



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Canine prostatic specific esterase (CPSE) och prostatastorlek hos hanhund

Elin Holmroos

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*.ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:11*

Canine prostatic specific esterase och prostatastorlek hos hanhund

Canine prostatic specific esterase and prostate size in male dogs

Elin Holmroos

Handledare: *Bodil Ström Holst, institutionen för kliniska vetenskaper*

Biträdande handledare: *Kerstin Hansson, institutionen för kliniska vetenskaper*

Examinator: *Eva Axné, institutionen för kliniska vetenskaper*

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Delnummer i serie: Examensarbete 2016:11

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: *Benign prostatahyperplasi, serumanalys, Odelis CPSE, ultraljud,*

Key words: *Benign prostatic hyperplasia, serum analysis, Odelis CPSE, ultrasound*

Sveriges lantbruksuniversitet

Swedish University of Agricultural Sciences

Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science

Department of Clinical Sciences

SAMMANFATTNING

Prostatasjukdomar är vanligt förekommande hos intakta hanhundar och benign prostatahyperplasi (BPH) är den vanligaste av dem. Multipla studier visar på hög prevalens, upp emot 100 % har rapporterats hos intakta hanhundar redan vid 6 års ålder. Då sjukdomen är vanligt förekommande men kliniskt svår att skilja från övriga prostatalidanden är diagnostiken viktig. För att ställa en säker diagnos krävs vävnadsbiopsi vilket dock är en invasiv metod som till och med är kontraindicerad vid vissa prostatalidanden. Därför är det vanligare att en sannolikhetsdiagnos ställs och det terapeutiska svaret får avgöra om det krävs en omprövning eller inte. I den här studien har en diagnostisk metod där sambandet mellan serumkoncentrationen av ett prostataprotein, CPSE (canine prostatic specific esterase), prostatas utseende samt prostatastorlek, uppmätt via ultraljud, studerats. Analysmetoden som använts är ett relativt nytt kommersiellt test kallat Odelis CPSE (Virbac) som bygger på en ELISA för CPSE.

I studien ingick 49 hundar fördelade på 3 kategorier beroende på klinisk status. Prostatastorleken uppmättes via ultraljudsundersökning och utseendet av prostatas parenkym samt eventuell cystaförekomst noterades. Ett venöst blodprov togs i samband med undersökningen och användes för analys av CPSE-koncentrationen i enlighet med instruktionerna för Odelis CPSE.

Resultaten från studien visar att det inom studiepopulationen fanns stor spridning mellan CPSE-koncentrationerna både inom och mellan de olika grupperna. Statistiskt signifikanta samband sågs mellan prostatastorlek och CPSE-koncentration samt mellan cystaförekomst och CPSE-koncentration medan faktorer som ålder och vikt inte påverkade koncentrationen av CPSE.

Sammanfattningsvis anser författaren att det krävs mer studier för att avgöra den faktiska nyttan av att analysera CPSE som ett diagnostiskt hjälpmedel vid BPH. Analysering av CPSE verkar däremot kunna vara behjälpligt vid diagnostisering av prostatalidanden mer generellt.

SUMMARY

Prostatic diseases are common in intact male dogs and benign prostatic hyperplasia (BPH) is the most common of them all. Multiple studies show as high prevalence as 100% in intact male dogs over 6 years of age. Since the disease is common and the clinical appearance is hard to distinguish from multiple other prostatic diseases, the diagnostics are very important. To make a definitive diagnosis it is required to do a tissue biopsy. However, it is an invasive method that is even contraindicated with certain prostate afflictions why it is more common that a probability diagnosis is used instead. In this study a diagnostic method using the correlation between serum concentrations of a prostatic enzyme called canine prostatic specific enzyme (CPSE) and prostatic size (measured by ultrasound) have been evaluated. The analytic method used in the study is a commercial test manufactured by Virbac called Odelis CPSE that uses an ELISA technique.

The study involved 49 dogs divided into 3 categories depending on their clinical status. Prostate size was measured by ultrasound and the appearance of the prostatic parenchyma and possible cyst occurrence was noted. A venous blood sample was taken and serum was used for the analysis of the CPSE concentration in accordance with the instructions for Odelis CPSE.

The results of the study show that there was a large spread in CPSE concentrations both in, and between, the client groups. Statistically significant associations were found between prostate size and CPSE concentration and between presence of cysts and CPSE concentration while factors such as age and weight did not affect the concentration of CPSE.

The author is not fully convinced of the benefits of analysing CPSE as a diagnostic tool for BPH until further studies have been made, but sees the potential for it as a more general indicator for prostatic complaints.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Benign prostatahyperplasi	1
Litteraturoversikt.....	2
Prostatas anatomi och funktion	2
Prostatasjukdomar	2
Benign prostatahyperplasi (BPH).....	3
Förekomst.....	4
Klinisk bild vid BPH	4
Olika former av BPH.....	4
Diagnostik vid BPH	5
Anamnestagning/historik.....	5
Rektal palpation.....	5
Bilddiagnostik	6
Analysering av ejakulat.....	7
Serumindikatorer.....	7
Definitiv diagnos.....	8
CPSE	8
Beskrivning av testet Odelis CPSE	8
Material och Metoder	10
Odelis CPSE.....	10
Statistisk bearbetning	11
Resultat.....	12
Hundar.....	12
Prostatastorlek mätt med ultraljud.....	12
CPSE-koncentration	12
Korrelation mellan CPSE-koncentration och övriga parametrar.....	16
Ålder och vikt.....	16
Patientkategorier.....	16
Prostatastorlek	16
Parenkymets utseende och förekomst av cystor	17
BPH enligt Odelis CPSE	17

Diskussion	18
Sjukdomen benign prostatahyperplasi.....	18
Storleksangivelser	18
Studieunderlaget.....	18
Felkällor	19
Odelis CPSE.....	19
Studieresultat.....	20
Konklusion	21
Referenser.....	22
Appendix 1	Fel! Bokmärket är inte definierat.
Appendix 2	Fel! Bokmärket är inte definierat.
Appendix 3	Fel! Bokmärket är inte definierat.

INLEDNING

Benign prostatahyperplasi

Benign prostatahyperplasi (BPH) innebär en proliferation av celler i prostata vilket leder till en förstoring av organet (Brendler *et al.*, 1983). Sjukdomen är mycket vanligt förekommande hos intakta hanhundar (Lowseth *et al.*, 1990) och det har uppskattats att 73 % av hundar med diagnostiserade prostataproblem har BPH (Borthwick & Mackenzie, 1971). I två studier påstås det att alla hanhundar drabbas någon gång efter 6-7 års ålder (Brendler *et al.*, 1983; Berry *et al.*, 1986). Tillväxten av prostata sker kontinuerligt efter att hunden nått könsmognad men definitionen av när BPH inträffar skiljer sig åt en del mellan olika studier. Enligt Barsanti & Finco (1986) har hunden BPH så fort det går att detektera histologiska förändringar i prostata medan andra menar att det först är när storleken börjar bli så stor att hunden får kliniska besvär, eller att den predisponerar för andra sjukdomar, som den bör kallas för en patologisk process (Lai *et al.*, 2008).

Diagnostik av prostatalidanden är viktigt eftersom behandling och prognos varierar med typ av sjukdom. I och med att BPH är vanligt förekommande och den kliniska bilden kan vara mycket snarlik andra prostatasjukdomar är korrekt samt skyndsamt diagnostik något som eftersträvas (Barsanti & Finco, 1995; Smith, 2008).

På humansidan används ett prostataprotein kallat PSA (prostata-specifikt antigen) för att detektera samt bestämma stadium av prostatacarcinom hos män (Dube *et al.*, 1986). Många studier har gjorts för att hitta någonting liknande för veterinärt bruk trots att förekomsten av prostatacarcinom inte är lika vanligt förekommande hos hund som hos män. Än så länge har försöken inte lyckats men ett flertal andra markörer har påvisats, bland annat CPSE (canine prostatic specific esterase) som är lik PSA till utseende, form och funktion (Chadelaine *et al.*, 1984; Bell *et al.*, 1995). Ökad CPSE-koncentration i serum har visat sig ha en hög korrelation till ökad ålder samt förekomst av BPH hos intakt hanhund varför det nu utreds som ett eventuellt diagnostiskt verktyg inom veterinärmedicinen (Chadelaine *et al.*, 1984; Dube *et al.*, 1986; Bell *et al.*, 1995; Leví & Mimouni, 2009).

Denna studie syftar till att titta närmare på användbarheten av att bestämma CPSE-koncentrationen i serum som ett redskap för att detektera BPH. Inom området finns ännu inte mycket forskning gjord kring användbarheten i daglig klinisk verksamhet. För analys av koncentrationerna används en kommersiell ELISA, Odelis CPSE (Virbac). Odelis CPSE är det första kommersiella testet för analysering av CPSE-nivåer och än finns inte mycket publicerat med detta test. Enligt företaget är analysen mycket effektiv, med hög sensitivitet och specificitet samt hög reproducerbarhet inom samt mellan analysomgångarna vilket grundas på en studie utförd av (Leví & Mimouni, 2009).

Hypotesen för denna studie är att det finns ett samband mellan serumkoncentrationerna av CPSE och storleken på prostata. Genom att jämföra den med ultraljud uppmätta prostatastorleken med förväntat maximalt normalvärde på prostatas storlek bör en sannolikhet för att BPH föreligger kunna tas fram. Målet är sedan att studera korrelationen mellan CPSE-nivåerna och prostatastorlek i kombination med kliniska tecken på BPH.

Studien är en del i ett större projekt som pågick på 4 större djurkliniker/djursjukhus i Sverige under hösten 2014.

