

# Måling af inflammationsmarkører og hæmoglobin hos travheste før og efter løb



Hovedopgave ved uddannelsen til Fagdyrlæge vedr. sygdomme hos heste.

Juni 2010

Dyrlæge Lena Kristensen  
Holstebro Hestepraksis  
Kirkevej 62  
7830 Vinderup

## 1.0 Sammendrag

**Formål:** Serum amyloid A (SAA) er en sensitiv inflammationsmarkør, og måling af SAA og andre akutfasereaktanter hos løbsheste kunne være værdifulde til at opdage inflammationstilstande, særligt med henblik på tidlig diagnose af subkliniske infektions- og inflammationstilstande for hurtig iværksættelse af terapi og muligvis hurtigere helbredelse. **Dyr:** 39 travheste fra 5 forskellige trænere. **Metoder:** SAA, Haptoglobin (Hp), Fibrinogen (Fb), Jern (Fe), hvide blodlegemer (WBC) og Hæmoglobin (Hb) måles i blodprøver udtaget før løb (dag -1), 2 dage efter løb (dag 2) og 7 dage efter løb (dag 7). Rektaltemperaturen blev målt ved hver blodprøveudtagning. **Resultat:** For SAA, Fb, Hb og rektaltemperatur var der ikke nogen statistisk signifikant ændring over tid. Koncentrationen af Fe ( $P=0,011$ ), Hp ( $P=0,039$ ) samt WBC ( $P=0,0011$ ) faldt signifikant i studiet. Faldet i WBC koncentrationen har signifikant korrelation til løbsdistancen ( $P=0,0067$ ), og faldet i WBC bliver større med stigende distance, hvilket også er signifikant ( $P=0,017$ ). For WBC er der også en tendens til en sammenhæng ( $P=0,079$ ) mellem koncentrationsfaldet og stigende hastighed. **Konklusion:** Travhestenes præstation i forbindelse med løbene giver tilsyneladende ikke anledning til subkliniske inflammations-tilstande. Fald i Hp og Fe antages at skyldes arbejdsinduceret hæmolyse og faldet i WBC efter løb tillægges "fysiologisk leukocytose" i umiddelbar forbindelse med løbet og derefter et hurtigt fald.

## 1.1 Summary

**Objective:** Serum amyloid A (SAA) is a highly sensitive marker of inflammation, and therefore measurement of SAA and other acute phase reactants in competing trotters may be valuable in assisting clinical assessment of inflammation. Early recognition of subclinic infections and inflammatory conditions would lead to early institution of therapy possibly facilitating faster recovery. **Animals:** 39 trotters situated in 5 stables. **Methods:** SAA, Haptoglobin (Hp), Fibrinogen (Fb), Iron (Fe), White blood cells (WBC) and Hæmoglobin (Hb) are measured from blood samples taken the day before race (day -1), 2 days after (day 2), and 7 days after race (day 7). Rectal temperature was taken immediately after each blood sampling. **Results:** There were no statistical significant difference for SAA, Fb, Hb and temperature over time. The concentrations of Fe ( $P=0.011$ ), Hp ( $P=0.039$ ) and WBC ( $P=0.0011$ ) decreased significant in this study. There's significant correlation between the decrease in WBC and running distance ( $P=0.0067$ ), and there's significance for a bigger decrease in WBC with increasing distance. WBC also has a tendency to correlate to have a greater magnitude of decrease with faster running speeds ( $P=0.079$ ). **Conclusions:** No obvious signs of sub-clinical inflammation was demonstrated in this study. The decrease in Fe and Hp is presumed to be related to work induced hemolyse. The decrease in WBC after competition is due to physiological leucocytosis in relation to running followed by a rapid decrease.

## 2.0 Indledning

Der findes i Danmark omtrent 5000 travheste, af disse er cirka 2500 aktive løbsheste (kilde DTC). Travhesten starter sin træning og aktive karriere tidligt og allerede fra slutningen af 2 års sæsonen starter travhestene de første løb. Sundhedskontrol, med udtagelse af blodprøver hvor blandt andet muskeltværdi, skeletværdi, hæmoglobin ("blodprocent") og hvide blodlegemer ("infektionstal") måles, har i en årrække været brugt som hjælpemiddel til klinisk vurdering af løbshestene. Væddeløbene antages at være belastende for hestene, og det er derfor interessant at undersøge, om der hos tilsyneladende raske heste kan findes markører for subkliniske inflammationstilstande som tegn på en eventuel overbelastning. Akutfaseresponset hos hest består blandt andet af en række målbare markører og en undersøgelse af disse er derfor relevant for dokumentation af inflammationstilstande (Hulten & Demmers 2002; Jacobsen, Thomsen & Nanni. 2006; Borges 2007; Jacobsen *et al.* 2009)

