslare en bra indikator, vilket innebär att den ökar i större mängd vid tecken på inflammation. Det har använts till så väl subkliniska, akuta och kroniska tillstånd. För att mäta hälsotillståndet i en grupp individer, som även kan vara av intresse inom hästsporten.

Det finns vissa likheter mellan lungproblem hos människa och häst. Vilket gör att viss forskning som gjorts inom humanmedicinen även kan vara applicerbart inom veterinärmedicinen. Dock finns skillnader både individer emellan samt mellan människa och häst. Människans hälsotillstånd kan påverkas av genetiska faktorer, miljö, livsval i form av arbetsplats och användandet av cigaretter. Hos hästen har typ av ras stor betydelse för i vilken grad hästen förväntas prestera, även miljö är en viktig faktor, där grad av utevistelse samt val

av foder och strö kan ha stor betydelse för hästens hälsa. P_{HP} har påvisats som en del av surfaktantsystemet i den humana lungvävnaden. Den har visats inneha en immunomodulerande roll utöver sin kapacitet som antioxidant. Sådan information skulle vara intressant att utreda även inom veterinärmedicin, särskilt med tanke på frekvensen av luftvägsproblem och dess betydelse för prestation hos häst.

Att det finns flera faktorer och sjukdomar som påverkar Hp värdet, gör att det blir svårare att använda Hp som markör för enbart luftvägslidanden. Förhöjda värden ses när kroppen drabbats av skada som gett en akutfasreaktion. Detta är värdefullt i den mån hästen eventuellt behöver någon form av behandling och inte ska ansträngas, av den orsak att det kan ge allvarliga komplikationer. Att hos tävlingshästar följa deras hälsostatus genom att regelbundet ta upprepade prover för att kunna se individuella skillnader och tidigt kunna hitta en underliggande inflammation i kroppen, skulle kunna ge värdefull och användbar information. Att Hp har olika sorters funktioner i kroppen vid olika tillstånd, såväl patologiska som fysiologiska, påverkar dock dess användbarhet som biomarkör för inflammatoriska tillstånd.

Studierna som gjorts inom området har haft olika inriktningar. Hästarna har haft olika sorters sjukdomar och analysmetoderna har varierat. Referensintervallen som erhållits i studierna har även de varit varierat. Att med dessa data kunna avgöra värdet av Hp som lämplig biomarkör är svårt, framförallt i samband med luftvägssjukdomar där avsaknaden av forskning har stor betydelse. Fler studier krävs för att kunna bilda sig en klar uppfattning om Hp värdet är tillämpbar som biomarkör, samt vilken roll den skulle anta inom den veterinär medicinska diagnostiken. Studierna måste innehålla ett tillräckligt stort antal hästar för att få fram det referensintervall som ska användas till den typ av analysmetod som också ska vara lämplig att använda kliniskt. All information som går att få för att ställa diagnos, avgöra prognos och följa sjukdomens utveckling eller behandlingens framsteg är värdefull.

KONKLUSION

Det har visats att en ökad koncentration av Hp ses i samband med luftvägsproblem. Även ett flertal andra sjukdomar har gett höjda Hp nivåer. En höjning ses dock inte enbart vid inflammation utan även vid olika icke-patologiska tillstånd. Att det finns många faktorer som inverkar på dess förekomst i blodet innebär att den blir svår att använda enbart för luftvägsproblem. Flera studier krävs för att undersöka diversiteten hos Hp samt för att säkerställa dess funktion i olika sammanhang.

