



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och  
husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper

# Stabilitet hos ACTH i plasma från hund

*Lena Jonsson*

*Uppsala  
2014*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2014:61*



# Stabilitet hos ACTH i plasma från hund

## Stability of canine plasma ACTH

*Lena Jonsson*

*Handledare: Jeanette Hanson, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Biträdande handledare: Inger Lilliehöök, Universitetsdjursjukhuset*

*Examinator: Helene Hamlin, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0736

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2014

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2014:61

**ISSN:** 1652-8697

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Adrenokortikotropt hormon ACTH, stabilitet, hund, hypoadrenocorticism

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper



## **SAMMANFATTNING**

När en hund diagnostiserats med hypoadrenocorticism bör bakomliggande orsak utredas. I detta ingår en analys av plasmakoncentrationen av adrenokortikotrop hormon (ACTH). ACTH anses dock brytas ner snabbt och riktlinjerna för hur provtagning och provhantering är därför omfattande. Syftet med denna studie är att undersöka stabiliteten hos hundens ACTH för att utvärdera möjligheterna till förenklad provhantering. Detta görs genom att studera hur mycket ACTH-koncentrationen i plasma minskar vid olika förvaringstemperaturer och förvaringstider. Vid förvaring i frys under en veckas tid var minskningen av ACTH-koncentration liten. Vid förvaring i kyl under 72 timmar och i rumstemperatur under ett dygn skedde en markant minskning av ACTH-koncentrationen. Resultatet i studien tyder dock på att ACTH är tillräckligt stabilt för att prover ska kunna skickas tillsammans med någon form av kylmedium för analys efter en- till två dagar.

## **SUMMARY**

When the diagnosis of hypoadrenocorticism is made, it is of interest to know whether it is caused by a primary (adrenocortical-dependent) or secondary (pituitary-dependent) lesion. This is done by measuring adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Canine ACTH is rapidly degraded in plasma and standard recommends centrifugation in cold centrifuge, stored and shipped frozen. This advanced handling procedure complicates the use of this diagnostic tool in every day practice. In horse medicine the guidelines for sample collection and storage have recently been changed due to that ACTH have been shown to be more stable than expected. The purpose of this study is to measure the stability of ACTH in canine plasma to evaluate the possibilities of simplified guidelines for sample collection and storage. This is done by testing how fast the concentration of ACTH in canine plasma is degraded at different storage temperatures and storage times. The result of the study indicates that ACTH is stable enough for sample collection and handling in room temperature and shorter storage under chilled conditions.



## INNEHÅLL

Inledning .....	9
Litteraturoversikt .....	10
Hypothalamus och hypofysen .....	10
Binjuren .....	10
Aldosteron .....	10
Kortisol .....	10
Hypoadrenocorticism .....	11
ACTH .....	12
Provhantering vid ACTH-mätning .....	13
Stabilitet hos ACTH .....	13
Referensvärden ACTH hos hund .....	15
ACTH-analys vid hyperkortisolism hos häst .....	16
Material och metoder .....	17
Urval .....	17
Studiedesign .....	17
Arbetschema .....	17
Analysmetod .....	20
Resultat .....	21
Hantering på is och förvaring i frys .....	22
Hantering i rumstemperatur och förvaring i kyl .....	24
Hantering och förvaring i rumstemperatur .....	26
Diskussion .....	28
Referenser .....	31





## INLEDNING

Hypoadrenocorticism är ett relativt ovanligt tillstånd hos hund och förekommer i två former, primär och sekundär. (Peterson *et al.*, 1996). Vid den primära formen bryts binjurebarken ner vilket ger upphov till hypoaldosteronism och/eller hypokortisolism. Sekundär hypoadrenocorticism orsakas av att adrenokortikotropt hormon (ACTH) inte utsöndras från hypofysen i tillräcklig mängd för att stimulera tillräcklig kortisolproduktion i binjuren. Vid den sekundära formen är utsöndringen av aldosteron opåverkad. (Kintzer & Peterson, 1997)

De kliniska tecknen vid primär- och sekundär hypoadrenocorticism är oftast likartade, och även blodbilderna kan vara likartade beroende på i vilket skede av sjukdomen som proverna tas. Detta gör att det kan vara svårt att differentiera mellan de två olika formerna (Peterson *et al.*, 1996; Thomson *et al.*, 2007) och efter ett positiv ACTH-stimuleringstest behandlas ofta patienter på samma sätt oavsett bakomliggande orsak. Vanligtvis behandlas patienterna med både fludrokortison, som har både mineral- och glukokortikoid verkan, i kombination med prednisolon (Melián & Peterson, 1996) trots att det inte alltid är nödvändigt då vissa patienter enbart har hypokortisolism. (Kintzer & Peterson, 1997)

För att djur inte ska behandlas i onödan bör den behandlande veterinären differentiera mellan den primära- och den sekundära formen och utreda grundorsaken till hypokortisolismen genom att mäta endogent ACTH. Molekylen anses dock snabbt brytas ner i rumstemperatur vilket ställer höga krav på provhanteringen (Kintzer & Peterson, 1997). Detta innebär i praktiken att kliniker som inte har direkt tillgång till utrustning där ACTH kan mätas inte kan utnyttja denna diagnostik.

Inom hästmedicinen används dock ACTH i allt större utsträckning vid misstanke om hyperkortisolism då det har visats att ACTH i plasma från häst är mer stabilt än man tidigare trott. (Rendle, 2012)

Den här studiens syfte är att undersöka stabiliteten hos ACTH i plasma från hund efter olika hanterings- och förvaringstemperaturer samt olika långa förvaringstider och därmed undersöka möjligheterna till förbättrad diagnostik vid hypoadrenocorticism.

Frågeställningar som undersökningen förväntas ge svar på är följande: Hur mycket minskar ACTH-koncentrationen vid kylhantering, förvaring i frys, vid -20 °C i upp till en vecka? Hur mycket minskar ACTH-koncentrationen i plasma vid hantering i rumstemperatur och förvaring i kylskåp vid 4 °C i förhållande till plasma som hanterats enligt gällande rekommendationer? Hur mycket minskar ACTH-koncentrationen i plasma vid hantering och förvaring i rumstemperatur i förhållande till plasma som hanterats enligt gällande rekommendationer?

## LITTERATURÖVERSIKT

I detta kapitel presenteras bakgrund till studien samt aktuell forskning på området.

### Hypotalamus och hypofysen

Hypotalamus är det endokrina systemets och det autonoma nervsystemets regulatoriska centrum. Information från individens interna- och externa miljö bearbetas här och utifrån denna regleras känslor och beteenden. Hypofysens utsöndring av hormoner styrs från hypotalamus och detta gör att den till stor del styr det endokrina systemet. (Sjaastad, 2003)

Hypofysens funktion är att genom produktion och utsöndring av hormoner upprätthålla homeostas i kroppen. Den består av två strukturer; adenohipofysen och neurohipofysen. Neurohipofysen är en del av det centrala nervsystemet och saknar hormonproducerande celler, hormonerna som utsöndras ifrån denna produceras i hypotalamus. Adenohipofysen består till stor del av endokrina celler som producerar och frisätter hormoner. Adenohipofysen består av tre funktionella enheter; pars distalis, pars intermedia och pars infundibularis. (Sjaastad, 2003)

### Binjuren

Binjuren består av två separata endokrina körtlar, kortex och medulla. I kortex produceras steroidhormoner och i medulla, som är en del av det autonoma nervsystemet, produceras katekolaminer. (Sjaastad, 2003) Kortex utgör ett yttre lager runt om medulla och består av tre olika zoner; zona glomerulosa, z. fasciculata och z. reticularis. I z. glomerulosa produceras och utsöndras mineralokortikoider, varav aldosteron är den som har störst klinisk betydelse. I z. fasciculata produceras och utsöndras glukokortikoider, varav kortisol har den största kliniska betydelsen. I z. reticularis produceras och utsöndras androgener och i viss mån även glukokortikoider. (Kaneko *et al.*, 2008)

### Aldosteron

Aldosteron styr natrium-, kalium- och vattenbalansen i kroppen via njurarna. Aldosteron binder till mineralokortikoidreceptorer framför allt i njuren, men även i colon och svett- och spottkörtlar. Vid bindning stimuleras insertion av natriumkanaler, framför allt i distala njurtubuli, Na/K-pumpar i samlingsrören stimuleras och antalet öppna K-kanaler ökar. När aldosteron ökar återtas natrium- och kloridjoner i kroppen, och kalium- och vätejoner utsöndras (Feldman & Nelson, 2004). Sekundärt till retentionen av natrium absorberas vatten vilket gör att extracellulärvätskans volym ökar. (Kemppainen & Behrend, 1997) Regleringen av binjurens produktion och sekretion av aldosteron sker främst via renin-angiotensinsystemet (RAAS) och angiotensin II samt kaliumkoncentration i extracellulärvätskan. RAAS huvudfunktion är att upprätthålla extracellulärvätskans volym genom att påverka natriumresorptionen. När blodtryck eller blodvolym sjunker stimuleras cellerna i juxtaglomerulära apparaten som frisätter renin. Renin verkar på angiotensinogen som i flera steg konverteras till angiotensin II som ökar frisättningen av aldosteron från binjurekortex (Feldman & Nelson, 2004). Kaliumkoncentrationen stimulerar sannolikt frisättning av aldosteron genom att kalium orsakar en depolarisering av cellmembranet på aldosteronproducerande celler. Vid depolarisering öppnas Ca<sup>2+</sup> kanalerna, och intracellulärt Ca<sup>2+</sup> ökar och aldosteronsyntesen stimuleras. (Kemppainen & Behrend, 1997; Sjaastad, 2003; Feldman & Nelson, 2004)