Serum amyloid A (SAA) er en dokumenteret inflammationsmarkør hos hest (Chavatte *et al.* 1991; Jacobsen, Thomsen & Nanni. 2006; Hobo *et al.* 2007) og en undersøgelse af eventuelle ændringer i denne parameter hos travheste i forbindelse med løb kunne give et diagnostisk redskab til tidligere diagnosticering af inflammationstilstande hos travhestene. Yderligere er også haptoglobin (Hp), fibrinogen (Fb), serum jern (Fe) og hvide blodlegemer (WBC) kendte inflammationsmarkører (Hulten *et al.* 2002; Jacobsen *et al.* 2009), og disse medtages ligeledes i studiet for at sikre en bred undersøgelse af akutfaseresponset. Hb er ikke en inflammationsmarkør, men den medtages i studiet, da den normalt indgår som parameter, når der tages blodprøver til sundhedskontrol af travhestene.

### 2.1 Formål

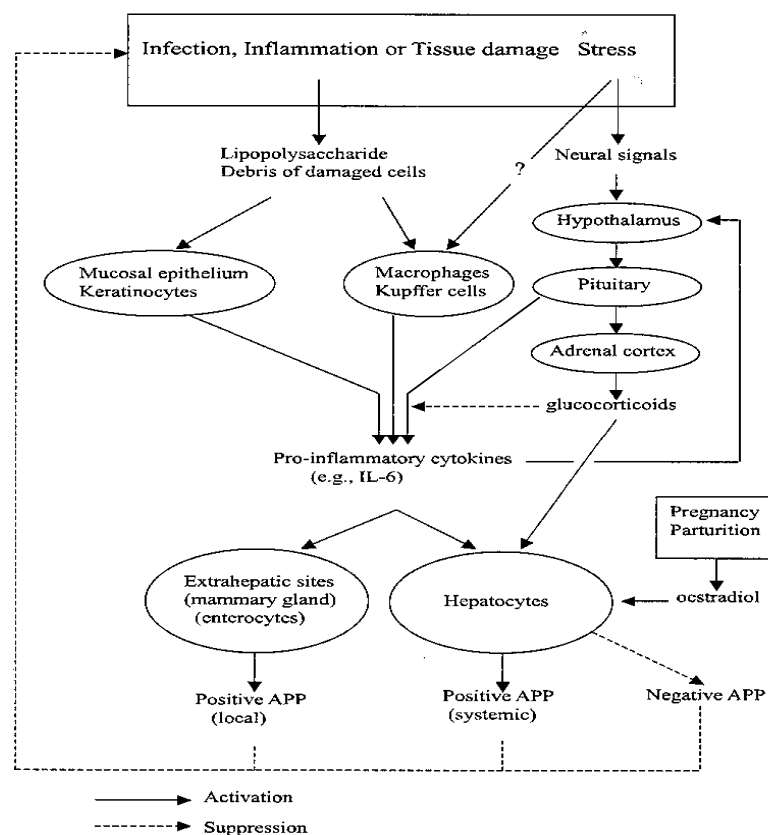
Undersøgelsen har til formål, at validere om akutfaseproteiner kan bruges som inflammationsmarkører ved subkliniske inflammationstilstande hos travheste i forbindelse med løbsaktivitet. Der måles i studiet på følgende parametre: SAA, Hp, Fb, Fe, WBC samt Hb med en måling før og to målinger efter løb. Endvidere noteres rektaltemperaturen efter alle målinger og hestenes køn, alder samt relevante data for deres løbsdeltagelse. Hb er ikke et akutfaseprotein men beskrives sammen med Fe, da disse parametre har tæt relation.

Undersøgelsen tager sigte i, at fastlægge om travheste i aktiv løbsdeltagelse udsættes for belastninger, der fører til ændringer i disse inflammationsmarkører som følge af løbsinducerede inflammatoriske tilstande.

### 3.0 Akutfaserrespons

Akutfaserrespons (ARP) er en non-specifik omvend kompleks og velreguleret fysiologisk reaktion i kroppen. Det udløses af en hvilken som helst form for cellebeskadigelse forårsaget af f.eks. bakterie og virus infektion, parasitinfektion, traume, kirurgi, endotoksin, brandsår, neoplasi eller stress (Pepys *et al.* 1989; Gruys *et al.* 1994; Murata *et al.* 2004; Pollock *et al.* 2005; Jacobsen & Andersen 2007; Crisman *et al.* 2008). Måling af akutfaseproteiner (APP) kan derfor aldrig blive diagnostiske i sig selv, men de kan give værdifuld information i klinisk praksis (Pepys *et al.* 1989).