LITTERATURFÖRTECKNING

- ABDULLAH, M., GOLDMANN, T. 2012. Pulmonary haptoglobin (PHp) is part of the surfactant system in the human lung. *Diagnostic Pathology*, 7:158
- CASELLA, S., FAZIO, F., GIANNETTO, C., GIUDICE, E. & PICCIONE, G. 2012. Influence of transportation on serum concentrations of acute phase proteins in horse. *Research in Veterinary Science*, 93, 914-917.
- COUETIL, L.L., HOFFMAN, A.M., HODGSON, J., BUECHNER-MAXWELL, V., VIEL, L., WOOD, J.L.N., LAVOIE, J. 2007. Inflammatory Airway Disease of Horses. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*, 2007, 21, 356-361.
- CRAY, C., BELGRAVE, R.L. 2013. Haptoglobin Quantitation in Serum Samples from Clinically Normal and Clinically Abnormal Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34 (2014), 337-340.
- CRISMAN, M. V., SCARRATT, W. K. & ZIMMERMAN, K. L. 2008. Blood proteins and inflammation in the horse. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, 24, 285-+.
- CYWINSKA, A., SZARSKA, E., GORECKA, R., WITKOWSKI, L., HECOLD, M., BEREZNOWSKI, A., SCHOLLENBERGER, A. & WINNICKA, A. 2012. Acute phase protein concentrations after limited distance and long distance endurance rides in horses. *Research in Veterinary Science*, 93, 1402-1406.
- ECKERSALL, P.D.2000. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Congress International Society of Animal Clinical Biochemistry, Toulouse*, 151, 7, 577-584
- FAGLIARI, J.J., MC CLENAHAN, D., EVANSON, O.A., WEISS, D.J. 1998. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. *American Journal of Veterinary Research*, 59, 10, 1234-1237.
- FAZIO, F., ASSENZA, A.,TOSTO, F.,CASELLA, S.,PICCIONE, G., CAOLA, G. 2010. Modifications of some acute phase proteins and white blood cell count in thoroughbreds during training. *Veterinary Record*, 167, 370-372.
- GABAY, C., KUSHNER, I. 1999. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 340, 6, 448-454.
- GHIO, A.J., MAZAN, M.R., HOFFMAN, A.M., ROBINSON, N.E. 2006. Correlates between human lung injury after particle exposure and recurrent airway obstruction in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 38, 4, 362-367.
- GONDIN, M. R., FOZ, N. S. B., PEREIRA, M. C., FLAGLIARI, J. J., OROZCO, C. A. G., D'ANGELIS, F. H. F., QUEIROZ-NETO, A. & FERRAZ, G. C. 2013. Acute Phase Responses of Different Positions of High-Goal (Elite) Polo Ponies. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 956-961.
- HANZAWA, K., HIRAGA, A., YOSHIDA, Y., HARA, H., KAI, M., KUBO, K., WATANABE, S. 2002. Effects of Exercise on Plasma Haptoglobin Composition in Control and Splenectomized Thoroughbred Horses. *Journal of Equine Science*, 13, 89-92.
- HULTEN, C., GRONLUND, U., HIRVONEN, J., TULAMO, R. M., SUOMINEN, M. M., MARHAUG, G. & FORSBERG, M. 2002. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha(2)-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 34, 699-704.
- LAVOIE-LAMOUREUX, A., LECLERE, M., LEMOS, K., WAGNER, B. & LAVOIE, J. P. 2012. Markers of Systemic Inflammation in Horses with Heaves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26, 1419-1426.
- ROSE, R. J & HODGSON, D.R. 1999. *Manual of Equine Practice*. 2. ed. London, W. B. Saunders.

- MILNE, E. M., DOXEY, D. L., KENT, J. E. & PEMBERTON, A. 1991. ACUTE PHASE PROTEINS IN GRASS SICKNESS (EQUINE DYSAUTONOMIA). *Research in Veterinary Science*, 50, 273-278.
- PELLEGRINI MASINI, A., TEDESCHI, D., BARAGLI, P., SIGHIERI, C., LUBAS, G. 2003. Exercise-induced intravascular haemolysis in standardbred horses. *Comparative Clinical Pathology*, 12, 45-48.
- PETERSEN, H.H., NIELSEN, J.P., HEEGAARD, P.M.H. 2003. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry, *Veterinary Research*. 35 (2004)163-187.
- PIHL, T. H., ANDERSEN, P. H., KJELGAARD-HANSEN, M., MORCK, N. B. & JACOBSEN, S. 2013. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations in serum and peritoneal fluid of healthy horses and horses with acute abdominal pain. *Veterinary Clinical Pathology*, 42, 177-183.
- POLLOCK, P. J., PRENDERGAST, M., SCHUMACHER, J. & BELLENGER, C. R. 2005. Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses. *Veterinary Record*, 156, 538-542.
- TAIRA, T., FUJINAGA, T., OKUMURA, M., YAMASHITA, K., TSUNODA, N., MIZUNO, S. 1992. Equine Haptoglobin: Isolation, Characterization, and the Effects of Ageing, Delivery and Inflammation on Its Serum Concentration. *Journal of Veterinary Medical Science*, 54, 3, 435-442.
- WRAY, H., ELLIOTT, J., BAILEY, S.R., HARRIS, P.A., MENZIES-GOW, N.J. 2012. Plasma concentrations of inflammatory markers in previously laminitic ponies. *Equine Veterinary Journal*, 45 (2013), 546-551.