LITTERATURÖVERSIKT

Prostatas anatomi och funktion

Prostata är en biloberad, sekretorisk könskörtel och hanhundens enda accessoriska könskörtel (Barsanti & Finco, 1986; Dyce *et al.*, 2010; Howard & De Lahunta, 2013). Den ligger belägen i bäckenhålan alternativt kaudalt i bukhålan beroende på storlek och hundens ålder. Prostata är dorsalt avgränsad av rektum och ventralt av *symphysis pelvina* samt ventrala bukväggen. Det är ett kompakt organ som helt omger proximala portionen av bäckenuretra (Howard & De Lahunta, 2013) samt kaudala delen av blåshalsen (Zuckerman & Groome, 1937; Dyce *et al.*, 2010). Det finns även diffust utspridd prostatavävnad i uretras mucosa i anslutning till den kompakta delen av organet (Dyce *et al.*, 2010). Formen är normalt rund till oval. Dorsalt finns en sulcus som delar upp organet i 2 lobber, en dexter och en sinister. Lobberna är separerade av ett bindvävssepta som löper i sagittalplanet av organet. Varje lobe är i sin tur uppdelad i mindre sektioner, lobuli, av bindvävstrabekler. Lobuli är uppbyggda av multipla sektioner av tubulialveolär körtelvävnad linjerade med cylindriskt epitel (Howard & De Lahunta, 2013). Organet omges av en relativt tjock bindvävskapsel som är rikligt innerverad och strierad med glatt muskulatur (Howard & De Lahunta, 2013). Den parenkymatösa vävnaden består till största delen av bindväv fram till att hunden nått könsmodning. Därefter ökar influensen av testosteron och en övergripande del övergår istället till glandulär vävnad (Berry *et al.*, 1986; Dyce *et al.*, 2010),

Ductus deferens går in i respektive lobe kraniolateralt, löper sedan i kaudoventral riktning och mynnar i uretra i direkt anslutning till *colliculus seminalis* (Howard & De Lahunta, 2013). Den arteriella blodförsörjningen sker via en gren från *a pudenda* kallad prostataartären. Det venösa avflödet sker via prostatavenen som mynnar i *vena iliaca interna*. Innerveringen sker sympatiskt via *n hypogastricus* samt parasympatiskt av *n pelvis* (Gordon, 1960). Parasympatisk stimulering under erektion ökar sekretionen i körtelvävnaden och sympatisk stimulering under ejakuleringen medger frisättningen av den ökade sekretionen ut i uretra (Kutzler & Yeager, 2005).

Prostatas kompletta funktion är ännu inte helt utredd. Den övergripande funktionen är produktionen av sekret som tillför näring, har antimikrobiella och buffrande egenskaper samt underlättar transporten av spermier vid ejakulering. (Barsanti & Finco, 1986; Barsanti & Finco, 1995; Howard & De Lahunta, 2013). Sammansättningen av sekretet hos hanhund skiljer sig dock väsentligt från andra arter. Sekretet är klart och lättflytande och innehåller citrat, laktat samt kolesterol men till skillnad från många andra arter saknar hundens prostatasekret någon form av sockerkälla varför spermier måste få sin energikälla på något annat sätt (Smith, 2008; Howard & De Lahunta, 2013). Sekretionen sker kontinuerligt och töms i uretra genom utförsmynningarna i anslutning till *colliculus seminalis*. Ejakulatet består till 97 % av prostatasekret, störst mängd finns i första och tredje fraktionen.

Prostatasjukdomar

Sjukdomar kopplade till prostata är ett vanligt förekommande problem hos intakta medelålders till äldre hanhundar (Berry *et al.*, 1986; Johnston *et al.*, 2000). Den vanligaste patologiska processen är godartad prostataförstoring (BPH) (Barsanti & Finco, 1986; Wolf *et al.*, 2012), med eller utan intraprostatiska cystbildningar, följt av olika typer av prostatit, maligna neoplastiska förändringar samt paraprostatiska cystbildningar. BPH verkar kunna

predisponera för de övriga prostatasjukdomarna även om hunden inte har kliniska besvär av själva hyperplasin (Johnston *et al.*, 2000; Kutzler & Yeager, 2005).

Majoriteten av sjukdomsproblem kopplade till prostata ger en liknande klinisk bild. De vanligaste kliniska tecknen är enligt (Johnston *et al.*, 2000)

- Defekeringssvårigheter
- Hematuri
- Läckage från preputiet
- Smärta
- Bakbenschälta

Den likartade kliniska bilden gör det svårt att ställa diagnos endast utifrån kliniska tecken. Det är dock väsentligt att prioritera en korrekt ställd diagnos då behandlingsalternativ och prognos skiljer sig mycket åt (Kutzler & Yeager, 2005).

Benign prostatahyperplasi (BPH)

BPH är en vanlig förekommande sjukdom hos intakta hanhundar och associeras starkt med ökande ålder hos hunden. (Brendler *et al.*, 1983; Berry *et al.*, 1986). Prostatas tillväxt påbörjas redan under puberteten då produktionen av könshormon påbörjas. Tillväxten sker sedan successivt hela hundens liv under influens av hormoner och tillväxtfaktorer. Tillväxten sker genom cellulär hypertrofi samt hyperplasi av epitelcellerna i prostata (Barsanti & Finco, 1986; Wolf *et al.*, 2012). Enligt Barsanti & Finco (1986) har hunden BPH så fort det går att detektera en hyperplasi histologiskt. De anser till och med att hunden kan ha en mild BPH trots att den makroskopiskt har en normalstor prostata. Vissa anser istället att tillväxten bör ses som ett normalt fysiologiskt fenomen som sker med ökad ålder och först när det börjar leda till kliniska besvär, eller riskerar att predisponera för andra sjukdomar, bör det ses som en patologisk process kallad benign prostatahyperplasi (Lai *et al.*, 2008). Enligt O'Shea (1962) kan prostatas tillväxt delas in i 3 faser, en normal tillväxt hos den unga, icke köns mogna hunden, en kontinuerlig hyperplasi under hundens vuxna liv som startar under influens av påbörjad androgenproduktion och en involution när hunden är i sitt mest seniora stadium.

Patogenesen bakom BPH är ännu ej helt klarlagd. Prostatas tillväxt styrs naturligt av dihydrotestosteron (DHT), testosteron, 17β -estradiol och lokala tillväxtfaktorer genom stimulering av tillväxt i både stromal och glandulär vävnad (Brendler *et al.*, 1983; Johnston *et al.*, 2000; Smith, 2008). Studier har dock inte visat någon signifikant förändring i vare sig DHT-koncentration eller testosteronhalt, varken i serum eller prostatasekret, vid BPH. (Lowseth *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 2012). Wolf *et al.* (2012) såg däremot en svag men positiv korrelation mellan ökade prolaktinnivåer i serum och förekomst av BPH. Prolaktin har sedan tidigare en känd tillväxtfrämjande funktion som skulle kunna spela roll i patogenesen för BPH. Berry *et al.* (1986) gjorde en studie där de letade efter korrelation mellan BPH och 42 olika parametrar. Starkast korrelation fanns mellan ålder och BPH men slutsatsen blev att patogenesen med största sannolikhet är komplex och multifaktoriell.

Förekomst

Hos unga hundar anses BPH vara ovanligt (Lowseth *et al.*, 1990; Bell *et al.*, 1995) Ett flertal studier visar att prevalensen för BPH ökar med tilltagande ålder men exakt i vilken utsträckning och från vilken ålder varierar kraftigt mellan olika författare. Redan från 2 års ålder har det setts ökad prevalens i populationen (Berry *et al.*, 1986; Lowseth *et al.*, 1990). Berry *et al.* (1986) fick prevalensen 40 % hos 2-4 åringar. Därefter fortsätter ökningen till 80 % hos 5-åringar (Johnston *et al.*, 2000) alternativt 100 % hos hundar över 6-7 år (Brendler *et al.*, 1983; Berry *et al.*, 1986; Lowseth *et al.*, 1990)

Studier har visat att skotsk terrier generellt verkar ha en större prostatastorlek än andra raser varför de också i högre grad utvecklar kliniska tecken av BPH (Sirinarumitr, 2009). Wolf *et al.* (2012) såg under sin studie en ökad prevalens i förekomsten av BPH hos rhodesian ridgebacks vilket skulle kunna tyda på en genetisk predisposition för sjukdomen även inom den rasen.

Klinisk bild vid BPH

Till skillnad från flertalet andra sjukdomar i prostata, som exempelvis prostatit, ger BPH vanligtvis inte några initiala kliniska tecken (Barsanti & Finco, 1986). Först när prostata blir kraftigt förstörd ger den indirekta kliniska som exempelvis uppkommer av att rektum trycks ihop (Kutzler & Yeager, 2005). Ses kliniska tecken yttrar det sig oftast som sig hematuri (blod i urinen), urinläckage eller tenesmus (svårigheter vid defekering) (Johnston *et al.*, 2000). BPH ökar också risken att hunden drabbas av andra prostatasjukdomar så som exempelvis prostatit som i sin tur oftare resulterar i kliniska problem (Johnston *et al.*, 2000) (Kutzler & Yeager, 2005; Smith, 2008).

Olika former av BPH

Ett flertal studier har visat att det finns olika former av BPH. Vanligast är en uppdelning i en glandulär och en komplex form av BPH (Zuckerman & Groome, 1937; Brendler *et al.*, 1983; Berry *et al.*, 1986). Den glandulära formen innebär en ökning av sekretoriskt epitel, både i form av ökad cellstorlek och av ett ökat totalantal celler. Detta leder till förstörade acini och lober. Mängden stroma anses däremot vara relativt mindre än normalt (Brendler *et al.*, 1983). Den komplexa formen innebär en glandulär BPH med samtidig atrofi och attenuering av delar av epitelet. I de atrofierade områdena kan en relativ ökning av stroma ses. Enligt Brendler *et al.* (1983) kan även cystbildning samt epitelial metaplasi tillhöra bilden av komplex BPH.

Studier har visat att äldre hundar oftast får den komplexa formen av BPH medan yngre hundar oftare utvecklar den glandulära (DeKlerk *et al.*, 1979; Brendler *et al.*, 1983; Lowseth *et al.*, 1990). Enligt (DeKlerk *et al.* (1979) kan den glandulära formen hos yngre hundar vidareutvecklas till den mer komplexa/cystiska formen senare i livet. Det verkar som att det finns ett samband mellan den glandulära formen och ökad androgenpåverkan medan komplex/cystisk BPH hos gamla hundar ofta ses samtidigt som en förändrad kvot mellan testosteron och östrogener (Brendler *et al.*, 1983).

BPH och prostatit

Prostatit (inflammation i prostata) orsakas oftast av bakteriella infektioner (Barsanti & Finco, 1995) men studier har även visat att det kan finnas ett samband med BPH (Lai *et al.*, 2008).

Lowseth *et al.* (1990) har funnit en ökad risk för prostatit ju äldre hunden är och därmed även sett ökad prevalens hos hundar med konstaterad BPH.