Ved celle- og vævsbeskadigelse udskilles stoffer, der stimulerer monocytter og makrofager til blandt andet at producere cytokiner, som er proinflammatoriske mediatorer. Cytokinerne interleukin-6 (IL-6), interleukin-1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) og tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) er de centrale mediatorer under APR. Den øgede plasmakoncentration af disse cytokiner stimulerer leverens hepatocytter til at syntetisere og frigive akutfaseproteiner til blodet (Figur 1). Den overordnede funktion af akutfaserespons er at minimere yderligere vævsskade, blandt andet ved at minimere bakterievækst, øge helingen af væv og genoprette homeostasen i kroppen (Murata *et al.* 2004; Jacobsen & Andersen 2007; Crisman *et al.* 2008).



**Figur 1** Induktion og regulering af akutfaseproteinsyntese hos dyr (Murata *et al.* 2004)

### 3.1. Akutfaseproteiner

Akutfaseproteiner (APP) defineres som proteiner, hvis plasmakoncentration ændres med minimum 25% i forbindelse med inflammation (Kushner & Mackiewicz 1993; Gabay & Kushner 1999). De inddeles i positive APP, hvis plasmakoncentration stiger under APR og negative APP, hvis plasmakoncentration falder under APR (Tabel 1). De positive APP udgør langt den største gruppe, og de kategoriseres efter deres respons på stimulering i følgende grupper (Jacobsen & Andersen 2007):

- Major APP er defineret ved at have en meget lav eller ikke målbar plasmakoncentration hos raske individer, og plasmakoncentrationen stiger mere end faktor 10, ofte 100-1000 gange, under APR (Gruys 1994, Petersen 2004; Jacobsen & Andersen 2007). Koncentrationen øges i løbet af få timer, når maksimum værdier indenfor 1-2 dage og falder hurtigt igen i forbindelse med patientens bedring (Pepys et al. 1989; Nunokawa *et al.* 1993). Eneste kendte major APP hos heste er serum amyloid A, SAA (Gruys 1994; Petersen 2004; Jacobsen & Andersen 2007).
- Minor og moderat APP findes altid i plasma hos raske individer og reagerer på APR med mindre stigninger i koncentrationen på 1-10 gange den oprindelige koncentration. Reaktions- såvel som halveringstid er længere for disse end for major APP. Fibrinogen, haptoglobin og CRP fra denne gruppe er eksempler på minor/moderat APP hos hest (Gruys 1994; Petersen 2004; Jacobsen & Andersen 2007).

Albumin og Fe er negative APP hos hesten (Allen & Kold 1988; Jacobsen *et al.* 2009).

Akutfaseprotein	Normal plasma koncentration	Plasma koncentrationer ved inflammatoriske tilstande	Responstid (timer)	
			Start stigning	Peak
<b>Major (10 til flere hundrede el. tusind gange stigning)</b>				
Serum amyloid A (mg/l)	0,5-20	50-800	6-12	48
<b>Moderat (5-10 gange stigning) og minor (0,5-5 gange stigning)</b>				
Haptoglobin (mg/l)	200-1000	400-2700	12-24	72-120
$\alpha$ 1-acid glycoprotein (mg/l)	70-90	100-250	24	72
C-reactive protein (mg/l)	7,5	10-35	24	72-120
Fibrinogen (mg/l)	2000-4000	3000-11.000	24-72	72-144
Ceruloplasmin (mg/l)	300-400	700-900	120	168-336
<b>Negative (fald)</b>				
Albumin (g/dl)	30	27,5	144	192-240

**Tabel 1** Positive og negative akutfaseproteiner (APP) hos hest (Jacobsen 2007)

### 3.1.1 Serum amyloid A

Serum amyloid A (SAA) hos hest er et akutfase apolipoprotein, som produceres primært af hepatocytter ved APR (Hulten *et al.* 1999b). Flere isoformer af SAA er blevet påvist i plasma hos flere arter, inklusive hesten (Hulten *et al.* 1997; Jacobsen *et al.* 2006). Ved laboratorieundersøgelser på gnavere er vist, at et SAA protein, kaldet SAA3, syntetiseres ved APR i mange andre celletyper end hepatocytter (Anon 1999). Denne ekstrahepatiske syntese foregår specielt i endothelceller og epithel på organer, som kommunikerer med det ydre miljø (for eksempel mavetarmkanalen, luftveje og mælkekirtel), hvilket tyder på, at SAA3 spiller en rolle i værtens forsvarsmekanismer og i lokal beskyttelse mod invaderende mikroorganismer (Vreugdenhil *et al.* 1999). Ekstrahepatisk sekretion af SAA3 hos hest er påvist i mælkekirtler (colostrum) og led (synovialvæske) (McDonald *et al.* 2001).