### Kortisol

Kortisol påverkar i stort sett alla kroppens vävnader och är ett av de viktigaste hormonerna som frisätts vid stress. Kortisol är nödvändigt för upprätthållandet av normalt blodtryck och

blodvolym. Det har en viktig roll i kolhydratmetabolismen där det genom att öka lipolys, proteinkatabolism och glukoneogenesen samt minska det perifera utnyttjandet av glukos upprätthåller normoglykemi. (Kemppainen & Behrend, 1997). Kortisol har även en inflammationshämmande effekt, vid höga koncentrationer hämmas lymfoid vävnad, produktion av antikroppar och transport av leukocyter till skadad vävnad. (Sjaastad, 2003)

Utsöndringen av kortisol från binjurekortex styrs av adrenokortikotrop hormon (ACTH) som frisätts från adenohipofysen vid en ökad utsöndring av corticotrop releasing hormone (CRH) från hypotalamus. Stress, smärta, feber och hypovolemi är några av de viktigaste faktorerna för ökad frisättning av CRH och ACTH. Kortisol i sin tur utövar negativ feedback på utsöndringen av både ACTH och CRH och dämpar dessa. Detta sker dels genom snabba förändringar i kortisolnivåerna, dels genom den absoluta kortisolnivån i blodet (Kemppainen & Behrend, 1997; Feldman & Nelson, 2004).

### **Hypoadrenocorticism**

Hypoadrenocorticism uppstår när binjuren inte klarar av att producera aldosteron och/eller glukokortikoider i tillräcklig mängd för att möta kroppens behov. Det finns flera etiologier som kan ge upphov till hypofunktion i binjurebarken. (Kintzer & Peterson, 1997; Kaneko *et al.*, 2008) De kan delas in i primära och sekundära orsaker.

Primär hypoadrenocorticism är vanligast och orsakas oftast av en immunmedierad nedbrytning av samtliga tre lager av binjurekortex. En primär skada på binjurekortex kan också orsakas av neoplasier, svampinfektioner, amyloidos, trauma eller koagulopatier vid t ex. trauma eller warfarinförgiftning. (Feldman & Nelson, 2004). Nedbrytningen kan även vara iatrogen så som vid behandling av hyperkortisolism med trilostan. Binjuren påverkas ofta bilateralt och nedbrytningen/skadan leder till hypoaldosteronism och hypokortisolism när zona glomerulosa och zona reticularis bryts ned. När ca. 85-90% av vävnaden har brutits ned börjar sjukdomstecken uppstå. (Feldman & Nelson, 2004; Kaneko *et al.*, 2008) I vissa fall sker nedbrytningen av zona fasciculata först i sjukdomsförloppet, vilket ger upphov till enbart hypokortisolism. Aldosteronutsöndringen är fortsatt normal under en tid vilket medför att även elektrolytvärdena är oförändrade. När nedbrytningen drabbar zona glomerulosa kan elektrolytrubbningar uppstå, det kan ta dagar till månader efter att sjukdomstecken uppstår som följd av hypokortisolism. (Kintzer & Peterson, 1997)

Sekundär hypoadrenocorticism uppstår till följd av minskad ACTH-utsöndring från hypofysen. Detta kan orsakas av nedbrytande processer såsom neoplasier, inflammationer eller blödningar i hypotalamus och/eller i hypofysen som gör att CRH och ACTH, eller enbart ACTH beroende på skadans lokalisering, inte kan utsöndras i tillräcklig mängd. (Feldman & Nelson, 2004). Minskad ACTH-sekretionen kan även ha iatrogen bakgrund. Den vanligaste iatrogena orsaken är kortisonbehandling som ger en negativ feedback på utsöndringen av CRH och ACTH, men även hypofysektomi vid behandling av hyperadrenocorticism minskar av ACTH. (Hanson *et al.*, 2006; Kaneko *et al.*, 2008) Vid inhibering av ACTH atrofierar de glukokortikoidproducerande zonerna i binjuren vilket ger upphov till hypokortisolism. Vid sekundär hypoadrenocorticism uppträder enbart hypokortisolism. Aldosteronutsöndringen är opåverkad och elektrolytnivåerna hos dessa patienter är därför normala. (Feldman & Nelson, 2004)

Vid hypoadrenocorticism är sjukdomstecknen och de kliniska fynden ofta vaga och ospecifika på grund av att många olika organsystem påverkas av tillståndet. Sjukdomsförloppet kan vara snabbt fortskridande eller långsamt med intermittenta sjukdomstecken. Generellt sett är förloppet kroniskt men i vissa fall söker djurägaren vård i ett skede där sjukdomen har

akutiserats. En akutisering av sjukdomen kan ske om hunden utsätts för stress, om natriumintaget via fodret minskar eller om natriumutsöndringen i njurarna ökar. (Peterson *et al.*, 1997; Feldman & Nelson, 2004)

Det vanligaste sjukdomstecknet som djurägare uppger i anamnesen är nedsatt/förlust av aptit. Andra tecken som rapporterats är hängighet, svaghet, kräkningar/regurgitation, viktnedgång, diarré, polyuri/polydipsi, skakningar, kollaps, blodiga kräkningar, blodig avföring, njursvikt, ataxi, krampanfall och andningssvårigheter. (Peterson *et al.*, 1996; Peterson & Kintzer, 1997; Feldman & Nelson, 2004) Vid den kliniska undersökningen är de flesta hundarna dehydrerade, CRT är förlängd, de har svag puls, hypotermi, bradykardi, buksmärta och vissa är i chock. Den primära formen ger ofta upphov till klassiska elektrolytrubbningar; hyperkalemi, hyponatremi, hypokloremi och minskad natrium/kalium-kvot. (Peterson *et al.*, 1996; Feldman & Nelson, 2004)

Vid misstanke om hypoadrenocorticism görs en ACTH-stimulering som testar binjurebarkens förmåga att producera och utsöndra glukokortikoider. Metoden innebär att kortisolnivån i blodet mäts före- och 60 minuter efter injektion av syntetiskt ACTH. Kortisolnivåerna innan och efter stimuleringen jämförs för att utvärdera om binjuren klarar att svara på tillförsel av ACTH. Vid hypoadrenocorticism är kortisolreserverna i binjurekortex mindre än normalt och binjuren klarar inte av att svara fullt ut på maximal stimulering, kortisol ligger därför fortsatt lågt efter 60 minuter. (Kintzer & Peterson, 1997; Feldman & Nelson, 2004)

Vid ACTH-stimuleringen mäts dock inte aldosteron och metoden kan därför inte differentiera mellan primär- och sekundär hypoadrenocorticism. Sjukdomstecken, kliniska fynd och blodbild kan vid de två formerna vara mycket likartade. Vid primär hypoadrenocorticism kan elektrolytnivåerna i vissa fall vara normala, och vid sekundär kan natriumnivåerna vara låga. (Peterson *et al.*, 1996; Kintzer & Peterson, 1997; Adler *et al.*, 2007; Thomson *et al.*, 2007).

Vid behandling av akut hypoadrenocorticism är målet att korrigera hypovolemi, hypotension, elektrolyt- och syra-basrubbningar samt att ersätta kortikosteroider. Vid ett kroniskt förlopp är målet med behandlingen att ersätta mineral- och glukokortikoider. Hundar med primär hypoadrenocorticism och elektrolytrubbningar behandlas med både mineral- och glukokortikoider resten av livet. Hundar med normala elektrolytnivåer har antingen en primär form i ett tidigt skede, eller sekundär hypoadrenocorticism. Hundar med den sekundära formen behöver inte behandlas med mineralkortikoider eftersom de enbart har brist på glukokortikoider. Hos hundar som inte har fått elektrolytrubbningar ännu ska elektrolyterna övervakas om inte mineralkortikoider sätts in initialt, så att de kan sättas in vid behov. (Melián & Peterson, 1996; Peterson *et al.*, 1996)

## **ACTH**

För att utreda bakomliggande orsak till hypokortisolism kan endogent ACTH mätas. Vid primär hypoadrenocorticism förväntas ACTH-koncentrationen vara extremt högt eftersom hypokortisolismen gör att det inte sker någon feedbackinhibering av hypotalamus och hypofysen. Normal till låg ACTH-koncentration tyder på en dysfunktion i hypofysen eller hypotalamus som medför att ACTH inte utsöndras i tillräcklig mängd, dvs. hypoadrenocorticismen är sekundär till en underproduktion av ACTH, vilket gör att binjuren efter en tid atrofierar. (Peterson & Kintzer, 1997; Talbot *et al.*, 2003; Kaneko *et al.*, 2008)

ACTH kan även mätas vid utredning av bakomliggande orsak till hyperadrenocorticism. Normal till hög plasmakoncentration av ACTH (>20) indikerar ett överskott av ACTH, i regel orsakat av hypofysberoende hyperadrenocorticism. Icke-mätbar till normal koncentration av ACTH indikerar att det finns en överproduktion av kortisol i binjurebarken, vanligen orsakat

av neoplastiska förändringar, som ger en feedback-inhibering på hypofysen. (Kaneko *et al.*, 2008)

### **Svårigheter vid mätning av ACTH**

ACTH-molekylen elimineras från blodet på grund av proteaser som snabbt bryter upp dess bindningar och anses därför vara instabilt i plasma och helblod både hos hund och människa. (Ellis *et al.*, 2003; Feldman & Nelson, 2004; Reish *et al.*, 2007) Den biologiska halveringstiden hos människa anses vara 25 minuter och halveringstiden i plasma är 197-286 minuter och i helblod 44-70 minuter. I vissa fall sker nedbrytningen ännu snabbare. (Talbot *et al.*, 2003). Hemolys påverkar den mätbara mängden ACTH negativt, och så lite som 0,1% hemolys i provet kan ge en signifikant förlust av ACTH. (Livesey & Dalamore, 2010) På grund av detta rekommenderas specialhantering av prover där ACTH ska analyseras. (Evans *et al.*, 2001; Talbot *et al.*, 2003; Livesey & Dalamore, 2010).