BPH och cystbildning

Vid BPH kan det bildas vätskeinhållande cystor till följd av att acini blir utspända på grund av obstruktion (Lowseth *et al.*, 1990). Leav *et al.* (2001) föreslår att cystor utvecklas med åldern i och med att stromaproliferationen ökar ju äldre hunden blir och att ett ökat stroma i sin tur leder till obstruktion av utförsgångarna.

Diagnostik vid BPH

De flesta prostatasjukdomarna, inklusive BPH, är associerade med prostatomegali vilket gör evaluering av storlek, läge och symmetri till en central del av diagnostiken. Vanliga differentialdiagnoser till BPH är prostatit, abscesser, prostatacystor och neoplasi. Den kliniska bilden är snarlik men behandlingsstrategierna är olika. För att ställa en korrekt diagnos är det därför viktigt att följa en genomtänkt utredningsgång (Barsanti & Finco, 1995; Smith, 2008; Leví & Mimouni, 2009).

- Anamnes
- Klinisk undersökning inklusive eventuell rektalpalpation
- Bilddiagnostik – röntgen alt ultraljud
- Analys av serum- eller ejakulatindikatorer
- Eventuell biopsi eller aspirat

Anamnestagning/historik

Det är viktigt att undersöka hundens normala urinerings- samt defekeringsvanor och beteenden. Förändringar på avföringen så som tillplattad eller mönstrad avföring till följd av kompression av rektum är mycket vanligt vid klinisk manifestation av BPH såväl som tenesmus och smärtreaktioner av olika grad (Johnston *et al.*, 2000). Även svårigheter eller förändrat beteende vid urinering kan ofta ses, som exempelvis urinläckage, svag stråle, hematuri eller förekomst av preputialt läckage (Smith, 2008).

Rektal palpation

Palpation av prostata är ett bra första steg vid misstanke om prostataproblem (Leví & Mimouni, 2009). Det kan framförallt vara användbart för att avgöra om prostata känns förstorad, om den ligger i bäckenhålan, om den känns homogen eller asymmetrisk i strukturen eller om den ömmer.

Prostatas kaudala pol kan oftast nås med ett finger via rektum. För att underlätta åtkomsten kan veterinären med sin fria hand lägga ett tryck kaudoventralt på buken för att trycka upp urinblåsan samt prostata i bäckenhålan (Smith, 2008). Vid palpation bör försök göras för att bedöma storlek, form, symmetri samt förekomst och/eller gradering av smärta. En normal prostata ska vara symmetrisk bilateralt, ha en jämn och slät yta, mjukt parenkym samt vara öm vid beröring.

Vid rektalpalpation nås endast den kaudala polen samt en del av dorsala prostata. Det går således inte att bedöma hela prostata. Enligt Mukaratirwa & Chitura (2007) har rektalpalpation en hög specificitet (75 %) och ett högt positivt prediktivt värde för sjukdom (87 %). Däremot är sensitiviteten låg (34 %) och det negativa prediktiva värdet för sjukdom är endast 34 % vilket visar på att det inte är särskilt pålitligt som diagnostiskt verktyg.

Bilddiagnostik

Röntgen

Röntgen har länge använts som ett diagnostiskt verktyg för BPH. Det är inte en lämplig metod för att diagnostisera specifika sjukdomstillstånd men kan ge värdefull översiktsinformation gällande storlek, form, kontur, läge och täthet. Både ventrodorsal och lateral bukprojektion bör utföras för en fullständig evaluering (Lai *et al.*, 2008). Om prostatas diameter överstiger 70 % av utrymmet mellan *os sacrum* och *pecten osis pubis* på en lateralprojektion eller 50 % av utrymmet mellan ileumvingarna på en VD-projektion anses det att den bör klassas som förstorad (Feeney *et al.*, 1987; Ruel *et al.*, 1998).

De finns dock vissa begränsningar med en översiktlig röntgenundersökning. Det är generellt dåliga kontrastförhållanden i bäckenhålan varför en kontrastundersökning kan vara till hjälp för att säkrare kunna avgöra uretras placering och därmed indirekt hitta prostata samt för att se en symmetrisk eller asymmetrisk förstoring av prostata. Generellt ger omkringliggande vävnad mer information än vad som fås av att studera prostatan. Vid prostatomegali kan exempelvis kaudala delen av kolon ses vara avsmalnad eller så ger urinblåsan sken av att vara förskjuten kranialt i buken (Feeney *et al.*, 1987).

Röntgenundersökning har flera begränsningar varför en vidare diagnostisk plan bör finnas till hands:

- Stor risk att överskatta prostatas storlek på grund av att det är svårt att urskilja konturerna (Feeney *et al.*, 1987)
- Närliggande organ och vävnad gör bedömningen av prostatas avgränsning svår
- Standardvärdet på 70 % för att bedöma storlek tar varken hänsyn till hundens ålder eller ras (Leví & Mimouni, 2009).
- Bedömningen av prostatas parenkym är begränsad, förkalkningar av större storlek kan identifieras men inte mycket mer än så.

Ultraljud

Ultraljud är ett bra diagnostiskt hjälpmedel för utvärdering av prostata (Cooney *et al.*, 1992; Kamolpatana *et al.*, 2000). Det är en relativt snabb, billig och non-invasiv undersökning som kan ge information om prostatas storlek, form, kontur, ekogenicitet och symmetri ända inifrån parenkymet och ut i kapseln, samt om de angränsande mjukdelarna (Ruel *et al.*, 1998). En fördel med ultraljudsundersökning är möjligheten att undersöka och gradera cystaförekomst, eventuell abscessbildning eller tecken på neoplastiska förändringar i parenkymet som exempelvis inte går att se på röntgen. (Feeney *et al.*, 1987; Cooney *et al.*, 1992). Även vid ultraljudsundersökning kan det dock vara svårt att med säkerhet säga vilka patologiska

processer som pågår. Ultraljudet kan då vara behjälpligt för ytterligare provtagning, genom att man kan ta aspirat eller vävnadsbiopsi från ett förändrat område. En annan svårighet är att undersökningen till största delen är momentan och det krävs en kunnig utövare samt adekvat utrustning för ändamålet.

Via ultraljudsundersökning fås en mängd mått som exempelvis längd, bredd, höjd och därmed även volym på prostata. En studie (Atalan *et al.*, 1999) som jämförde den uppmätta storleken via ultraljud med mätning gjord postmortalt visade att storleken är i stort sett identisk mellan de två olika metoderna. Enligt studien är längd och bredd de mest korrekta måtten för storleksangivelser. (Ruel *et al.*, 1998) har tagit fram ett förslag på hur den maximala prostatavolymen, kan uppskattas utifrån hundens ålder och vikt enligt formeln $V_{\text{max normal}} = (0.867 \times \text{vikt}) + (1.885 \times \text{ålder}) + 15.88$. (Ruel *et al.*, 1998). Kamolpatana *et al.* (2000) tittade bland annat på hur prostatas volym kan räknas ut utifrån uppmätta värden via ultraljud. Tidigare har formlerna för en kvadratisk kropp alternativt elliptisk kropp ofta använts. Kamolpatana *et al.* såg dock att genom att använda formeln $V_{\text{measured}} = ((1/2,6) \times (L \times W \times D)) + 1,8 \text{ cm}^3$ kunde de korrigera för skillnaden mellan den uppmätta volymen via ultraljud och den faktiska volymen vid post mortemundersökning och kom på så sätt närmare det faktiska värdet. Måttangivelserna tar dock ej hänsyn till hundar vars ras generellt har en större prostatastorlek. Atalan *et al.* (1999) lyfter i sin studie fram risken med varierande mätvärden via ultraljudsundersökningar utförda av flera olika veterinärer. De hävdar att variationen mellan olika veterinärers mätvärden är stor och att det påverkas mycket av undersökningstekniken (probens position, prostatas läge etcetera).

Omständigheter som skulle kunna försvåra en korrekt undersökning av prostata via bukultraljud är exempelvis (Leví & Mimouni, 2009):

- Penis läge relativt till prostatas läge. För att nå kan det ibland krävas en vinkling sidledes av proben.
- Prostatas placering i bäckenhålan – kräver vinkling i kraniokaudal riktning.
- Svårighet att helt definiera prostatas utlinjering - exempelvis på grund av probens kvalité eller att prostatas gränser överskrider det visuella fönstret för proben.
- Felaktig mätning av prostata, veterinären mäter inte den maximala dimensionen.

Analysering av ejakulat

Analysering av ejakulat, framförallt den tredje fraktionen, kan ge viktig information om prostatas status. Mer än 97 % av ejakulatet består av prostatavätska (Barsanti & Finco, 1986; Kustritz, 2006). Vätskan analyseras för cytologisk status exempelvis förekomst av inflammatoriska celler (misstänkt prostatit), röda blodkroppar (indikation av nylig blödning) och förekomst av bakterier. Det går även att analysera för exempelvis förekomst av prostataproteiner och förändrade hormonkoncentrationer (Wolf *et al.*, 2012; Bell *et al.*, 1995). Wolf *et al.* (2012) såg exempelvis i sin studie att koncentrationen testosteron samt dihydrotestosteron i prostatasekret låg högre hos hundar med BPH än hos hundar med normal prostata.

Serumindikatorer

Mätning av prostataspecifika parametrar, exempelvis proteiner, så som CPSE, i serum har visat sig vara användbart för att detektera prostatasjukdom och då framförallt BPH eftersom det tyder på läckage över blod-prostatabarriären (Bell *et al.*, 1995). Mätning av östradiol/testosteron-kvot är ett annat exempel på mätbar indikator (Brendler *et al.*, 1983; Chadelaine *et al.*, 1984; Bell *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 2012).

Definitiv diagnos

Säkraste sätten att ställa diagnos vid prostatalidanden är ultraljud kombinerat med cytologi eller histologisk undersökning av biopsi (Cooney *et al.*, 1992). Enligt Smith (2008) kan endast en presumtiv diagnos av BPH ställas med hjälp av historik/anamnes, klinisk undersökning inklusive digital palpation samt bilddiagnostik. För att ställa en definitiv diagnos krävs biopsi. Det är dock viktigt att göra en fullständig riskanalys i dessa lägen. Talar alla mindre invasiva metoder för en BPH kan det vara värt att provbehandla innan övergång till så pass invasiva metoder som biopsitagning (Smith, 2008).