SAA er en objektiv markør for klinisk – og muligvis subklinisk - inflammation og vævsødelæggelse, og er således et potentielt værdifuldt hjælpemiddel til klinisk vurdering af en patient. Plasma SAA niveauet har vist sig at stige ved flere kliniske tilstande hos hesten (Jacobsen & Andersen 2007). Bakterieinfektioner fremkalder en høj SAA koncentration, hvorimod virusinfektioner giver et mere moderat respons (Hulten *et al.* 1999a).

Det er ikke sikkert at SAA niveau påvirkes af alder. Rapporterede aldersafhængige svingninger i SAA niveau er for små til at have praktisk signifikans (Jacobsen & Andersen 2007). Serum amyloid A niveauer hos heste er ikke forskellige mellem køn (Nunokawa *et al.* 1993).

Undersøgelser har vist, at koncentrationen af SAA i både serum og synovialvæske stiger markant hos heste med aktiv infektiøs arthritis eller tenosynovitis, mens dette ikke er tilfældet for heste med osteoarthritis eller osteochondrose (Hulten *et al.* 2002, Jacobsen, Thomsen & Nanni 2006). Eksperimentel induceret non-infektiøs arthritis gav en signifikant stigning i SAA niveau både i serum og synovialvæske indenfor 8-16 timer efter induktion, hvilket bekræfter en lokal syntese af SAA i inflammerede led (Hulten *et al.* 2002, Jacobsen *et al.* 2006).

Ved ikke infektiøse årsager til svaghed hos nyfødte føl (for eksempel præ- og dysmature, neonatal maladjustment syndrom og mekoniumforstoppelse) er der fundet normale (Stoneham *et al.* 2001, Hulten & Demmers 2002) til let forhøjede SAA koncentrationer (Chavatte *et al.* 1991). Måling af SAA er forsøgt anvendt til monitorering ved infektiøse sygdomme hos føl, såsom diarre, lungebetændelse, *Rhodococcus equi* infektion og neonatal svækkelse (Chavatte *et al.* 1991; Stoneham *et al.* 2001; Hulten & Demmers 2002; Cohen *et al.* 2005). En undersøgelse har evalueret SAA koncentrationen hos føl med *Rhodococcus equi* lungebetændelse, og dets anvendelighed til at differentiere mellem normale og syge føl. Resultaterne viste, at SAA målinger to gange om måneden hos føl under en måned gamle ikke var et brugbart screeningsredskab ved *R. equi* infektion (Cohen *et al.* 2005).

Et studie med hesteinfluenza viste, at SAA koncentrationerne steg over de første 48 timer med kliniske tegn og derefter, ved ukomplicerede tilfælde, faldt til normalværdier igen over de følgende 11 til 22 dage. SAA bestemmelserne viste sig som en mere sensitiv indikator for akut infektion end påvisning af virus positive heste ved næsesvabere og korrelerede samtidigt godt med sygdommens ophør (Hulten *et al.* 1999a).

SAA måling er endvidere anvendt som inflammationsmarkør ved EHV-1 infektion, ved *Streptococcus equi* infektion (Pepys *et al.* 1989), ved kolik (Vandenplas *et al.* 2005) og til monitorering af inflammationsgraden hos heste, der har gennemgået forskellige kirurgiske indgreb (Miller *et al.* 2003; Jacobsen *et al.* 2005; Pollock *et al.* 2005; Miller *et al.* 2007).

Det er almindeligt anerkendt humant og hos forsøgsdyr, at fysisk og psykologisk stress forhøjer plasmaniveauet af IL-6 og APP. (Deak *et al.* 1997; Nukina *et al.* 2001) Hos kvæg udsat for fysisk stress er der også dokumenteret forhøjede SAA værdier (Murata & Miyamoto 1993; Alsemgeest *et al.* 1995).

I en fransk undersøgelse hvor 66 heste blev gastroskoperet havde 10 af dem ikke mavesår (kontrolgruppe) og 56 havde mavesår. Hestene med mavesår havde forhøjede SAA værdier (Tabel 2) (Couroucé-Malblanc *et al.* 2009).