### **Provhantering vid ACTH-mätning**

Vid provtagning inför ACTH-analys rekommenderas, både för prover tagna från hund och människa, att proverna tas i ett kylt EDTA-rör och placeras på is omedelbart efter provtagningen. Därefter ska blodet centrifugeras i en kylcentrifug där temperaturen inte får överstiga 4 °C. Efter centrifugeringen ska provet analyseras omedelbart eller placeras i ett polypropylenrör och frysas in vid -80 °C fram till analysen. Om proverna ska transporteras ska de hållas nedfrysna med hjälp av is i en frigolitbehållare (Hegstad *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 2001). Livesey & Dalamore (2010) har studerat stabilitet hos ACTH från människa och menar att snabb nedkylning med is/vatten under 15-30 minuter efter provtagning minskar ACTH-förlusterna jämfört med omedelbar centrifugering av blodet. Efter centrifugeringen rekommenderas att plasman inte hanteras i rumstemperatur mer än 15 minuter innan analys (Livesey & Dalamore, 2010).

### **Stabilitet hos ACTH**

International standard organisation har definierat stabilitet som förmågan hos ett prov att upprätthålla det initialt uppmätta värdet inom vissa fastslagna gränser, under en viss tid och vid specificerade lagringsförhållanden. (ISO Guide 30, 1992, se Ellis *et al.*, 2001). Inom humanmedicinen anses ACTH enligt denna standard vara stabilt tills koncentrationen minskat till 90 % av det ursprungliga värdet. (Ellis *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2001)

Resultatet vid mätningar av ACTH-koncentrationen påverkas i hög grad av hur proverna har hanterats (Hegstad *et al.*, 1994) Ett flertal olika faktorer påverkar hur snabbt molekylen bryts ner, de viktigaste faktorerna är tiden mellan provtagning och centrifugering, förvaringstid efter centrifugering och förvaringstemperatur (Kemppainen *et al.*, 1994). Andra faktorer som har undersökts i olika studier är typ av antikoagulantia i provröret, användandet av proteashämmare och temperatur innan- och under centrifugering.

Stabiliteten hos ACTH i plasma från hund har studerats av Kemppainen *et al.* (1994), i denna studie hade förvaringstid och förvaringstemperatur störst påverkan på reduceringen av mätbart ACTH. Livesey & Dalamore (2010) har i sin studie sett att ACTH från människa snabbt bryts ner i helblod vid rumstemperatur och nedbrytningen ökar ytterligare om det finns hemolys i provet. Reish *et al.* (2007) har dock i en studie sett att ACTH från människa kan vara stabilt i rumstemperatur i helblod i 18-24 timmar. Ellis *et al.* (2003) redovisar att ACTH är stabilt i helblod vid förvaring i rumstemperatur i 17 timmar och i kyl i 19 timmar.

Temperaturen under centrifugeringen (4- eller 22 °C) har ingen- till liten påverkan på ACTH-koncentrationen i prover från hund om analysen görs omedelbart efter centrifugering, eller om

nedbrytningen tillfälligt stoppas genom nedfrysning till 86 °C innan analys. (Kemppainen *et al.* 1994) I en studie som Wood *et al.*, (1974) (se Hegstad *et al.* (1994)) genomförde fanns ingen signifikant skillnad i ACTH-koncentration i prover från hund mellan prover som var insamlade i förkylda rör och som hanterats vid 4 °C jämfört med prover som hanterats i rumstemperatur och centrifugering upp till 90 minuter efter att blodprovstagning. Scott-Moncrieff *et al.* (2003) har i sin studie, även den på prover från hund, kommit fram till liknande resultat. Skillnaden mellan prover som samlats in och hanterats på is och förvarats vid -86 °C och prover som hanterats i rumstemperatur och därefter lagrats vid 0 °C i 9 dagar var relativt liten.

Tiden från provtagning till centrifugering har också betydelse för stabiliteten hos ACTH i prover från hund. I prover som centrifugeras relativt omgående kommer mängden mätbart ACTH inte minska lika snabbt som provet förvaras som helblod och centrifugeras i anslutning till analys. Skillnaden vid förvaring i rumstemperatur är signifikant redan efter en timme och vid förvaring i kyl efter två timmar. (Kemppainen *et al.*, 1994)

Reish *et al.* (2007) har undersökt stabiliteten hos ACTH i prover från människa och menar att tiden från provtagning till centrifugering har större betydelse för stabiliteten än förvaringstemperaturen. Ett prov som har centrifugerats omedelbart minskar till 90 % efter 31 timmar vid förvaring i rumstemperatur och ett prov som förvaras som helblod minskar till 90 % efter 24 timmar vid förvaring i kyl (Reish *et al.*, 2007).

Perkins *et al.* (2002) har undersökt stabiliteten hos ACTH i helblod från häst som förvaras kylt. I denna studie fanns ingen signifikant skillnad i ACTH-koncentration mellan prover som förvarats under 2-, 4- och 8 timmar.

Vid en längre tid förvaring i fryskyl vid -20 °C har Wood *et al.* (1974) (Hegstad *et al.*, 1994) visat att det inte fanns någon skillnad i ACTH-koncentration i plasma från hund som förvarats vid -20 °C under en vecka jämfört med en månad. Vid förvaring i 6 månader var dock skillnaden signifikant jämfört med en veckas förvaring. Efter tre veckors förvaring vid -20 °C är skillnaden mot omedelbar analys signifikant, men att ACTH är stabilt upp till 2 år vid -70 °C.

Perkins *et al.* (2002) undersökte även hur ACTH-koncentrationen hos häst påverkas vid upprepade omfrysningar till -20 °C, och slutsatsen var att ACTH-koncentrationen inte påverkas av att proverna tinas upp tre gånger och fryses ned under sex timmar däremellan.

Scott-Moncrieff *et al.* (2003) har också undersökt stabiliteten hos ACTH i prover från hund vid längre tids förvaring i kyl vid 4 °C. I prover som samlats in och hanterats i rumstemperatur och förvarats vid 4 °C under nio dagar minskade mängden ACTH kraftigt. Kemppainen *et al.* (1994) undersökte hur ACTH i plasma minskade under förhållanden som skulle efterlikna den kliniska verksamheten. Proverna hanterades i rumstemperatur och förvarades vid 4 °C under två dagar, därefter skickades de tillsammans med kylklampor till lab. ACTH-koncentrationen minskade då med 57 +/- 16 % i proverna. (Kemppainen *et al.*, 1994) En lägre enzymaktivitet vid lägre temperaturer är sannolikt förklaringen till att ACTH bryts ner snabbare vid högre temperaturer (Ellis *et al.*, 2003).

Inom humanmedicinen finns flera studier, med olika resultat, över hur stabilt ACTH i plasma är vid förvaring i kyl. Oddeze *et al.* (2012) menar att det är stabilt i 24 timmar vid förvaring i kyl. Evans *et al.* (2001) har i sin studie visat att ACTH-koncentrationen minskar mer än 10 % efter 18 timmars förvaring i kyl.

Perkins *et al.* (2002) har undersökt stabiliteten hos ACTH i helblod från häst som förvaras kylt. I denna studie fanns ingen signifikant skillnad i ACTH-koncentration mellan prover som förvarats under 2-, 4- och 8 timmar.

Inom humanmedicinen anses ACTH vara stabilt i 1-4 timmar i rumstemperatur (Odoze *et al.*, 2012). Evans *et al.* (2001) har visat att förvaring i rumstemperatur (30 °C) i 24 timmar har en signifikant negativ påverkan på ACTH-koncentrationen, då den hade minskat med 72 %. Efter 8 timmars förvaring i rumstemperatur minskade ACTH-koncentrationen till 90 %, och utifrån det resultatet anses ACTH vara stabilt i upp till 8 timmar i rumstemperatur. (Evans *et al.*, 2001) Reish *et al.* (2007) menar att ACTH i plasma kan vara stabilt i rumstemperatur i 18-24 timmar och att kylning har liten effekt på stabiliteten.