CPSE

Huvudproteinet i prostatasekretet hos hund är prostataspecifikt argininesteras, även kallat CPSE (canine prostatic specific esterase) (Dube *et al.*, 1986). 1984 visade Chadelaine *et al.* att CPSE är en viktig markör för prostatasekretion hos hanhund (Chadelaine *et al.*, 1984). CPSE utsöndras av epitelcellerna i prostata och står för 90 % av proteinerna i sperman. Det är, precis som PSA, ett serinproteas och de båda liknar varandra vad gäller egenskaper och reglering (Chadelaine *et al.*, 1984; Dube *et al.*, 1986). PSA (prostataspecifikt antigen) används på humansidan för detektion av prostatacarcinom och mätning av koncentrationerna har även visat sig användbart för att bedöma stadium för sjukdomen. PSA förekommer även det hos hund men det finns ingen tydlig korrelation mellan neoplasiförekomst och ökade serumkoncentrationer hos hund för vare sig PSA eller CPSE (Bell *et al.*, 1995). Däremot såg Bell *et al.* (1995) att en hund med prostatapåverkan, exempelvis BPH, har högre serumnivåer än hundar utan förändringar. Även senare studier har visat ett signifikant samband mellan ökade koncentrationer av CPSE i serum och förekomst av BPH. Wolf *et al.* (2012) såg i en studie på 77 kliniskt friska hundar en tydligt ökad nivå CPSE i serum hos äldre, intakta hundar med BPH jämfört med yngre hundar med prostatastorlek inom normalvariationen. CPSE har därmed istället blivit ett tänkbart verktyg i jakten på diagnostiska metoder för BPH. Den fysiologiska funktionen hos CPSE är fortfarande inte klarlagd (Dube *et al.*, 1986).

Beskrivning av testet Odelis CPSE

Odelis CPSE är en immunoanalys av typen ELISA och det första kommersiella testet för analys av CPSE i serum hos hund (Virbac). Analysen bygger på att antikroppar i en microbrunn binder till antigenet (som i det här fallet är CPSE-proteinet i provet). Efter tvätt så tillsätts ytterligare en antikropp som binder till CPSE-proteinet. Denna antikropp är kombinerad med ett enzym, peroxidas, som efter tillsatts av ett specifikt substrat (TMB) genomgår en kolometrisk reaktion. Reaktionens intensitet mäts sedan med hjälp av spektrofotometri vid 450 nm. Intensiteten av ljusreaktionen motsvarar koncentrationen protein i provet.

Referensvärden för att möjliggöra att använda en ELISA för diagnostisering av BPH är framtagna via en multicentrisk studie i Frankrike (Leví & Mimouni, 2009). Studien gjordes på serum från 89 hundar. 34 hundar med konstaterad BPH som hade diagnostiserats via ultraljud

eller cytologi och 55 hundar utan BPH vilka var unga hundar utan kliniska tecken. Resultaten från studien tyder på att analys av serum via Odelis CPSE kan särskilja hundar med och utan BPH.

MATERIAL OCH METODER

Materialinsamlingen har skett på 4 kliniker och djursjukhus i Sverige under hösten 2014; Universitetsdjursjukhuset Uppsala, Evidensia Djurkliniken Västerås, Evidensia Specialistdjursjukhuset Strömsholm samt ReDog Västerås. Medverkande veterinärer har haft ultraljudskompetens och använt sig av adekvat utrustning.

Utrustningar och prober som använts är

- Esaote Alpha, konvex 9 MHz och linjär 15 MHz probe
- Philips IE33, konvex 8-3 MHz och konvex 5-1 MHz probe
- Esaote11-3 MyLabTwice, linjär 18-6 MHz och konvex 8-1 MHz probe
- GE Logiq E9, linjär, 9 eller 11 MHz och konvex, 1-5 eller 2-9 MHz probe

Patienturvalet har bestått av 3 kategorier

1. Hund med prostatalidande - Hundar med tecken på prostatabesvär (kan förekomma i samband med annan sjukdom eller frivillig deltagare)
2. Hundar med sjukdom – Hund som utreds eller behandlas för annan pågående sjukdom än prostatalidande
3. Frisk frivillig – Hund som deltar frivilligt i studien, visar ej kliniska tecken på prostatalidande och står ej på någon form av behandling eller utreds för någon form av sjukdom

Inklusionskriterium har varit hundar som är 4 år eller äldre samt väger 5 kg eller mer.

Exklusionskriterium är behandling med Ypozane de senaste 6 månaderna.

Prostata undersöktes med ultraljud enligt medföljande protokoll (se bilaga 1) på samma sätt för alla deltagande hundar. Längd, bredd samt djup har uppmätts 3 gånger vardera i longitudinell (längd) samt transversal (djup samt bredd) projektion. Ett medelvärde räknades sedan ut för varje hund. Maximal normalvolym beräknades för varje individ utifrån vikt och ålder med användning av Ruel et al's (1998) formel $V_{\max_{\text{normal}}} = (0.867 \times \text{vikt i kg}) + (1.885 \times \text{ålder i år}) + 15.88$. $V_{\max_{\text{normal}}}$ jämfördes sedan med beräknad volym enligt en formel som utgår från prostatas storlek uppmätt med ultraljud (baserat på medelvärden för längd (L), bredd (W) samt djup (D)), $V_{\text{measured}} = ((1/2,6) \times (L \times W \times D)) + 1,8 \text{ cm}^3$ (Kamolpatana *et al.*, 2000). Veterinären fick även fylla i kort information om prostatas form, parenkymets utseende (heterogent eller homogent), cystaförekomst samt övriga iakttagelser (se bilaga 2).

I samband med ultraljudsundersökningen togs ett venöst blodprov. Blodproverna samlades i standardiserade serumrör med hjälp av vacutainer och butterflykanyl. Provtagningen skedde i *v cephalica*. Upp till 8 ml helblod samlades och centrifugerades sedan ned till mellan ca 0,2-2 ml koncentrerat serum. Proverna har därefter skickats in till institutionen för kliniska vetenskaper vid Sveriges Lantbruksuniversitet tillsammans med medföljande remiss från ultraljudsundersökningen och frysts till -70°C i väntan på analys.

Odelis CPSE

Analysen av Odelis CPSE utfördes vid två tillfällen, den 28 november samt 5 december 2014 vid ett av laboratorierna vid institutionen för kliniska vetenskaper vid Sveriges Lantbruksuniversitet. Proverna fördelades mellan 2 stycken analyskit, i varje kit fanns plats

för 41 prover samt kontroller. Alla prover späddes initialt 1:10. Vid första omgången kördes 41 helt unika prover. Vid omgång två kördes 4 prover som behövde högre spädning (1:100 respektive 1:1000), 11 prover där CV-värdet (variationskoefficient) var för högt från första körningen (>10%), en låg-, en hög- och en medelkontroll samt 8 st nya prover.

Analysen som använts är en ELISA, enzymkopplad immunadsorberande analys (eng *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Analysen bygger på kvantifiering och identifiering av ett specifikt antigen, i det här fallet CPSE och har utförts enligt instruktion från tillverkaren (se sammanfattning i bilaga 3). Tillverkaren har satt ett gränsvärde på 61ng/ml som positivt värde för BPH. Testet anges ha en inomkörningsvariation på 1,97-3,06 % och 5,6-6,6 % i mellankörningsvariation.

Statistisk bearbetning

Inhämtade data har sedan analyserats i Excel samt Minitab och bearbetats genom standardiserade statistiska metoder gällande exempelvis medelvärden, standardavvikelser och korrelationer. I analyserna har hundar med ett koncentrationvärde under detekterbar nivå benämnts som 0 ng/ml.

Vid ett normaltest konstaterades att CPSE-koncentrationerna ej var normalfördelade över studiepopulationen varför icke-parametriska tester användes: Spearman's test för korrelation, Kruskal-Wallis för jämförelser mellan grupper.

RESULTAT

Hundar

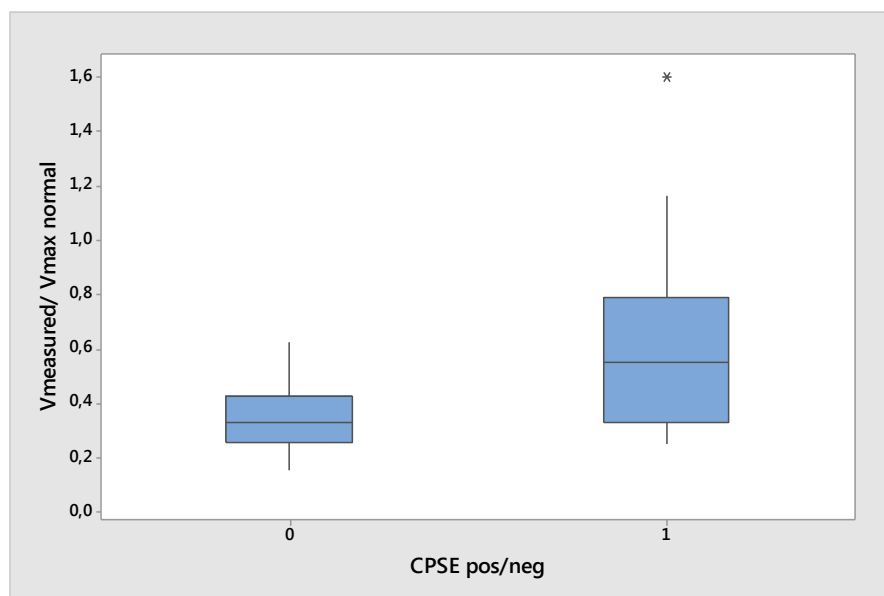
I studien ingick 49 hundar, 6 blandrashundar och 43 hundar fördelade på 29 olika raser. Åldersfördelningen var 4-13 år (medel 7,39 SD 2,61) och hundarna låg inom viktspannet 5,6-48,6 kg (medel 24,4 SD 13,02), se tabell 1. Hundarna delades in i 3 olika kategorier utifrån sin kliniska status där 6 av 49 hade kliniska symtom på prostatabesvär (defekeringssvårigheter, n=2, avsmalnad avföring, n=1, hematuri, n=2, samt urinläckage, n=1), 16 av 49 utreddes eller behandlades för annan pågående sjukdom och 27 var kliniskt friska. Se tabell 1 för mer utförlig data om deltagande hundar

Prostatastorlek mätt med ultraljud

Prostatavolymererna i studien varierade från 5,46 cm³ till 109,7 cm³ med ett medelvärde på 25,0 cm³ och median på 20,8 cm³. Enligt mätningarna hade endast två av de 49 hundarna (4 %) förstorad prostata baserat på uträkningarna för maximal normalstorlek för prostata hos den aktuella individen enligt formeln $((0.867 \times \text{vikt i kg}) + (1.885 \times \text{ålder i år}) + 15.88)$. 26 hundar (53 %) bedömdes ha ett heterogent parenkym och 23 ett homogent. Av 49 hundar hade 28 stycken (57 %) cystor och 21 hade det inte.