Variabler	Galde	Total		%	%	GGT	SAA	Pepsinogen		
	syre	bilirubin	ALKP					mU	Lipase	Amylase
	( $\mu\text{mol/l}$ )	( $\text{mg/l}$ )	( $\text{iu/l}$ )	lever	tarm	( $\text{iu/l}$ )	( $\text{mg/l}$ )	Tyrosine/l	( $\text{iu/l}$ )	( $\text{iu/l}$ )
<b>Kontrol</b>	3,65	18,26	296,75	79,53	8,15	12,38	15,00	64,14	99,00	8,13
<b>gruppe</b>	$\pm 1,17$	$\pm 6,98$	$\pm 102,93$	$\pm 5,46$	$\pm 1,17$	$\pm 4,60$	$\pm 27,88$	$\pm 22,50$	$\pm 64,04$	$\pm 1,89$
<b>Heste med</b>	6,70	34,55	368,55	68,26	15,02	30,89	292,07	51,71	237,06	22,52
<b>mavesår</b>	$\pm 4,09$	$\pm 28,86$	$\pm 195,68$	$\pm 13,44$	$\pm 9,31$	$\pm 58,64$	$\pm 518,77$	$\pm 47,26$	$\pm 533,52$	$\pm 13,68$
<b>P værdi</b>	0,002	0,001	0,079	0,018	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,067	<0,0001	<0,0001
<b>Normal værdi</b>	1,3-7,5	9-21	215-385	68-72	10-14	7-19	ro<20	<50-60	<55	<20

arbejde <100

**Tabel 2** Gennemsnitsværdier og standardafvigelser i nogle variabler hos kontrolgruppe og hos heste med mavesår (Couroucé-Malblanc *et al.* 2009)

### 3.1.2 Haptoglobin

Hp klassificeres som et moderat APP hos hest. Det er et primært leversyntetiseret plasmaprotein som hører til  $\alpha$ -2-fraktionen af globulinerne (Willet & Blackmore 1979). Haptoglobins primære funktion er at danne stabile komplekser med frit hæmoglobin (Hb) i blodet for derved at undgå tab af jern. Hp syntesen stimuleres af frit Hb i blodet, og det resulterende Hp-Hb kompleks er effektivt til at opsamle frit Hb, hvilket forebygger eksternt tab af jern og forhindrer samtidigt Hb's oxidative ødelæggelse af væv (Crisman *et al.* 2008). Hp-Hb komplekset er for stort til renal udskillelse og cirkulerer til leveren, hvor hepatocytterne nedbryder det og tillader genbrug af aminosyrerne samt

jernet fra hæmmolekylet (Dobryszczycka 1993). Hp menes at have en bakteriostatisk effekt ved at begrænse tilgængeligheden af jern, som er essentiel for bakterievækst (Crisman *et al.* 2008).

Hp koncentrationen stiger ved en inflammatorisk tilstand (for eksempel infektion, traume, allergi eller stress)(Crisman *et al.* 2008). Stigning af Hp i serum er dokumenteret ved eksperimentel aseptisk arthritis (Hulten *et al.* 2002), anden eksperimentel lokal aseptisk inflammation (Taira *et al.* 1992), laminitis induceret ved overdrevet kulhydrattildeling (Fagliari *et al.* 1998), inhalation af Equine Influenzavirus type 2 (Kent and Goodall 1991), ved græssyge formodentlig pga. forhøjet cortisol (Milne *et al.* 1991) samt kirurgiske indgreb herunder blandt andet kastration (Kent & Goodall 1991; Taira *et al.* 1992; Pollock *et al.* 2005). Stigningen af Hp er observeret at være 1,5-9 gange normalværdien(Kent & Goodall 1991, Taira *et al.* 1992). Stigningen observeres indenfor 12-24 timer efter et inflammatorisk stimulus og indenfor 2-5 dage opnås maksimal koncentration(Kent & Goodall 1991; Hulten *et al.* 2002; Pollock *et al.* 2005). Ved eksperimentel virusinfektion hos fuldblodsheste observeredes maksimal Hp koncentration først efter 7-10 dage (Kent & Goodall 1991). Koncentrationen af Hp i plasma falder til normalniveauet indenfor 4 uger efter endt stimulus (Taira *et al.* 1992).