### **Tillsats av proteasinhäbitor**

Kemppainen *et al.* (1994) har visat att dessa strikta hanteringsregler i viss mån kan frångås vid provtagning på hund genom att en proteasinhäbitor – aprotinin tillsätts i provet, då den i viss mån motverkar minskningen av mätbart ACTH. Den enda signifikanta minskningen hos prover där aprotinin tillsatts kunde ses efter fyra dagars förvaring vid 22 °C. I plasma utan tillsatt aprotinin sker en progressiv minskning av ACTH under förvaring, och minskningen ökar med förvaringstemperaturen. Vid tillsats av aprotinin kan prover skickas ofrysta i isolerad förpackning tillsammans med frysta kylklampor och analysen kan göras dagen efter provtagningen utan att ACTH-koncentrationen påverkas. I Kemppainens studie analyserades proverna i en radioimmunoassay (RIA). I en jämförande studie (Scott-Moncrieff *et al.*, 2003) mellan RIA och kemiluminescent immunometrisk assay (ILMA) minskade mängden mätbart ACTH i prover som analyserades med ILMA där aprotinin tillsatts, men var oförändrad vid analysen med RIA.

### **Antikoagulantia**

Evans *et al.* (2003) har studerat effekten av olika antikoagulantia på ACTH-koncentrationen i prover från människa. Vid provtagning i heparinrör minskade mängden mätbart ACTH med 74 % jämfört med serumrör och flouridrör där det inte blev någon signifikant minskning av ACTH-koncentration jämfört med prover tagna i EDTA-rör vid omedelbar nedfrysning till -20 °C.

### **Hemolys**

Hemolys påverkar den mätbara mängden ACTH negativt, och så lite som 0,1% hemolys i provet kan ge en signifikant förlust av ACTH i prover från människa. Ju högre grad av hemolys desto snabbare bryts ACTH ner i proverna. (Livesey & Dalamore, 2010)

### **Förhöjd ACTH-koncentration**

Reish *et al.* (2006) har undersökt hur ACTH-koncentrationen minskar i prover från humanpatienter med förhöjda ACTH-nivåer på grund av sjukdom och kommit fram till att det inte finns någon skillnad i genomsnittlig tid för minskningen och medelhastighet i förändringar i prover med höga ACTH-nivåer mot prover med ACTH inom referensvärdet.

### **Referensvärden ACTH hos hund**

Peterson *et al.* (1996) analyserade ACTH hos hundar med primär hypoadrenocorticism och ACTH-koncentrationen hos hundarna i studien låg mellan 44 och 1254 pmol/L. Medianen var 275 och kvartilavståndet var 151-528 pmol/L. Ingen av hundarna hade ACTH nivåer som överlappade värden från friska hundar (2,2-20 pmol/L). Hundar med sekundär

hypoadrenocorticism hade i samma studie lågt ACTH, mellan 1 och 2 pmol/L, eller under detektionsgränsen.

### **ACTH-analys vid hyperkortisolism hos häst**

Vid misstanke om hyperkortisolism hos häst används ACTH-mätning i allt högre utsträckning. Nedbrytningen av ACTH sker inte lika snabbt som man tidigare ansett och om proverna kyls eller fryses ner inom några timmar efter provtagning sker endast en obetydlig nedbrytning. (Rendle, 2013). Perkins *et al.* (2002) har visat att prover från häst kan förvaras i kyl upp till 8 timmar innan centrifugering om proverna tas i ett EDTA-rör, och att plasma kan frysas ned upprepade gånger under ett dygn utan att ACTH-koncentrationen påverkas (Perkins *et al.*, 2002). Även vid förvaring av plasma i rumstemperatur under 24-48 timmar är nedbrytningen måttlig. (Rendle D 2013 (Rendle *et al.*, 2012) Enligt nya riktlinjer från Equine endocrinology group och PPID working group gällande diagnostik vid misstanke om hyperkortisolism hos häst bör ACTH-analys användas istället för ACTH-stimulering, vilokortisol-test, urin- eller salivkortisol. Proverna ska hållas nedkylda med is eller liknande vid förvaring och centrifugeras innan de skickas till lab. När de skickas ska de förpackas tillsammans med en ispåse för att de ska hålla sig nedkylda längre. Proverna behöver inte frysas ned. <http://sites.tufts.edu/equineendogroup/files/2013/11/EEG-recommendations-downloadable-final.pdf> 2013-12-06



## **MATERIAL OCH METODER**

Nedan redovisas vilka hundar som har ingått i studien, pilotstudie, provtagningsschema samt analysmetod.

### **Urval**

De hundar som ingick i studien var patienter som av olika anledningar sökte vård på Universitetsdjursjukhuset under perioden 2013-09-09 – 2013-10-29. Djurägarna informerades om studien och tillfrågades inför blodprovstagning för utredning av hundens sjukdom om extra blod fick tas för att användas i studien. I studien ingick både patienter som förväntades ha normala ACTH-nivåer och patienter som förväntades ha höga ACTH-nivåer. Eftersom 9 ml blod skulle samlas exkluderades hundar som vägde mindre än 15 kg från urvalet. Proverna skulle i möjligaste mån tas på måndagar under förmiddagen för att så många av analyserna som möjligt skulle kunna genomföras.

### ***Etiskt tillstånd***

Studien sker inom ramen för projektet hundhälsa som har ett godkänt etiskt tillstånd (Dnr C2/12, prof. Jens Häggström, SLU).

### **Studiedesign**

Utifrån tidigare studier på hållbarheten hos ACTH och den förväntade stabiliteten hos ACTH samt utifrån de praktiska förhållanden som förväntas råda när kliniker ska skicka prover till ett laboratorium för analys togs ett arbetsschema för provtagning och hantering fram.

### **Arbetsschema**

I detta avsnitt redovisas hur det praktiska arbetet har lagts upp i studien, två arbetsscheman redovisas i figur 1 och figur 2.

Lämpliga kandidater som söker vård på Universitetsdjursjukhuset identifierades. Hundar som kunde tas med i studien skulle väga över femton kilo och det skulle tas blodprover på dem inom ramen för veterinärbesöket.

Provtagning: Blodprovet togs i v. cephalica med en vacutainer och ett förkyllt 9 ml förkyllt EDTA-rör. Provröret placerades omedelbart på is i en frigolitbehållare som det även transporterades i till laboratoriet.

Från det förkyllda EDTA-röret pipetterades 6 ml helblod över till ett rumstempererat plaströr. Cirka 3 ml helblod lämnades kvar i EDTA-röret. Detta skedde inom 15 minuter efter provtagning.

Provröret hanterades enligt följande:

EDTA-röret centrifugerades i en kylcentrifug i 15 minuter. Plasman pipetterades därefter över till fem förkyllda plaströr (200-250 mikroliter plasma i varje rör). Ett av proverna, 0-provet, analyseras omedelbart. Samtliga av 0-proven i studien analyserades inom en timme efter provtagning. De övriga proverna i plaströren lagrades i frys (-20 °C) fram tills att de tinades upp i kylskåp inför analys som skedde 24-, 48- och 72 timmar efter att 0-provet analyserats.

Det rumstempererade röret centrifugerades i rumstemperatur under fem minuter och därefter pipetterades 200 mikroliter över till ett plaströr och analyserades omgående. De prov som analyserades omgående analyserades inom en timme efter provtagning och 20-30 minuter

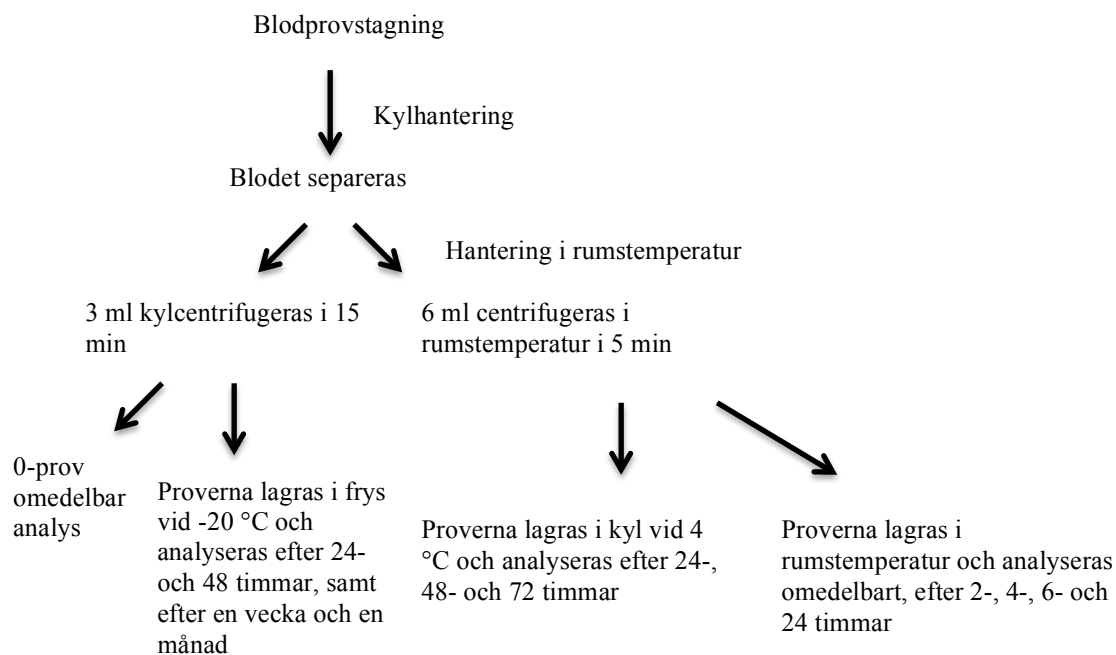
efter att de pipetterats över från det förkylda röret. Den resterande plasman fördelades lika mellan två plaströr för lagring. Det ena förvarades i rumstemperatur i mörker och det andra förvarades i kyl vid 4 °C.