CPSE-koncentration

Koncentrationsvärdena för CPSE varierade från 0 ng/ml till 4510 ng/ml. Medelvärdet låg på 224 ng/ml (SD 667) och medianen 48,5 ng/ml. Se tabell 1 för specifika värden på alla deltagande hundar. Av de 49 hundarna låg 21 hundar (43 %) över gränsen för BPH, 61ng/ml, och 28 hundar under.



uppskattade normalvärdet.

Diagram 1 visar en jämförelse mellan storleksförhållandet ($V_{\text{measured}}/V_{\text{max normal}}$) och förekomst av BPH (enligt Odellis CPSE-analysen) där hundar över koncentrationen 61 ng/ml fått benämningen 1 och hundar med koncentration under 61 ng/ml fått benämningen 0. Fem av hundarna med kliniska tecken visade sig ha förstorad prostata vid ultraljudsundersökning och/eller förhöjda CPSE-koncentrationer. Den sjätte låg inom normalgränsen för både storlek samt CPSE-koncentration. Alla sex av hundarna hade cystaförekomst i prostata.

Tabell 1. Information om medverkande hundar. Ras, ålder, patientkategori, cystaförekomst, uppmätt storlek via ultraljud, förhållande mellan uppskattad maximal normalstorlek och uppmätt volym via ultraljud samt CPSE-koncentration.

Ras	Ålder (år)	Vikt (kg)	Kat.	Parentym	Cysta	Antal cystor	L _{medel}	W _{medel}	D _{medel}	L _{medel} /L _{normal}	W _{medel} /W _{mal}	D _{medel} /D _{mal}	V _{measured} (cm ³)	V _{measured} /V _{maxnormal}	Koncentration CPSE ng/ml
Shetland Sheepdog	4	9,5	3	Homogent	Nej	0	2,5	3,6	2,6	0,56	0,85	0,86	10,61	0,33	102,9
Blandras	13	31	3	Homogent	Ja	>5	4,8	4,2	3,5	0,70	0,70	0,74	29,13	0,43	48,5
Dalmatiner	7,5	30	3	Heterogent	Ja	1-5	2,9	3,6	3,3	0,47	0,65	0,78	14,72	0,26	61
Mittel spietz	4	6,3	3	Homogent	Nej	0	2,4	2,9	2,3	0,57	0,70	0,80	7,90	0,27	45,5
Blandras*	12	23,7	1	Heterogent	Ja	>5	4,0	5,1	3,5	0,64	0,91	0,82	29,67	0,50	480
DV schnauzer	9	8	2	Heterogent	Ja	>5	3,3	3,7	2,5	0,65	0,80	0,75	13,44	0,34	25,1
Västgöta spets*	9	12,6	1	Heterogent	Ja	1-5	6,3	5,2	2,3	1,20	1,08	0,64	30,88	0,70	4510
Finsk lapphund	4,5	20	3	Heterogent	Ja	1-5	2,4	3,6	2,5	0,48	0,76	0,70	10,23	0,24	21,2
Svensk lapphund	11	19	3	Homogent	Nej	0	3,8	3,3	3,1	0,64	0,62	0,77	16,67	0,31	127
Vorsteh	5	32	3	Homogent	Nej	0	4,4	4,7	3,4	0,76	0,86	0,84	28,72	0,54	137,7
Svensk lapphund	6	16,3	3	Homogent	Nej	0	3,6	2,9	2,3	0,71	0,61	0,66	10,89	0,26	25,4
Tax	9	10,1	3	Heterogent	Ja	1-5	3,1	3,3	2,7	0,60	0,70	0,77	12,26	0,29	76,7
Finsk lapphund	6	12,4	3	Homogent	Nej	0	2,5	2,6	1,7	0,51	0,56	0,51	5,91	0,16	<Min
Schäfer	7	41	3	Homogent	Nej	0	3,8	3,9	3,6	0,58	0,64	0,77	21,93	0,34	29,4
Labrador*	7,5	27,7	1	Heterogent	Ja	>5	8,5	5,5	3,4	1,44	1,02	0,83	63,11	1,17	1346
Bauceron	6,5	46,5	3	Heterogent	Ja	>5	6,6	6,8	6,2	0,97	1,10	1,29	109,71	1,60	472
Cattledog	6,5	20,3	3	Heterogent	Ja	1-5	4,0	4,2	3,0	0,75	0,85	0,82	21,36	0,47	132,7
Petit brabancon	4	6,2	3	Homogent	Nej	0	2,7	2,8	2,0	0,64	0,68	0,71	7,69	0,27	47,5
Border Collie	10,5	36,5	3	Heterogent	Ja	1-5	4,2	4,4	3,8	0,62	0,73	0,81	29,12	0,43	399
Blandras	5,5	39,6	3	Heterogent	Ja	>5	4,7	5,3	4,3	0,75	0,92	0,96	42,85	0,71	101,8
Border Collie	8,5	21,3	3	Heterogent	Ja	>5	6,2	4,5	4,0	1,09	0,87	1,03	45,24	0,90	694
Blandras	4	30,4	3	Heterogent	Ja	>5	4,7	4,6	4,4	0,85	0,88	1,11	38,40	0,77	106
Irländsk setter	10	38,5	3	Heterogent	Nej	0	4,0	3,7	2,9	0,58	0,61	0,60	18,20	0,27	<Min
Schäfer	5,5	40	3	Heterogent	Ja	1-5	4,6	5,4	3,1	0,72	0,92	0,70	31,14	0,51	35,1
Irländsk setter	4,5	34	3	Heterogent	Ja	1-5	3,5	3,8	2,7	0,60	0,70	0,65	15,65	0,29	<Min
Whippet	10,5	17,2	3	Heterogent	Ja	1-5	4,4	3,5	2,6	0,77	0,67	0,68	17,30	0,34	27,4

Ras	Ålder (år)	Vikt (kg)	Kat.	Parentym	Cysta	Antal cystor	L _{medel}	W _{medel}	D _{medel}	L _{medel} /L _{normal}	W _{medel} /W _{nor} mal	D _{medel} /D _{nor} mal	V _{measured} (cm ³)	V _{measured} /V _{max} normal	Koncentration CPSE ng/ml
Coton de tuléar	7	7,4	3	Heterogent	Ja	1-5	2,6	3,1	2,3	0,54	0,70	0,74	8,90	0,25	123,6
Papillon	9,5	5,6	3	Homogent	Nej	0	2,8	3,4	2,6	0,56	0,75	0,79	11,26	0,29	113,2
Blandras*	9	41	1	Heterogent	Ja	1-5	6,0	4,8	4,5	0,87	0,77	0,94	51,20	0,75	545
Rottweiler	4	46,9	3	Heterogent	Ja	1-5	5,9	5,0	4,6	0,91	0,84	0,99	53,96	0,84	122,4
Am Staffordshire Bullterrier	4	29,9	3	Heterogent	Ja	1-5	4,4	4,6	3,6	0,80	0,89	0,91	29,76	0,60	44
Am Staffordshire Bullterrier*	10	16,5	1	Heterogent	Ja	>5	5,9	5,8	2,3	1,05	1,13	0,61	32,35	0,66	357
Rottweiler	4	47	2	Homogent	Nej	0	3,4	4,7	3,1	0,53	0,78	0,67	20,85	0,32	46,3
Kelpie	6	20,2	2	Heterogent	Nej	0	3,4	3,6	2,9	0,64	0,74	0,79	15,29	0,34	63
Blandras (GoldenFlat)	7	37	2	Homogent	Ja	1-5	2,8	3,6	2,9	0,44	0,62	0,64	12,92	0,21	<Min
NSDTR (Tollare	5	22,4	2	Heterogent	Nej	0	4,3	4,7	3,3	0,81	0,96	0,91	27,69	0,62	<Min
Golden retriever	9	36,8	2	Homogent	Ja	>5	6,1	5,2	4,3	0,92	0,87	0,94	54,45	0,84	143,5
Australiensisk terrier	12	7,3	2	Homogent	Ja	>5	2,9	3,3	2,3	0,53	0,67	0,64	10,03	0,22	<Min
Tax	11	6,6	2	Homogent	Nej	0	3,2	3,7	2,8	0,61	0,79	0,81	14,66	0,35	55,2
CKCS (cavalier)	6	9,7	2	Homogent	Nej	0	2,9	2,8	2,3	0,62	0,64	0,72	9,07	0,25	<Min
Storpuddel	4,5	24,4	2	Homogent	Nej	0	3,4	3,9	2,8	0,64	0,77	0,76	15,82	0,35	25,7
Blandras	6	6,3	2	Homogent	Nej	0	2,0	2,6	1,8	0,45	0,61	0,60	5,46	0,17	27,3
Pointer*	8,5	24	1	Homogent	Ja	>5	5,1	4,8	2,9	0,87	0,90	0,72	28,89	0,55	53,6
Labrador	4	28,5	3	Homogent	Nej	0	4,2	4,7	3,3	0,78	0,92	0,85	26,98	0,56	114
Labrador	9	35,1	2	Homogent	Nej	0	4,8	3,7	3,4	0,73	0,63	0,75	25,12	0,40	<Min
Golden retriever	10	32	2	Heterogent	Ja	1-5	5,1	5,2	3,7	0,78	0,88	0,82	39,05	0,62	<Min
Finsk lapphund	8	19,3	2	Homogent	Nej	0	3,0	3,3	2,5	0,54	0,65	0,67	11,45	0,24	19,1
Tax	5	12,5	2	Heterogent	Ja	1-5	3,6	3,0	2,7	0,76	0,66	0,85	12,95	0,36	47,3
Golden retriever	11	48,6	2	Homogent	Nej	0	4,6	3,7	3,5	0,61	0,55	0,66	24,74	0,31	33,8

* = hundar med kliniska tecken på prostatabesvär

Korrelation mellan CPSE-koncentration och övriga parametrar

Ålder och vikt

Det var en låg, icke-signifikant korrelation (0,112 P=0,444) mellan ålder och CPSE-koncentration. Samma sak sågs för vikten där korrelationskoefficienten låg på 0,075 (P=0,607).