Koncentrationen af Hp falder blandt andet ved hæmolytiske tilstande(Allen & Archer 1971) og ved hæmatomdannelse postoperativt, hvorved et eventuelt samtidigt inflammatorisk respons kan maskeres (Warkentin *et al.* 1987). Koncentrationen falder desuden intraoperativt og umiddelbart postoperativt i forbindelse med eksplorativ laparotomi. Dette formodentlig som resultat af kirurgisk induceret blødning og hæmolyse (Eurell *et al.* 1993). Et fald i Hp-koncentrationen er dog også observeret umiddelbart efter universel anæstesi hos anæsteserede heste uden udførsel af kirurgisk indgreb (Kent & Goodall 1991). Plasmakoncentrationen af Hp stiger til normalniveauet igen indenfor 3 måneder efter en induceret hæmolytisk tilstand (Allen & Archer 1971).

I en undersøgelse med 90 fuldblodsheste fra 5 væddeløbsstalde blev udtaget 629 blodprøver over 1 år. Prøverne blev udtaget i hvile på samme tid af dagen og af samme dyrlæge hver gang for at undgå stress. Der observeredes ikke ændring i Hp-niveauet mellem perioden før træningsstart, trænings-, løbs- og udfasningsperioder (Willet & Blackmore 1979). Et andet studie, med fokus på effekten af træning på jernmetabolismen hos fire 4-års fuldblodshingste, har modsat konkluderet, at jo hårdere træning, des større fald i serum jern og Hp koncentrationen. Dette kunne indikere, at hård træning inducerer hæmolyse, hvilket studiet også konkluderer. Anæmi ses dog ikke ved den træningsinducerede hæmolyse, da metabolismen kompenserer ved at øge jernabsorptionen. (Inoue *et al.* 2005) Humant er vist, at serum Hp-værdier faldt ved motion og var signifikant lavere hos mennesker med høj fitness sammenlignet med personer med lav fitness. (Hørder & Hørder 1970; Spitler *et al.* 1984)



### 3.1.3 Fibrinogen

Fb er et af de først beskrevne af APP'er. Fb er et opløseligt glykoprotein, der syntetiseres i leveren. Det klassificeres som et minor APP hos hest med koncentrationer, der kun stiger 1 til 3 gange, startende 24 til 72 timer efter induktion af inflammation. Serum koncentrationen stiger langsomt i forbindelse med en vævsskade og topper først 1-2 uger efter stimulus. Herefter falder koncentrationen af Fb langsomt efter sygdommens ophør. Det relativt brede referenceinterval for Fb koncentrationer hos raske heste (2000-4000mg/l) og en langtrukken responsperiode efter et inflammatorisk stimulus gør, at Fb er et temmeligt ufølsomt APP (Allen & Kold 1988; Auer *et al.* 1989; Hulten *et al.* 2002; Jacobsen *et al.* 2005; Crisman *et al.* 2008). Fb er beskrevet at have mange funktioner. Det er involveret i homeostase, som et forstadium til fibrin, og i vævsreparation, hvor det virker som en matrix til migrationen af inflammations-relaterede celler (Thomas 2000).

Gennem de sidste årtier har Fb været brugt til at diagnosticere og monitorere forskellige inflammatoriske tilstande hos heste. I et studium med 162 føl fra et stutteri med enzootisk *Rhodococcus equi* infektion blev plasma Fb koncentrationer anvendt til at påvise og monitorere *R. equi* lungebetændelse hos føllene. Selvom både målinger af Fb koncentrationer og WBC viste sig at være nyttige til tidlig identifikation af *R. equi* inficerede føl, var WBC koncentration signifikant bedre end måling af Fb koncentration (Giguère *et al.* 2003). Et andet studie evaluerede SAA og Fb koncentrationer hos raske heste eksperimentelt inficeret med *Streptococcus zooepidemicus* og monitorerede udviklingen af lungebetændelsen. Resultaterne indikerede, at SAA responderede hurtigere end Fb på forandringer i kliniske tegn på lungebetændelse (Hobo *et al.* 2007).

Samlet set antyder disse studier, at en ændring i Fb koncentration ikke nødvendigvis er i overensstemmelse med aktuel påvisning af sygdom og dets udvikling. Selvom målinger af plasma Fb koncentration længe har været brugt til påvisning af inflammatoriske sygdomme hos heste, hæmmer dets relativt langsomme APR dets kliniske anvendelighed (Crisman *et al.* 2008).

### 3.1.4 Jern og hæmoglobin

Fe er en negativ akut fase reaktant hos heste og andre arter. Et fald i mikromineralet Fe ved APR mindsker dets tilgængelighed under infektion og anses derfor som en forsvarsmekanisme, da bakterievækst hæmmes (Smith & Cipriano 1987; Auer *et al.* 1989).