Provet som förvarades i rumstemperatur analyserades två-, fyra-, sex- och 24 timmar efter att 0-provet analyserats, om det var möjligt utifrån arbetstiderna på laboratoriet. Inför analysen pipetterade laboratoriepersonalen 200-250 mikroliter plasma från lagringsröret till ett mindre analys-rör.

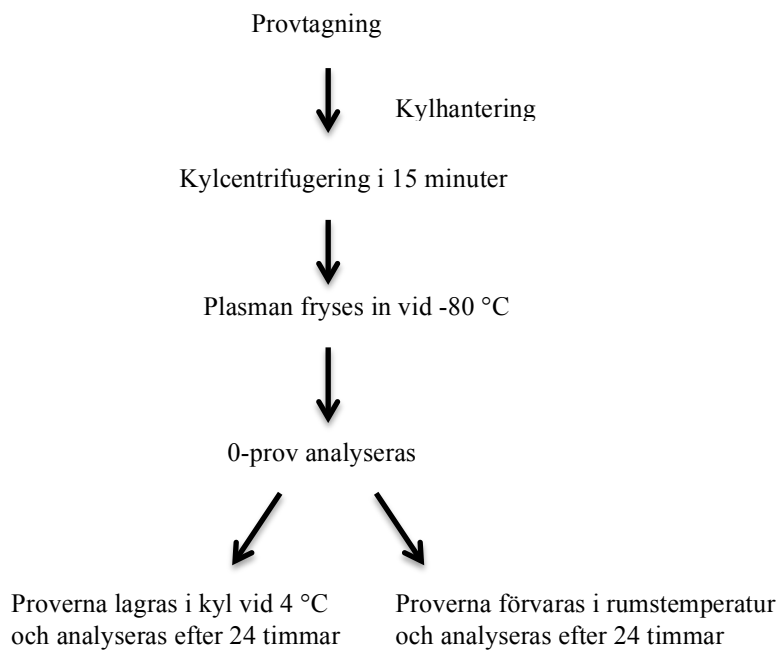
Provet som förvaras i kylskåp (4 °C) analyserades 24,- 48- och 72 timmar efter att 0-provet analyserats, om det var möjligt utifrån labbets arbetstider. Laboratoriepersonalen pipetterade 200-250 mikroliter från lagringsröret till ett mindre analys-rör innan analyserna genomfördes.

För att även få några prover med hög ACTH-koncentration inkluderades plasma från två hundar med konstaterad hypoadrenocorticism där proverna hanterats enligt gällande rekommendationer (Hegstad et. al. 1990) i studien. Efter centrifugeringen förvarades plasman i frys vid - 80 C för att nedbrytningen av ACTH tillfälligt skulle stoppas. Proverna tinades upp, späddes med plasma 1:1 och analyserades omgående (0-prov) därefter förvarades de i kyl respektive rumstemperatur i mörker under 24 timmar för att sedan återigen analyseras avseende ACTH-mängd.

0-provet som hanterats enligt nuvarande rekommendationer, dvs. förkylda provrör, hantering på is, kylcentrifugering och analys snarast möjligast efter provtagningen, användes som kontroll i studien. De övriga resultaten jämförs med detta värde för att studera hur mycket ACTH-koncentrationen påverkas efter en tids förvaring.



Figur 1. Arbetschema för prover med normal ACTH-koncentration.



Figur 2. Arbetschema för prover med hög ACTH-koncentration.

## **Analysmetod**

Alla prover analyserades på klinisk kemiska laboratoriet vid Universitetsdjursjukhuset. ACTH-koncentrationen analyserades med Immulite 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics). Immulite 2000 är en chemiluminescent immunoassay som använder polyklonala antikroppar som är riktade mot 1-24 N-terminalregionen på ACTH- molekylen för att kvantifiera ACTH-koncentrationen. Metoden och reagenset är framtaget för analys av ACTH-koncentrationen hos människa, men metoden fungerar även för ACTH i prover från hund (Scott-Moncrieff *et al.*, 2003). Mätområdet är 1,1 – 275 pmol/l. Inomkörningsvariationen var ca 6,2 % vid ett medelvärde på 3,4.

## **RESULTAT**

Nedan redovisas resultaten från ACTH-analyserna samt bortfallet i undersökningen. De prover där ACTH till en början var mätbart men som minskade till nivåer under detektionsgränsen (<1,1 pmol/L) efter en tids förvaring redovisas som värdet 1,0 i resultatredovisningen.

### ***Signalement***

I studien ingick 10 hundar av följande raser: Två stycken labrador retriever, en engelsk springer spaniel, en rottweiler, en korthårig vorsteh, en bearded collie, en border collie, en mellanpudel och två stycken blandrashundar. Åldern på hundarna var mellan 1 och 10 år. Könsfördelning: 5 tikar och fem hanhundar. Orsaker till vårdkontakt: slöhet och svimningar, buksmärta, inappetens, återbesök för proteinuri, knöl på benet, corp al, blödning från nosen, inappetens, förgiftning, samt en frisk hund

### ***Bortfall***

Två av hundarna som ingick i undersökningen hade ACTH-koncentration under detektionsgränsen vid analysen av 0-provet, inga ytterligare analyser gjordes på proverna från dessa hundar och de exkluderades ur studien.

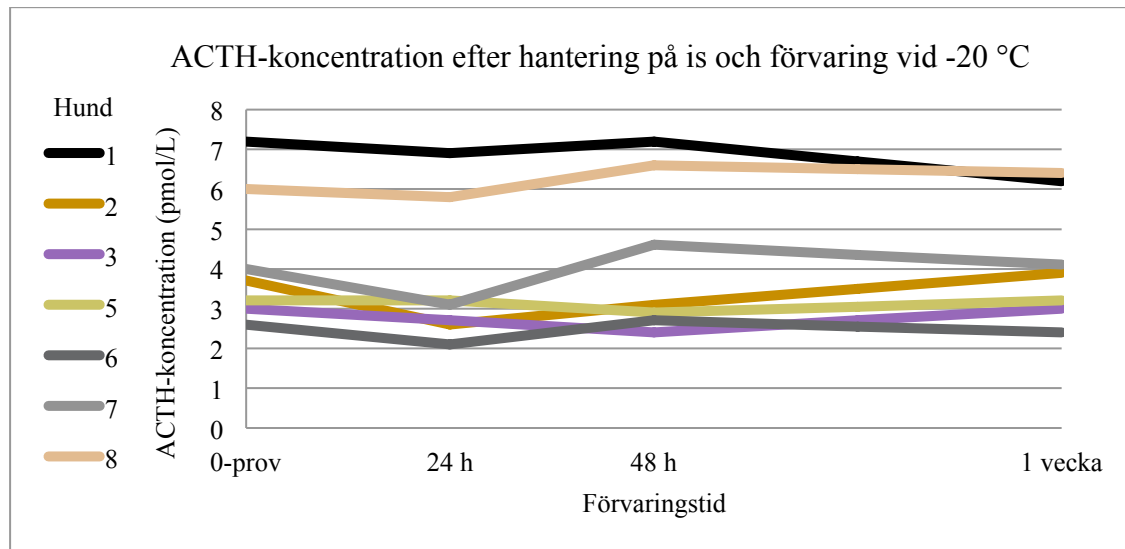
På grund av laboratoriets arbetstider föll ett flertal analystillfällen bort. Endast två av de prover som förvarades i rumstemperatur kunde analyseras efter sex timmar på grund av detta. Resultatet från dessa två analyser exkluderas från studien eftersom antalet är för litet för att slutsatser ska kunna dras från resultatet.

Vid ett par tillfällen tog analysinstrumentet inte emot proverna som då automatiskt kasserades.

En av hundarna hade 1,9 pmol/L i 0-provet, analysresultaten på proverna från denna hund pendlande mellan att ligga över och under detektionsgränsen vid de olika analyserna. Även denna hund exkluderades ur studien då minskningen av ACTH-koncentrationen mellan olika mätningar inte kan redovisas.

## Hantering på is och förvaring i frys

I figur 3 och tabell 1-2 redovisas ACTH-koncentrationen i respektive prov efter hantering enligt gällande rekommendationer, dvs. analys direkt efter transport på is och kylcentrifugering, samt förvaring i frys vid  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  under 24 timmar, 48 timmar och en vecka.



Figur 3. ACTH-koncentration vid hantering på is och förvaring vid  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Alla åtta proverna i den första delen av studien hade normala ACTH-koncentrationer (2,6-7,2 pmol/L). Vid förvaring i frys 24-, 48 timmar respektive en vecka sågs relativt små förändringar av koncentrationen. Vid några analyser visades en ökad ACTH-koncentration i förhållande till föregående analys. En ökning av ACTH-koncentrationen markeras med prefixet + i tabellen med procentuella förändringar över tid. Förändringarna var mindre än 1 pmol/L för alla prover utom ett (hund 2 efter 24 h), och låg mellan 0 och 1,1 pmol/L.

Tabell 1. ACTH-koncentration 0-prov samt efter förvaring vid  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (pmol/L)

Hund	0-prov	24h	48h	1 v.
1	7,2	6,9	7,2	6,1
2	3,7	2,6	3,1	3,9
3	3,0	2,7	2,4	3,0
5	3,2	3,2	2,9	3,2
6	2,6	2,1	2,7	2,4
7	4,0	3,1	4,6	4,1
8	6,0	5,8	6,6	6,4

Uttryckt i procent blir den genomsnittliga minskningen av ACTH-koncentrationen 13 % (min-max 0-30 %) efter 24 timmars frysförvaring. Efter 48 timmars frysförvaring var ACTH-koncentrationen högre än efter 24 h och hade i genomsnitt minskat med 2 % i förhållande till 0-proverna. Efter en veckas förvaring hade koncentrationen i genomsnitt minskat med 1 % i förhållande till 0-provet.