Patientkategorier

En skillnad sågs i mediankoncentrationen av CPSE mellan de olika grupperna (P<0,01). I grupp 1, det vill säga för hundar med kliniska tecken på prostatasjukdom, var mediankoncentrationen betydligt högre (513 ng/ml) jämfört med grupp 2 och 3 (25 ng/ml respektive 77 ng/ml). Se tabell 2 för mer detaljerad information.

Tabell 2 – deskriptiv statistisk för de olika patientkategorierna, IQR (inter-quartile range) - spridningsmått

Patientkategori	N	Min	Medel	Max	Median	IQR
1	6	54	1215	4510	512,5	1209
2	16	0	30,4	143,5	25,4	23,5
3	27	0	118,8	694	76,7	76

Prostatastorlek

Det var en stark statistisk signifikans för korrelationen mellan samtliga storleksparametrar och CPSE-koncentrationen. Störst korrelation gick att finna mellan CPSE-koncentrationen och kvoten mellan uppmätt volym och beräknat maximalt normalvärde för prostatavolymen. För de enskilda måttangivelserna ses störst korrelation mellan bredden (W) och koncentrationen CPSE. Se tabell 3 för värden för respektive korrelation, och diagram 2 för illustration av sambandet mellan CPSE-koncentrationen och den uppmätta storleken enligt V_{measured} .

Tabell 3 – korrelation mellan storleksförhållanden samt CPSE-koncentration

Parametrar	Korrelationskoefficient	P-värde
CPSE-koncentration och L_{medel}	0,458	0,001
CPSE-koncentration och W_{medel}	0,484	<0,001
CPSE-koncentration och D_{medel}	0,388	0,006
CPSE-koncentration och V_{measured}	0,523	<0,001
CPSE-koncentration och $V_{\text{measured}}/V_{\text{maxnormal}}$	0,606	<0,001

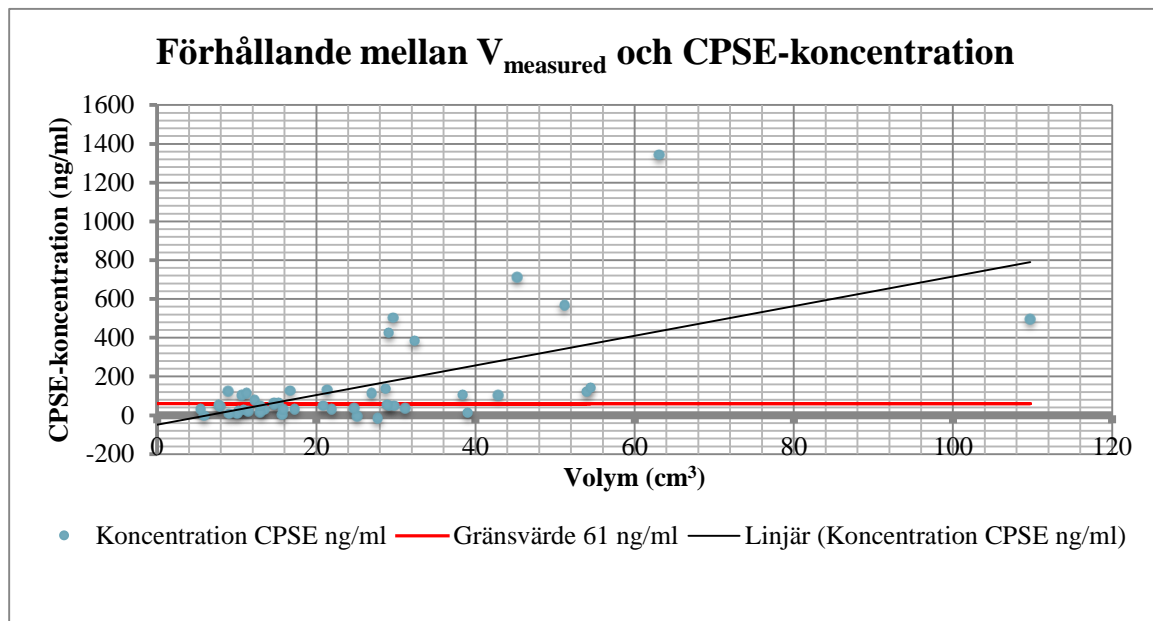


Diagram 2 – förhållandet mellan uppmätt volym (V_{measured}) och CPSE-koncentration

Parenkymets utseende och förekomst av cystor

CPSE-koncentrationen skiljde sig signifikant mellan hundar med heterogent parenkym (medianvärdet 89 ng/ml, IQR=222) och homogent (medianvärde 45,5 ng/ml IQR=61), $P=0,05$. Det var även en signifikant skillnad ($P=0,025$) i CPSE-koncentration mellan hundar med cystor (medianvärde 89 ng/ml IQR=209) och hundar utan cystor (medianvärde 33,8 ng/ml IQR=46)

BPH enligt Odelis CPSE

För det kommersiella testkitet Odelis CPSE har tillverkarna rekommenderat ett gränsvärde på 61 ng/ml för diagnostisering av BPH. Av 49 hundar låg 21 hundar över gränsen på 61 ng/ml och 28 hundar under. Det innebär att prevalensen i den aktuella studiepopulationen för BPH skulle vara 43 %. Enligt storleken uppmätt vid ultraljudsmätningarna jämfört med de uppskattade maximala värdena för normalstor prostata baserad på ålder och vikt enligt Ruel et al 1998, skulle dock endast 4 % (2 av 49) av hundarna klassificeras som att de hade förstorad prostata.

DISKUSSION

Sjukdomen benign prostatahyperplasi

Sjukdomen benign prostatahyperplasi är svår att definiera. Många författare är överens om att BPH kräver vävnadsbiopsi för att ställa en definitiv diagnos men att metoden är för invasiv och att det istället bör ställas som en sannolikhetsdiagnos när det är möjligt. Kriterierna för konstaterad BPH skiljer sig mycket mellan olika studier och definitionen av frisk och sjuk saknas i de allra flesta fallen. Detta har gjort att det är mycket svårt att i den här studien svara på om CPSE-koncentrationerna varit användbara vid en diagnostisering av BPH i och med att det inte gått att med säkerhet säga om hunden lider av BPH eller inte. Är det bara den kliniska formen av sjukdomen som ger synliga kliniska tecken som bör räknas, en mätbar storleksökning, en förhöjning av mätbara serumnivåer av CPSE och/eller kombinationer av ovanstående?

Hos medverkande hundar i studien är det ett stort antal (28/49) som har cystor i prostata men majoriteten av dessa uppvisar inga kliniska tecken på prostatabesvär. Endast 6 av hundarna med cystor hade kliniska besvär som skulle kunna kopplas till prostata. Dock har alla sex hundar med kliniska besvär cystor.

Storleksangivelser

Det förekommer ett flertal olika formler för storleksberäkning av prostata. Många använder sig av (Ruel et al., 1998) formel $V_{\max_{\text{normal}}} = (0.867 \times \text{vikt i kg}) + (1.885 \times \text{ålder i år}) + 15.88$ för att beräkna ett maximalt normalvärde för prostata. Denna formel har i denna studie genererat mycket höga volymgränser och endast 2 hundar hade volymer som överskred den föreslagna maximala normalgränsen. Dock talar formeln endast om det uppskattade maximala normalvärdet utifrån hundens ålder och vikt vilket innebär att flera medverkande hundar kanske egentligen har en förstorad prostata. Denna formel tar inte heller någon hänsyn till exempelvis hundens ras och frågan är hur tillförlitliga gränsvärdena egentligen är.

Många av hundarna hade kraftigt förhöjda CPSE-koncentrationer men låg enligt volymberäkningen under den maximala normala prostatavolymen. Det är därmed diskutabelt hur väl formeln korrelerar till verkligheten och framförallt hur användbar den egentligen är i detta sammanhang. I efterhand hade det kanske funnits bättre storleksmodeller att använda sig av till studien alternativt låtit ultraljudande veterinärer uttala sig om ifall de anser att en prostatomegali föreligger eller inte.

Studieunderlaget

Medverkande hundar i studien representerar en bra spridning både vad gäller ålder, ras, vikt och klinisk status. Kriterierna för vilka hundar som kunde delta sattes till intakta hanhundar, 4 år eller äldre med en vikt på 5 kg eller mer som ej behandlats med Ypozane senaste 6 månaderna.

Kriterierna för medverkan sattes till ovan nämnda parametrar utifrån den typiska kliniska presentationen för BPH. 4 år eller äldre sattes för att benign prostatahyperplasi har en kraftig korrelation till ökande ålder och framförallt förekommer hos medelålders till äldre hundar

(Brendler *et al.*, 1983; Berry *et al.*, 1986; Lowseth *et al.*, 1990) (Johnston *et al.*, 2000). Kriteriet att hunden skulle väga 5 kg eller mer sattes för att prostata kan vara svår att mäta korrekt på alltför små hundar (Atalan *et al.*, 1999; Leroy, 2013).

Det har dock varit svårt att få in tillräckligt stort antal i och med en betydande mängd av hundar inom kriterieramarna visade sig vara kastrerade.

Felkällor

Leroy (2013) har undersökt reproducerbarheten mellan olika ultraljudsdiagnostiker. De såg att differensen mellan upprepade undersökningar hos en enskild diagnostiker var försumbar men att skillnaden mellan olika diagnostiker var av mer betydande karaktär, framförallt om dessa hade olika kompetens och erfarenhet. För att få så stor säkerhet som möjligt mellan mätvärdena i denna studie, trots olika veterinärer med olika utrustningar, användes ett standardiserat protokoll som alla diagnostiker följde. Innan studien startade kontrollerades att utrustningen var adekvat för ändamålet och att diagnostikerna hade tillräcklig kompetens och erfarenhet.

För provhanteringen så anger tillverkaren av Odelis CPSE att serumproverna bör komma till labbet och frysas inom 48 timmar. För majoriteten av proverna i denna studie har det maximalt gått 24 timmar mellan centrifugering och infrysning men en del prover har skickats via post och kan ha legat i posten över helgen före infrysning.