Fe findes i mange anatomisk, kemisk og funktionelt forskellige afdelinger i organismen (Geor & Weiss 1993; Andrews & Smith 2000). Den funktionelle pulje indeholder ca. 70% af kroppens totale jernmængde. Det består af hæmoglobin, myoglobin og adskillige andre enzymer, som enten indeholder Fe eller er jernafhængige. Fe lagres primært i knoglemarv, milt og lever, som enten

ferritin, en opløselig form, eller som uopløselige aflejringer (hæmosiderin). Plasma transferrin er det vigtigste jerntransporterende protein i serum (Schwarzwald & Schuback 2004).

Jernindholdet i mange af disse afdelinger kan bestemmes for at vurdere en patients jernmetabolisme. Hb, som er kroppens største jernindhold, er den der oftest måles og rutinemæssigt inkluderes i blodprøver. Ikke desto mindre er hæmoglobin sandsynligvis den mindst sensitive variabel til at opdage jernmangel. Tydelig anæmi ses kun i sene stadier af alvorlig jernmangel (Geor & Weiss 1993; Andrews & Smith 2000). Hb målinger er en upålidelig indikator på fysisk form, på grund af miltens evne til pludselig at udtømme røde blodlegemer (Takagi *et al.* 1974). Serum Fe, ferritin, Fe-bindingskapacitet og evaluering af jernindhold i knoglemarv er mere præcise indikatorer på jernstatus (Carlson 1992; Geor & Weiss 1993; Andrews & Smith 2000; Harvey 2000).

En nyere undersøgelse inkluderede 97 heste hospitaliseret med sygdomme som gav systemisk inflammation, 22 heste med lokal inflammation og 12 klinisk normale heste. Et retrospektivt studie udførtes på de hospitaliserede heste, som fik målt både Fe og Fb koncentrationer ved indlæggelse. Plasma Fe koncentration var lavere hos heste med systemisk inflammation (64 + el. -45 microg/dl) end mindste referenceinterval (105 microg/dl) og var signifikant lavere ( $P=0,001$ ) end værdien i gruppen med lokal inflammation (123 + el. -45 microg/dl) og hos raske transporterede heste (143 + el. -29 micro g/dl). Lav plasma Fe og høj Fb koncentration var begge sensitive indikatorer på systemisk inflammation hos heste med sensitivitet på henholdsvis 90 og 82%. Det blev konkluderet, at måling af Fe koncentration er at foretrække frem for Fb koncentration til at påvise akut inflammation hos heste (Borges *et al.* 2007). Hillman og Finch skriver således også, at den mest sandsynlige årsag til upassende lavt serum Fe er inflammation (Hillman & Finch 1985).

Motion mindsker det tilgængelige jerndepot i kroppen ved at inducere hæmolyse, hvilket potentielt øger jernbehovet. Men forøget jernabsorption kompenserer delvis for de negative følger, særligt når foderet indeholder tilstrækkeligt eller rigeligt jern, som mange normale fodertyper gør. Derfor lider hestene sædvanligvis ikke af jernmangel ved motion. Intensiteten og varigheden af motion har dog muligvis indvirkning på metabolismen af Fe (Inoue *et al.* 2005).

### **3.1.5 Hvide blodlegemer**

Leukocytose (forhøjet WBC) ses hos præstationsheste i forbindelse med septiske og non-septiske inflammationstilstande (Schalm *et al.* 1975; Jeffcott 1977; Becht 1986; Barrelet & Ricketts 2002). Septisk inflammation er oftest forbundet med bakteriel infektion. Hos præstationsheste ses dette mest efter en skade, f.eks. penetrerende sår efterfulgt af cellulitis, septisk arthritis eller tenosynovitis, øvre luftvejsinfektion, og sjældnere ved systemiske bakterielle infektioner. Non-septisk inflammation ses ofte efter en ikke penetrerende skade (f.eks. skade på bløddele, sener, ligamenter eller periost og

traumatisk arthritis eller tenosynovitis) og nogle gange i forbindelse med degenerative ledlidelser (Ricketts 2004).

En af de mest konsekvente virkninger af motion på immunsystemet er leukocytose, som ses hos heste efter anstrengende arbejde (Snow *et al.* 1983; Rose & Allen 1985; Wong *et al.* 1992). WBC tallet stiger i takt med, at intensiteten og varigheden af arbejdet øges (Brenner *et al.* 1998; Kingston 2004). Leukocytosen, som produceres af angst eller muskelaktivitet, kaldes ”fysiologisk leukocytose” (Schalm *et al.* 1975).