Om de prover som har ökat i förhållande till 0-proverna istället anges att de inte har minskat, dvs. en minskning på 0 i absoluta tal och en motsvarande minskning med 0 % i förhållande till 0-provet ändras resultatet vid förvaring under 48 timmar och en vecka. Efter 48 timmars förvaring minskar ACTH-koncentrationen i genomsnitt med 0,21 pmol/L vilket motsvarar 5

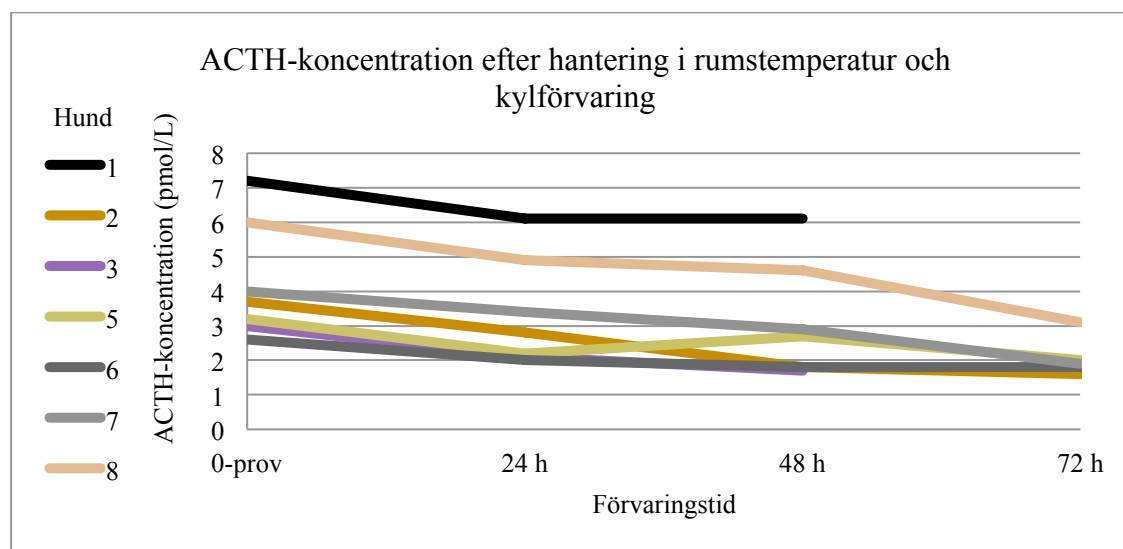
% . Efter en veckas förvaring är den genomsnittliga minskningen av ACTH-koncentrationen 0,19 pmol/L och 4 %.

Tabell 2. Förändring av ACTH-koncentrationen efter förvaring vid -20 °C (pmol/L)

Hund	Förändring e. 24 h		Förändring e. 48 h		Förändring e. 1 v.	
	pmol/L	%	pmol/L	%	pmol/L	%
1	-0,3	-4	0	0	-1,1	-15
2	-1,1	-30	-0,6	-16	+0,2	+5
3	-0,3	-10	-0,6	-20	0	0
5	0	0	-0,3	-9	0	0
6	-0,5	-19	+0,1	+4	-0,2	-8
7	-0,9	-23	+0,6	+15	+0,1	+3
8	-0,2	-3	+0,6	+10	+0,4	+7
Medelvärde	-0,5	-13	+0,03	+2	-0,12	-1

## Hantering i rumtemperatur och förvaring i kyl

I figur 4 och tabell 3 redovisas ACTH-koncentrationen i 0-provet samt i prover efter hantering i rumtemperatur och förvaring i kyl vid 4 °C under 24-, 48- och 72 timmar. I tabell 4 redovisas minskningen av ACTH-koncentrationen uttryckt i pmol/L och procent. I tabell 5 redovisas ACTH-koncentrationen i prover tagna från hundar med hypoadrenocorticism som hanterats enligt gällande rutiner med kylhantering och förvaring i frys vid -75 °C, samt ACTH-koncentrationen i dessa efter 24 timmars förvaring i frys vid 4 °C. I tabell 6 redovisas minskningen i ACTH-koncentrationen.



Figur 4. ACTH-koncentration vid hantering i rumtemperatur och kylförvaring.

Efter kylförvaring under 24 timmar hade ACTH-koncentrationen minskat med i genomsnitt 0,9 pmol/L (min-max 0,6-1,1 pmol/L)

Tabell 3. ACTH-koncentration efter förvaring vid 4 °C (pmol/L)

Hund	0-prov	24 h	48 h	72 h
1	7,2	6,1	6,1	
2	3,7	2,8	1,8	1,6
3	3,0	2,1	1,7	
5	3,2	2,2	2,7	2,0
6	2,6	2,0	1,8	1,8
7	4,0	3,4	2,9	1,92
8	6,0	4,9	4,6	3,13

Uttryckt i procent blir minskningen efter 24 timmar 23 % (min-max 15-31%). Efter 48- och 72 timmar är minskningen av ACTH-koncentrationen ännu mer påtaglig, i genomsnitt har den minskat med 30- respektive 45 %.



Tabell 4. *Förändring av ACTH-koncentrationen efter förvaring vid 4 °C (pmol/L och %)*

Hund	Förändring e. 24 h		Förändring e. 48 h		Förändring e. 72 h	
	pmol/L	%	pmol/L	%	pmol/L	%
1	1,1	15	1,1	15		
2	0,9	24	1,9	51	2,1	57
3	0,9	30	1,3	43		
5	1,0	31	0,5	16	1,2	38
6	0,6	23	0,8	31	0,8	31
7	0,6	15	1,1	28	2,08	52
8	1,1	18	1,4	23	2,87	48
Medelvärde	0,89	23	1,16	30	1,81	45

ACTH-koncentrationen i 0-proverna proverna från de två hundarna med hypoadrenocorticism låg över referensvärdet, och uppmättes till 257 respektive 144 pmol/L. Efter 24 timmar vid 4 °C hade ACTH-koncentrationen minskat med 11 respektive 40 pmol/L vilket motsvarar en minskning med 4 respektive 28 %. Den genomsnittliga minskningen var 16 %

Tabell 5. *ACTH- koncentration 0-prov efter förvaring vid 4 °C i 24 h (pmol/L och %)*

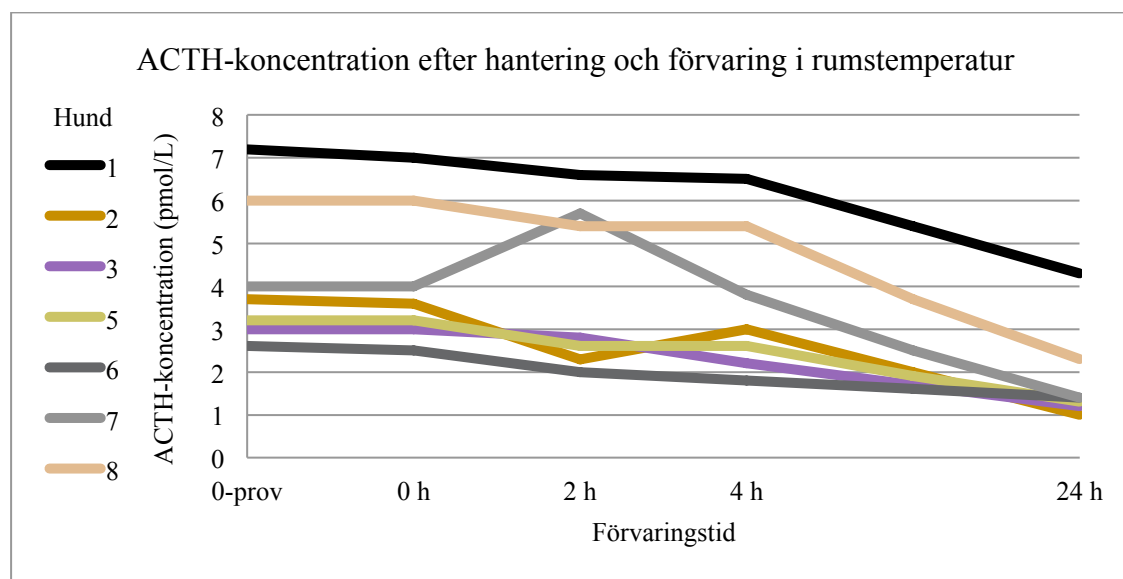
Hund	0-prov	Kyl 24 h
9	257	246
10	144	104
Medelvärde	200,5	175

Tabell 6. *Minskning av ACTH efter förvaring vid 4 °C (pmol/L och %)aa*

Hund	Minskning e. 24 h	
	pmol/L	%
9	11	4
10	40	28
Medelvärde	25,5	16

## Hantering och förvaring i rumstemperatur

I figur 5 och tabell 7 redovisas ACTH-koncentrationen i 0-provet samt i prover efter hantering och förvaring i rumstemperatur under 2-, 4-, och 24 timmar, samt för prov som analyserats omedelbart efter centrifugering i rumstemperatur (0 h). I tabell 8 redovisas minskningen av ACTH-koncentrationen. I tabell 9 redovisas ACTH-koncentrationen i prover tagna från hundar med hypoadrenocorticism som hanterats enligt gällande rutiner med kylhantering och förvaring i frys vid -75 °C, samt efter 24 timmars förvaring i rumstemperatur. I tabell 10 redovisas minskningen i ACTH-koncentrationen i dessa prover.