Vid första laborationen var det en del resultat som hade en för hög variationskoefficient (CV-värde) för att räknas som acceptabelt. Detta berodde troligen på att laborationsteknikern var oerfaren på arbetsgången vid en ELISA. Då proverna kördes om med erfaren personal så låg samtliga CV-värden under 10 %.

Odelis CPSE

Testet Odelis CPSE som Virbac tillverkar har använts för analysen av CPSE-koncentrationerna i denna studie. Testet har funnits på marknaden sedan 2009 och är därmed fortfarande relativt nytt. Det finns i dagsläget endast en publikation om analysen (Leví & Mimouni, 2009) och tyvärr kan det tyckas att den är något knapphändig i sin beskrivning av hur studien gått till.

Enligt Leví & Mimouni (2009) kan följande slutsatser dras av studien

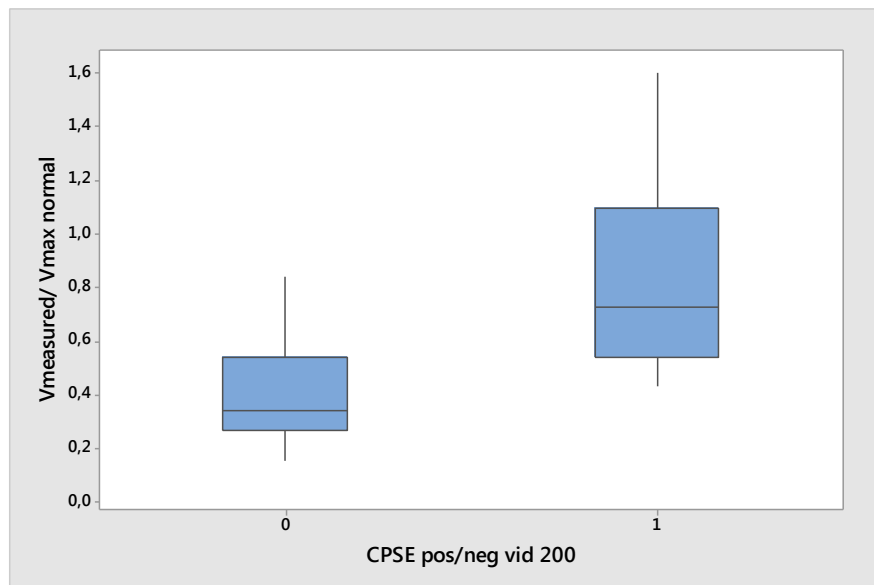
- ”Odelis CPSE är ett lovade diagnostiskt verktyg för utredning av hund med misstänkt BPH eller för övervakning av hund under medicinsk behandling”.
- ”Om en hund lider av adenocarcinom i prostata eller prostatit utan samtidig BPH förblir CPSE-nivåerna negativa”.
- ”Testet har hög signifikans
 - Sensibilitet – $33/(33+1) \rightarrow 97,1 \%$
 - Specificitet – $51/(51+4) \rightarrow 92,7 \%$ ”

Andra studier exempelvis Bell *et al.* (1995) har inte sett någon signifikant skillnad i CPSE-

koncentrationerna i serum mellan hundar med BPH jämfört med hundar med prostatit eller prostatacarinom på samma sätt som Leví & Mimouni (2009) såg i sin studie.

Studieresultat

Tillverkaren rekommenderar ett gränsvärde för diagnostisering av BPH på 61 ng/ml. Resultaten i denna studie indikerar att detta värde är satt lite väl lågt. Det förekommer stora överlappningar mellan de positiva och negativa grupperna vad gäller prostatastorlek. Bara genom att justera gränsvärdet till exempelvis 200 ng/ml ser fördelningen mellan värdena betydligt mer sannolik ut (se diagram 3). Det finns dessvärre inte någon förklaring i Leví & Mimounis (2009) studie som förklarar hur de nått fram till gränsvärdet 61 ng/ml.



Studien har ej berört nivåerna av CPSE vid andra prostataförändringar så som prostatit eller maligna prostataneoplasier. Bell *et al.* såg i sin studie 1995 att serumkoncentrationerna av CPSE hos intakta hanhundar med BPH låg signifikant högre än hos hundar med normal prostata. Däremot kunde de inte se någon signifikant skillnad i koncentrationerna hos hundar med prostatit eller carcinom jämfört med BPH vilket kan ifrågasätta det diagnostiska värdet av CPSE-analys. Det finns ett värde i att kunna särskilja BPH från normala hundar men det är oklart om det är användbart för att särskilja mellan BPH och övriga prostatalidanden. Det skulle dock kunna förklaras av att studieunderlaget var för litet eller att hundarna med prostatit eller carcinom led av en samtidig BPH.

Resultatet från denna studie tyder på att det finns stor spridning av CPSE-koncentrationen både hos hundar med prostata som klassas som normalstor samt hos hundar med hundar nära övre normalgränsen eller över. I och med att definitionen av BPH är oklar är det mycket svårt att säga något om korrelationen mellan CPSE-värde och BPH. Troligtvis behövs ett större studieunderlag, fler fall med konstaterad BPH samt en tydlig definition av vad som bör räknas som benign prostatahyperplasi för att kunna utvärdera det kliniskt diagnostiska värdet av Odelis CPSE. Resultaten visar dock på att det finns en korrelation mellan förändrade CPSE-koncentrationer och storleksmått på prostata medan effekten av exempelvis hundens vikt och ålder inte var signifikant. Även en tydlig effekt av cystaförekomst på CPSE-koncentration sågs. Frågan är dock om detta beror på att cystbildning genererar en ökning av prostatas

storlek med ökad risk för läckage eller om det är förekomsten av BPH som i sin tur predisponerar för cystbildning?

Konklusion

Resultaten från studien visar på att det finns korrelation mellan prostataförändringar så som ökad storlek, parenkymets utseende samt cystaförekomst och ökade CPSE-nivåer. Det krävs dock fler och större studier innan det helt går att uttala sig om det faktiska diagnostiska värdet av analysering av CPSE vid BPH. Undertecknad är dock relativt positiv till att det skulle kunna vara till hjälp att analysera CPSE för att diagnosticera prostatalidanden mer generellt än vad det kanske är för att diagnosticera specifikt just BPH.

REFERENSER

- Atalan, G., Holt, P.E. & Barr, F.J., 1999. Ultrasonographic estimation of prostate size in normal dogs and relationship to bodyweight and age. *Journal of Small Animal Practice*, 40, pp.119-22.
- Atalan, G., Holt, P.E., Barr, F.J. & Brown, P.J., 1999. Ultrasonographic estimation of prostatic size in canine cadavers. *Research in Veterinary Science*, 67, pp.7-15.
- Barsanti, J.A. & Finco, D.R., 1986. Canine Prostatic Diseases. *Veterinary Clinics of North America, Small animal Practice*, 16(3), pp.587-99.
- Barsanti, J.A. & Finco, D.R., 1995. *Canine Prostatic Diseases*. 4th ed. Saunders.
- Bell, F.W. et al., 1995. Evaluation of Serum and Seminal Plasma Markers in the Diagnosis of Canine Prostatic Disorders. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 9(3), pp.149-53.
- Berry, S.J., Coffey, D.S. & Ewing, L.L., 1986. Effects of Aging on Prostate Growth in Beagles. *American Journal of Physiology*, 250(6 Pt 2), pp.1039-46.
- Borthwick, R. & Mackenzie, C.P., 1971. The Signs and Results of Treatment of Prostatic Disease in Dogs. *The Veterinary Record*, 89(14), pp.374-84.
- Brendler, C.B. et al., 1983. Spontaneous Benign Prostatic Hyperplasia in Beagle: Age-associated changes in serum hormone levels, and the morphology and secretory function of the canine prostate. *Journal of Clinical Investigation*, 71, pp.1114-23.
- Chadelaine, P., Dubé, J., Frenette, G. & Tremblay, R.R., 1984. Identification of Arginine Esterase as the Major Androgen Dependent Protein Secreted by Dog Prostate. *Journal of Andrology*, (5), pp.206-10.
- Cooney, J.C., Cartee, R.E., Gray, B.W. & Rumph, P.F., 1992. Ultrasonography of the Canine Prostate with Histologic Correlation. *Theriogenology*, 38(5), pp.877-95.
- DeKlerk, D.P. et al., 1979. Comparison of Spontaneous and Experimentally Induced Canine Prostatic Hyperplasia. *Journal of Clinical Investigation*, 64, pp.842-49.
- Dube, J., Lazure, C. & Tremblay, R., 1986. Dog Prostate Arginine Esterase is Related to Human Prostatic Specific Antigen. *Clinical and Investigative Medicine*, (9), pp.51-54.
- Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J., 2010. *Textbook of Veterinary Anatomy*.
- Feeney, D.A. et al., 1987. Canine Prostatic Disease - Comparison of Radiographic Appearance with Morphological and Microbiologic Findings - 30 cases (1982-1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190(8), pp.1018-26.
- Gordon, N., 1960. Surgical Anatomy of the Bladder, Prostate Gland and Urethra in the Male Dog. *Journal of American Veterinary Medicine*, 136(3), pp.215-21.
- Howard, E. & De Lahunta, A., 2013. *Miller's Anatomy of the Dog*. 4th ed. St Louis, Missouri: Elsevier.
- Johnston, S.D., Kamolpatana, K., Root-Kustritz, M.V. & Johnston, G.R., 2000. Prostatic Disorders in the dog. *Animal reproduction science*, (60-61), pp.405-15.
- Kamolpatana, K., Johnston, G.R. & Johnston, S.D., 2000. Determination of Canine Prostatic Volume Using Transabdominal Ultrasonography. *Veterinary radiology and Ultrasound*, 41(1), pp.73-77.