Figur 5. ACTH-koncentration vid hantering och förvaring i rumstemperatur.

I proverna som hanterades i rumstemperatur och analyserades omgående efter centrifugering var den genomsnittliga ACTH-koncentrationen något högre än i 0-provet som hanterats kylt. ACTH-koncentrationen i fyra av proverna var dock oförändrad i förhållande till respektive 0-prov.

I de båda prover som analyserades efter sex timmars förvaring i rumstemperatur (hund 3 och hund 6) var ACTH-koncentrationen 2,8 pmol/L.

Tabell 7. ACTH-koncentration 0-prov samt efter förvaring i rumstemperatur (pmol/L)

Hund	0-prov	0 h	2 h	4 h	24 h
1	7,2	7,0	6,6	6,5	4,3
2	3,7	3,6	2,3	3,0	1,0
3	3,0	3,0	2,8		1,2
5	3,2	3,2	2,6	2,6	1,3
6	2,6	2,5	2,0		1,4
7	4,0	4,0	5,7	3,8	1,4
8	6,0	6,0	5,4	5,4	2,3

Efter förvaring i rumstemperatur under två timmar minskade ACTH-koncentrationen med i genomsnitt 0,04 pmol/L (min-max +1,7 – 1,4 pmol/L) vilket motsvarar 9 % (min-max +43 – 38 %). Efter 4 timmars förvaring var minskningen i genomsnitt 0,12 pmol/L (min-max 0,2 – 0,7 pmol/L), uttryckt i procent motsvarar detta en sänkning med 12 % (min-max 5 – 19 %).

Efter ett dygn i rumstemperatur hade ACTH-värdet minskat med 2,54 (min-max 1,2 - 3,7 pmol/L) vilket motsvarar 62 % (min-max 40 – 100 %). Ett av proverna hade efter 24 timmar i rumstemperatur en ACTH-koncentration som låg under detektionsgränsen och minskningen anges därför som 100 %.

Tabell 8. *Förändring av ACTH-koncentrationen efter förvaring vid rumstemperatur (pmol/L och %)*

Hund	Förändring e. 0 h		Förändring e. 2 h		Förändring e. 4 h		Förändring e. 24 h	
	pmol/L	%	pmol/L	%	pmol/l	%	pmol/L	%
1	-0,2	-3	-0,6	-8	-0,7	-9	-2,9	-40
2	-0,1	-3	-1,4	-38	-0,7	-19	-3,7	-100
3	0	0	-0,2	-7			-1,8	-60
5	0	0	-0,6	-19	-0,6	-19	-1,9	-59
6	-0,1	-4	-0,6	-23			-1,2	-46
7	0	0	+1,7	+43	-0,2	-5	-2,6	-65
8	0	0	-0,6	-10	-0,6	-10	-3,7	-62
Medelvärde	-0,57	-1	-0,33	-9	-0,56	-12	-2,54	-62

ACTH-koncentrationen efter 24 timmar i rumstemperatur hos hundarna med hypoadrenocorticism minskade med 128 respektive 112,8 pmol/L vilket motsvarar 49,8 respektive 78 % i förhållande till 0-provet. I genomsnitt hade ACTH-koncentrationen minskat med 64 %.

Tabell 9. *ACTH- koncentration 0-prov efter förvaring vid rumstemperatur i 24 h (pmol/L och %)*

Hund	0-prov	Rumstemp 24 h
9	257	129
10	144	31,2
Medelvärde	200,5	80,1

Tabell 10. *Minskning av ACTH efter förvaring vid rumstemperatur (pmol/L och %)*

Hund	Minskning e. 24 h	
	pmol/L	%
9	128	50
10	112,8	78
Medelvärde	120,4	64

## DISKUSSION

Studiens syfte var att undersöka hur snabbt ACTH bryts ned vid olika temperaturer och olika förvaringstid. Vid förvaring i frys under en veckas tid skedde en obetydlig nedbrytning av ACTH i jämförelse med 0-provet. Vid förvaring i kyl bröts ACTH ned i högre grad än vid frysförvaring. Vid rumstemperatur bröts ACTH ner snabbare än i kyl, vilket var förväntat utifrån resultatet vid tidigare studier.

I denna studie halverades ACTH-koncentrationen i rumstemperatur i tidsintervallet 4-24 timmar. Fyra timmar efter att 0-provet analyserats hade ACTH-koncentrationen i genomsnitt minskat med 12 % i förhållande till det genomsnittliga värdet för 0-proverna och efter 24 timmar hade ACTH-koncentrationen minskat med 62 %. Inget av proverna som analyserades efter två-, fyra- och sex timmar hade minskat till halva ACTH-koncentrationen. Efter ett dygns förvaring hade ACTH-koncentrationen minskat med mer än hälften i samtliga prover förutom ett, dvs. i 6 av 7 fall. I plasma från människa anses halveringstiden vara 197-286 minuter i rumstemperatur (Talbot *et al.*, 2003) vilket motsvarar tre och en halv timme till fyra timmar och 45 minuter.

Vid hantering på is och frysförvaring vid -20 °C sker ingen- till en obetydlig sänkning av ACTH under en veckas tid. Minskningen var i genomsnitt 1 %. För att kunna utvärdera långtidförvaring krävs studier med ett längre tidsspänn. Vid insamlingen av prover till denna studie sparades ett prov från varje hund för att förvaras i frys under en månads tid för att sedan analyseras. Resultaten från dessa prover hinner dock inte bli klara för att redovisas i denna rapport. I tidigare studier har man dock inte sett någon signifikant negativ effekt av förvaring vid -20 °C under en månads tid (Hegstad *et al.*, 1994). Resultaten från denna analys förväntas därför inte visa på någon negativ påverkan på möjligheten att kunna mäta ACTH-koncentrationen efter en månads frysförvaring.

Efter förvaring i kyl under var 24 timmar hade den genomsnittliga ACTH-koncentrationen minskat med 23 % i förhållande till 0-proven. I de prover som hade förhöjda ACTH-värden minskade koncentrationen i genomsnitt med 16 % efter 24 timmars kylförvaring. Vilket kan jämföras med resultaten som Evans *et al.* (2001) fått i sin studie där ACTH hos människa var stabilt vid 4 °C i 18 timmar, det vill säga minskade till 90 % av den ursprungliga koncentrationen efter 18 timmars kylförvaring. Oddoze *et al.* (2012) menar dock att ACTH från människa är stabilt i 24 timmar i kyl.

Vid hantering i rumstemperatur hade ACTH-mängden i de prov som kördes samtidigt som 0-provet i genomsnitt minskat med 1 % i förhållande till 0-proverna. Tiden som gick mellan att de prover som skulle hanteras i rumstemperatur separerades från 0-provet och den första analysen uppgick till mellan 15 och 30 minuter. Vid provtagning på klinik kan det dröja ännu längre innan proverna läggs i kyl eller frys, vilket skulle kunna göra att ACTH sjunker ytterligare innan analysen kan genomföras. Efter 4 timmars förvaring hade den i genomsnitt minskat med 12 %. Detta resultat skiljer sig från Evans *et al.* (2001) studie på prover från människa där ACTH var stabilt i upp till 8 timmar. I en studie som genomfördes av Oddoze *et al.* (2012) var ACTH är stabilt i 1-4 timmar i rumstemperatur, vilket är ett liknande resultat som i denna studie. Efter 24 timmar hade ACTH-koncentrationen minskat med 62 %. Resultatet stöds av Evans *et al.* (2001) studie där ACTH-koncentrationen sjönk med 72 % efter ett dygn i rumstemperatur. Reish *et al.* (2003) menar dock att ACTH kan vara stabilt i 18-24 timmar i rumstemperatur.

De prover som hade förhöjda ACTH-koncentration minskade i genomsnitt med 64 % efter 24 timmars förvaring i rumstemperatur. Detta innebär att det inte kan anses vara stabilt vid denna

temperatur och förvaringslängd. Dock är koncentrationen fortfarande förhöjd i förhållande till normalvärdet hos hund och det finns sannolikt möjlighet att kunna differentiera mellan primär och sekundär hypoadrenocorticism trots minskningen. Det är dock viktigt att kliniker tar hänsyn till nedbrytningshastigheten vid bedömningen av provsvaren.

Resultaten i studien tyder på att ACTH är relativt stabilt vid kortare tid förvaring i rumstemperatur. I kyl var det relativt stabilt under ett dygns förvaring. Nedbrytningen av hormonet gick inte så snabbt som förväntat. Detta tyder på att det finns möjligheter att förenkla hanteringen vid provtagning. För att analysera absoluta ACTH-nivåer hos hundar, till exempel i forskningsprogram, krävs kylhantering efter provtagningen och analys omgående efter centrifugeringen. När bakomliggande orsak till hypoadrenocorticism ska utredas, det vill säga när man vill differentiera mellan den primära och den sekundära formen är den exakta ACTH-koncentrationen i blodet mindre avgörande för diagnostiken. Skillnaden i ACTH-koncentration vid de olika formerna av sjukdomen är oftast stora. Vid primär hypoadrenocorticism är ACTH-koncentrationen kraftigt förhöjd och vid sekundär är den icke mätbar till normal. Det finns alltså relativt stort utrymme för ACTH-koncentrationen att sjunka utan att den når normala eller låga nivåer. En mätning av ACTH kan därför trots en minskning möjliggöra differentiering mellan de olika formerna.

Utifrån resultatet i studien är det sannolikt möjligt att ta prover utan att använda förkylda rör och att hantera dessa på is. Vid provtagning för analys av ACTH-nivåer hos hundar är det sannolikt möjligt att ta- och hantera prover i rumstemperatur, provet bör transporteras till laboratorium snarast för omgående analys eller infrysning.

För en klinik som har direkt tillgång till ett laboratorium där ACTH kan mätas innebär detta möjligheter för personalen att provtagning, hantering och centrifugering kan utföras vid rumstemperatur och proverna kan därefter transporteras till laboratorium för omgående analys. Om det inte finns personal tillgänglig för att ta hand om proverna kan de placeras i kylskåp i väntan på analys inom ett par timmar.

På kliniker som ligger i närheten av ett laboratorium där ACTH kan analyseras kan proverna tas och hanteras i rumstemperatur och efter centrifugering placeras i någon form av kylbehållare för att samma dag transporteras till laboratoriet.

För kliniker som måste skicka prover med post till ett laboratorium är det sannolikt möjligt att proverna kan hanteras i rumstemperatur och efter centrifugering tillfälligt avbryta nedbrytningen av ACTH genom att frysa ner plasman. Proverna kan sedan förvaras i fryskåp tills de kan skickas. Även om proverna kan skickas omgående kan plasman frysas ned så att den hålls kall under så lång tid som möjligt under transporten. Proverna bör skickas tillsammans med någon form av kylmedium t ex. en kylklamp för att de ska hållas frysta och/eller kalla under transporten.

Inom forskning finns en rad olika faktorer som kan påverka en undersökning. Det kan röra sig om forskarens tidigare upplevelser och erfarenheter som kan påverka resultatet och tolkningen av resultatet i en viss riktning. Bland dessa tidigare erfarenheter kommer konststillhörighet att spela en viss roll. Detta är sannolikt en större risk vid kvalitativa studier där fokus ofta ligger på individens upplevelse av ett fenomen, samt forskarens tolkning av den informationen som ges. Vid kvantitativa studier är denna risk mindre, men forskningsresultatet ska fortfarande tolkas och slutsatser ska dras utifrån de data som samlas in vilket ger utrymme för påverkan. Även i de tidigare studier som ligger till grund för denna kommer konststillhörighet, bland annat, att ha påverkat urval, tolkningar och slutsatser. I denna studie är studenten, handledaren och biträdande handledaren kvinnor. De artiklar som tas upp

i studien har 70 % kvinnor som huvudförfattare. Detta skulle kunna spela roll, inte bara för hur studien har lagts upp och hur resultatet har tolkats utan även påverka den tidigare forskning och kunskap som finns på området. I denna studie är både huvudhandledare, biträdande handledare och student kvinnor, vilket också skulle kunna påverka resultatet i denna studie på motsvarande sätt.

När det gäller praktiska faktorer i undersökningen skulle det faktum att proverna som förvarades i rumstemperatur även förvarades i mörker kunna påverka resultatet och tolkningen av resultatet utifrån tidigare studier inom området. I de studier som delvis ligger till grund för denna anges inte vid vilka ljusförhållanden plasman har förvarats, något som kan ha påverkat resultatet. Även de prover som hanterats i rumstemperatur hanterades till en början enligt gällande rekommendationer (Hegstad *et al.*, 1990) med förkylda rör och transport på is, för att i ett senare skede separeras från 0-provet och hanteras i rumstemperatur. Detta gick inte att undvika då det är nödvändigt att hela provet samlas i ett rör. Den initiala kylhanteringen gör att studien inte helt kan efterlikna en provtagningssituation i praktiken.

Urvalet i denna studie är relativt litet (sju hundar) vilket kan innebära att resultaten inte är representativa för en större population. Vidare studier med ett större urval bör därför genomföras för att få ett urval som sannolikt är mer representativt för hela populationen.

Eftersom ACTH-koncentrationen hos 25 % av hundarna med normala värden hade minskat till nivåer som inte var mätbara efter 24 timmar i rumstemperatur bör fler patienter med hög ACTH-koncentration provas. Detta för att kunna utvärdera om förvaring och transport skulle kunna ske utan kylförvaring. Man bör fortsätta att undersöka olika temperaturer och förvaringssätt, olika sätt att förpacka proverna på kan utvärderas så att de får längsta möjliga hållbarhet.

## REFERENSER

- Adler Jennifer A. Drobatz Kenneth J & Hess Rebecka S: (2007) Abnormalities of Serum Electrolyte Concentration in dogs with Hypoadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 21, ss. 1168-1173.
- Ellis Jane M. Livesey John H. Evans Margaret J. (2003) Hormone stability in human whole blood. *Clinical Biochemistry*, vol. 36, ss. 109-112
- Evans Margaret J. Livesey John H. Ellis Jane M. Yandle Timothy G. (2001) Effects of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones. *Clinical biochemistry*, vol. 34, ss. 107-112
- Feldman EC & Nelson RW (2004). *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis; WB Saunders
- Hanson J.M. Kooistra H.S. Mol J.A. Meij B.P. (2006) Plasma profiles of adrenocorticotrophic hormone, cortisol,  $\alpha$ -melanocyte-stimulation hormone, and growth hormone in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism before and after hypophysectomy. *Journal of Endocrinology*, vol. 190, ss. 601-609
- Hegstad Rebecca L. Johnston Shirley D. Pasternak Donna M. (1990) Effects of sample handling on adrenocorticotropin concentration measured in canine plasma, using a commercially available radioimmunoassay kit. *American Journal of Veterinary research*, vol. 51, ss. 1941-1947
- Kempainen Robert J. Clark TP. Peterson ME (1994) Preservative effect of aprotinin on canine plasma immunoreactive adrenocorticotropin concentrations. *Domestic animal endocrinology*, vol. 11, ss. 355-362
- Kempainen Robert J. Behrend Ellen N. (1997) Adrenal physiology. *The Veterinary Clinics of North America*, vol. 27, ss. 173-186
- Kintzer Peter P. & Peterson Mark E. (1997) Treatment and long-term follow-up of 205 dogs with hypoadrenocorticism. *Journal of veterinary internal medicine*, vol. 11, ss. 43-49.
- Livesey John H. Dolamore Barbara (2010) Stability of plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH): influence of hemolysis, rapid chilling, time, and the addition of a maleimide. *Clinical Biochemistry*, vol. 43, ss. 1478-1480
- Melián C: & Peterson Mark E (1996) Diagnosis and treatment of naturally occurring hypoadrenocorticism in 42 dogs. *Journal of small animal practice*, vol. 37, ss. 268-275
- Oddeze Christiane, Lombard Elise & Portugal Henri (2012) Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical Biochemistry*, vol. 45, ss. 464-469
- Perkins G.A. Lamb S. Erb H.N. Schanbacher B. Nydam D.V. Divers T.J. (2002) Plasma adrenocorticotropin (ACTH) concentration and clinical response in horses treated for equine Cushing's disease with cyproheptadine or pergolide. *Equine veterinary journal*, vol. 34, ss. 679-685
- Peterson Mark E. Kintzer Peter P. Kass Philip H. (1996) Pretreatment clinical and laboratory findings in dogs with hypoadrenocorticism 225 cases (1979-1993) *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 208,
- Peterson Mark E. & Kintzer Peter P. (1997) Primary and secondary hypoadrenocorticism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, vol. 27, ss. 349-357

- Reish N, Reincke M, Bidlingmeier M (2007) Preanalytical stability of adrenocorticotrophic hormone depends on time to centrifugation rather than temperature. *Clinical Chemistry*, vol. 53, ss. 359-60
- Reusch CE (2000) Hypoadrenocorticism. I: Ettinger SJ, Feldman EC (red). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6 ed. Philadelphia; WB Saunders, ss. 1488-1499
- Rijnberk AD. & Mol JA (2008) Adrenocortical function. I: Kaneko Jerry, Harvey John W & Bruss Michael L (red), *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6 ed. Amsterdam; Elsevier. ss. 553-567
- Scott-Moncrieff JC. Koshko MA. Brown JA, Hill K. Refsal KR (2003) Validation of a chemiluminescent enzyme immunoassay for plasma adrenocorticotrophic hormone in the dog. *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 32, ss. 180-185
- Sjaastad Östein V. Hove Knut, Sand Olav (2003) *Physiology of domestic animals*. Oslo; Scandinavian Veterinary Press
- Talbot JA, Kane JW & White A (2003) Analytical and clinical aspects of adrenocorticotrophin determination. *Annals of Clinical Biochemistry*, vol. 40, ss: 453
- Thomson Ann L. Scott-Moncrieff J. Cathrine & Andersson Johanna D (2007) Comparison of classical hypoadrenocorticism with glucocorticoid-deficient hypoadrenocorticism in dogs: 46 cases (1985-2005) *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 230, ss. 1190-1194

Källor på internet:

[http://sites.tufts.edu/equineendogroup/files/2013/11/EEG-recommendations\\_-downloadable-final.pdf](http://sites.tufts.edu/equineendogroup/files/2013/11/EEG-recommendations_-downloadable-final.pdf) 2013-12-06