- Kustritz, M., 2006. Collection of Tissue and Culture Samples from the Canine Reproductive Tract. *Theriogenology*, (66), pp.567-74.
- Kutzler, M.A. & Yeager, A., 2005. *Prostatic diseases - Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Saunders.
- Lai, C.L. et al., 2008. Comparative Characterization of the Canine Normal Prostate in Intact and Castrated Animals. *Prostate*, 68(5), pp.498-507.
- Leav, I. et al., 2001. Role of Canine Basal Cells in Postnatal Prostatic Development , Induction of Hyperplasia and Sex Hormone Stimulated Growth: and the Ductal Origin of Carcinoma. *The Prostate*, 48, pp.210-24.
- Leroy, C., 2013. Normal Canine Prostate Gland: repeatability, reproducibility, observer-dependent variability of ultrasonographic measurements of the prostate in healthy beagles. *Anatomia histologia embryologia*, (42), pp.355-61.
- Leví, X. & Mimouni, P., 2009. Hyperplasie Bénigne de la Prostate: actualités. *Le Point Vétérinaire*, 293(3), pp.39-43.
- Lowseth, L.A., Gerlach, R.F., Gillett, N.A. & Muggenburg, B.A., 1990. Age-related Changes in the Prostate and Testes of the Beagle dog. *Veterinary Pathology*, (27), pp.347-53.
- Mukaratirwa, S. & Chitura, T., 2007. Canine Subclinical Prostatic Disease: Histological Prevalance and Validity of Digital Rectal Examination as a Screening Test. *Journal of the South African Veterinary Association*, 76(2), pp.66-68.
- O'Shea, J., 1962. Studies on the Canine Prostate Gland - Factors Influencing its size and weight. *Journal of Comparative Pathology*, (72), pp.321-31.
- Ruel, Y., Barthez, P.Y., Mailles, A. & Begon, D., 1998. Ultrasonographic Evaluation of the Prostate in Healthy Intact Dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 39(3), pp.212-16.
- Sirinarumitr, K., 2009. *Kirk's Current Veterinary Theraphy XIV*. Sunders.
- Smith, J., 2008. Canine Prostatic Disease: A Review of Anatomy, Pathology, Diagnosis and Treatment. *Theriogenology*, (70), pp.375-83.
- Vitâlaru, B.A., Bîr Oiu, I.A. & Crînganu, D., 2010. Reserchers regarding the incidence of canine prostate diseases and it's treatment. *Scientific works*, (3-4), pp.469-77.
- Wolf, K. et al., 2012. Testicular Steroids, Prolactin, Relaxin and Prostate Gland Markers in Peripheral Blood and Seminal Plasma of Normal Dogs and Dogs with Prostatic Hyperplasia. *Roproduction Domestic Animals*, 47(6), pp.243-46.
- Zuckerman, S. & Groome, R., 1937. The Aetiology of Benign Enlargement of the Prostate in the Dog. *Journal of Pathology and Bacteriology*, (44), pp.113-24.

Protokoll för ultraljudsundersökning vid CPSE-projektet

Inledning

Ultraljudsundersökning för att bestämma prostatas utseende och storlek har under lång tid ansetts vara ett av de bästa sätten att undersöka prostatastorlek hos hanhund (Atalan, et al. 1999; Leroy, et.al. 2013), Det är en säker, non-invasiv metod som med rätt utrustning och kunnig diagnostiker ger adekvat resultat. För att undvika allt för avvikande resultat mellan olika diagnostiker ska undersökningen utföras enligt följande instruktion. Protokollet är framtaget utifrån tidigare studier inom området (Atalan, et al. 1999; Leroy, et.al. 2013, & Y. Ruel 1998).

Utrustning

För utvärdering av prostataparenkymet används en probe med lägst 7,5 MHz, gärna högre. För mätning av prostatas storlek används så hög frekvens som möjligt som samtidigt gör det möjligt att inkludera hela prostata i ett snitt.

Förberedelser

Undersökningen ska ske via transabdominal undersökning enligt följande instruktion.

1. Hanhunden ligger på rygg under undersökningen, antingen lugn och avslappnad eller under sedering. Det är upp till ultraljudande veterinär att avgöra.
2. Om hunden har kraftig pälsväxt kan ett område strax kranialt om bäckenkanten, på endera sida om penis behöva raka. Om hunden endast har en tunn behåring i området kan undersökningen ev genomföras utan föregående rakning/klippning.
3. Sprit och/eller kontaktgel ska användas för att förstärka bildens kvalité

Utförande

Transabdominell teknik används.

Följande värden tas fram och antecknas i medföljande remiss

OBS! Alla mätvärden ska mätas 3 gånger, ny frysning av bilden ska ske till varje mätning!

1. Utgå från urinblåsans lokalisation, för proben kaudalt tills blåshalsen blir synlig. Strax kaudalt om denna ligger prostata.

Longitudinell sektion

2. Förflytta proben tills maximalt av prostata är synlig i longitudinell riktning. Frys bilden i maximalt läge.
Mät L (maximal längd) från kraniala till kaudala polen av prostata längs med uretras axel.

GÖR OM MÄTNINGARNA 3 GGR OCH FYLL I REMISSEN

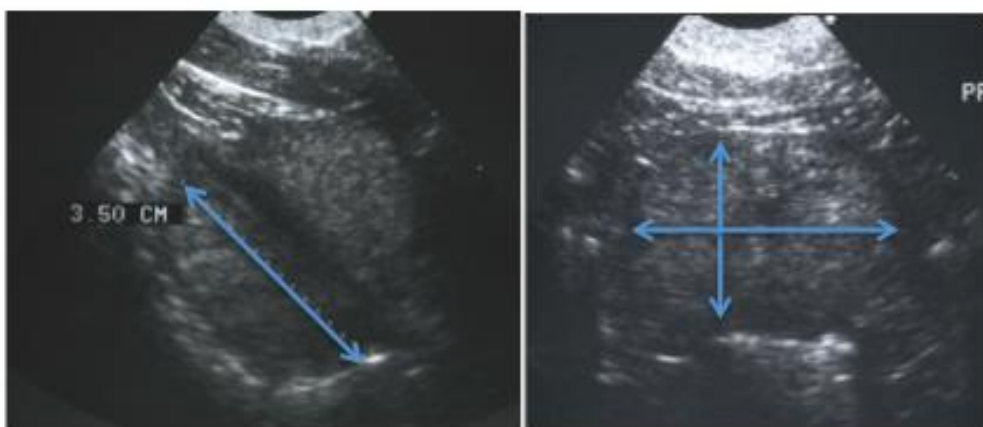
Transversal sektion

3. Roter proben 90° för att få en transversal sektion av prostata.

4. Justera probens läge för att få en så symmetrisk bild som möjligt. Använd uretras centrala placering som riktmärke.
 - a. Mät W (maximala bredden)
 - b. Mät DT (djupet, lodrät mot breddaxeln)

GÖR OM MÄTNINGARNA 3 GGR OCH FYLL I REMISSEN

Hundar där prostata befinner sig helt eller till stor del i bäckenhålan är inte lämpliga att inkludera i studien.



Källförteckning

Atalan, G., P.E. Holt, F.J. Barr, and P.J. Brown. "Ultrasonographic estimation of prostatic size in canine cadavers." *Research in veterinary science* 67 (1999): 7-15.

Leroy, C., et al. "Normal Canine Prostate Gland: repeatability, reproducibility, observer-dependent variability of ultrasonographic measurements of the prostate in healthy beagles." *Anatomia histologia embryologia*, no. 42 (2013): 355-361.

Y. Ruel, P.Y. Barthez, A. Mailles, D. Begon. "Ultrasonographic evaluation of the prostate in healthy intact dogs." *Veterinary radiology & ultrasound* 39, no. 3 (1998): 212-216.

Appendix 2



Appendix 3

ODELIS CPSE

(Baseras på laborationsinstruktioner för Odelis CPSE, Virbac 2009)



Innehåll: platta med microbrunnar, konjugat 12 ml, Kalibrator x4, Kontroll x4, Spädningsbuffer 60 ml, Koncentrerad sköljlösning 11 ml (måste spädas 1:1000 innan användning), Substrat TMB (tetrametyl benzidin) 12 ml, Stopplösning 8 ml.

Material: Material från Odelis CPSE-kitet, micropipetter i olika storleksklass, destillerat vatten, engångsbehållare, vortexmixer, avläsare för microbrunnar som har kapacitet för 450 nm,

- 1) Alla prover samt provtagningskitet tas fram och ställs i rumstemperatur minst 30 min innan start
- 2) Alla prover ska köras i dubletter för att minska risken för felaktiga resultat.
96 brunnar i plattan, Cal 0-4 samt kontrollprov + 41 ordinarie prover.
- 3) Späd buffertlösningen 1:100 med destillerat vatten innan användning
- 4) Spädning av kalibrator: X µl buffertlösning tillsätts till kalibratorn → en lösning med CPSE-koncentrationen 500 ng/ml. Låt stå 5 min och vortexa därefter försiktigt.
 - Späd 40µl av 500ng/ml-koncentrationen med 960 µl buffer → lösning med konc. **20 ng/ml**
 - Späd 400µl av 20ng/ml-koncentrationen med 400 µl buffer → lösning med konc. **10 ng/ml**
 - Späd 400µl av 10ng/ml-koncentrationen med 400 µl buffer → lösning med konc. **5 ng/ml**
 - Späd 400µl av 5 ng/ml-koncentrationen med 400 µl buffer → lösning med konc. **2,5 ng/ml**
- 5) Späd kontrollen enligt instruktioner på flaskan
- 6) Späd proverna 1:10 – 30 µl prov med 270 µl buffer. Finns det prover som misstänks kommer ligga högt kan dessa behöva spädas 1:100 samt 1:1000 för att komma med i det mätbara området. Vortexa!
- 7) Placera ut ett grundprov, 100 µl buffertlösning (0ng/ml)
- 8) Placera ut kalibratorerna i respektive brunn, 100µl av varje koncentration (20 ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml, 2,5 ng/ml)
- 9) Placera ut 100 µl av kontrollen
- 10) Placera ut 100µl av respektive prov. Var noga med att rätt prov hamnar i rätt brunn
- 11) Täck över och låt inkubera i 37°C i 1h
- 12) Tvätta brunnarna enligt följande
 - a. Slå ut innehållet i brunnarna
 - b. Deponera 300µl av sköljlösningen i vardera brunn
 - c. Repetera steg a och b 3 ggr → totalt 4 tvättcykler.
- 13) Placera 100µl konjugat (HRP) i vardera brunn
- 14) Täck över och låt inkubera i 37°C i 1h
- 15) Tvätta brunnarna enligt steg 12
- 16) Placera 100 µl TMB i vardera brunn
- 17) Låt reaktionen pågå i 10 min i rumstemperatur men i mörker.
- 18) Stoppa reaktionen med hjälp av 50µl stopplösning till vardera brunn

19) Läs av absorptionsvärdena vid 450 nm