Et akut stressrespons inducerer forhøjede plasma cortisol koncentrationer ved at aktivere hypothalamus-hypofyse-binyrebark-aksen (hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis ) (Alexander *et al.* 1996). En forhøjelse i plasma cortisol koncentration er ofte beskrevet at indikere et stressrespons på fysiologiske eller patofysiologiske stimuli såsom transport, motion, skade eller sygdom (Ley *et al.* 1991, 1994; Wong *et al.* 1992; Janssens *et al.* 1995; Bradshaw *et al.* 1996).

I en undersøgelse blev fire Quarter Horse hopper motioneret på løbebånd til udmattelse. Serum cortisol koncentrationer var signifikant forhøjede 30 min. efter arbejdet. Dette tyder på, at hårdt intens arbejde kan resultere i suppression af den celledemedierede immunitet og en mulig rute er gennem forhøjet glukokortikoid niveau i blodet (Kurcz *et al.* 1988).

I et andet studie blev forandringer i fysiologiske parametre hos 10 overtrænede travere undersøgt. Her fandtes et betydeligt fald i plasma cortisol koncentration ved overtræning (Hamlin *et al.* 2002). Leukopeni (lavt WBC) hos præstationsheste ses mest under den akutte fase af en virusinfektion, hvor der måske men ikke nødvendigvis er kliniske tegn (Schalm *et al.* 1975; Jeffcott 1977; Becht 1986; Barrelet & Ricketts 2002).

WBC, som er en klassisk inflammationsparameter, er af flere forfattere beskrevet at være en meget mindre sensitiv inflammationsmarkør end SAA og Fe (Chavatte *et al.* 1991; Stoneham *et al.* 2001; Hultén & Demmers 2002).

## **4.0 Materialer og metoder**

### **4.1 Heste og løbsdata**

I perioden fra 17.10.2009 til 18.11.2009 blev udtaget blodprøver fra 39 travheste i stalden hos 5 forskellige trænere. To heste udgik af studiet, da de blev sendt hjem fra træneren umiddelbart efter løb. De resterende 37 heste var fordelt på 35% hingste, 35% vallakker og 30% hopper i alderen fra 2 til 11 år. Gennemsnitsalderen var lige knapt 5 år. For alle heste blev der efter løbet noteret deres løbshastighed, løbets længde samt hestens eventuelle placering i løbet. Hestene deltog i løb af

følgende længder (med antal af hest i parentes): 1600 m (1 hest), 1640 m (3 heste), 1700 m (5 heste), 1800 m (2 heste), 1900 m (10 heste), 2020 m (1 hest), 2100 m (5 hest), 2140 m (1 hest) og 2500 m (6 heste). Rektaltemperatur blev målt med et digitalt termometer umiddelbart efter hver blodprøveudtagning.

## 4.2 Blodprøver

Der blev udtaget blodprøver fra *Vena Jugularis* dagen før løb samt 2 og 7 dage efter løb. Blodprøverne blev udtaget i hvile på samme tid af dagen (mellem kl. 6.30 og kl. 10.00), inden hestene kom på fold og af samme dyrlæge hver gang. Fra hver hest blev på hvert prøvetidspunkt udtaget to 10 ml serumglas, et 4,5 ml citratglas (eller to 2,7 ml citrat glas), og et 10 ml EDTA-glas. Serum- og citratglassene blev centrifugeret ved 4000 omdrejninger i 10 minutter på en EBA 20 Hettich centrifuge. Herefter blev supernatanten afpipetteret og overført til hver sit cryoglas, som blev mærket med dato, hestens navn, blodprøvenummer (-1, 2, 7) samt henholdsvis serum eller plasma og derefter nedfrosset ved  $-20$  grader. Serum og plasma blev opbevaret ved denne temperatur indtil de blev samlet analyseret.

## 4.3 Laboratorieanalyser

Serum- og plasmaprøverne blev pakket i flamingokasse med tøris og sendt med kurerbil til Centrallaboratoriet på KU Life, hvor SAA, Hp, Fb og Fe blev målt. Måleprincipperne var følgende: SAA: Turbidometrisk, Hp: Colorimetrisk, Fb: Clot-assay, Fe: Ferrozin.

Blod fra EDTA-glasset blev på udtagedagen brugt til at måle Hb og WBC på henholdsvis HemoCue<sup>R</sup> Hb 201<sup>+</sup> og HemoCue<sup>R</sup> WBC analyseinstrumenter efter producentens anvisninger (Hemo Cue Danmark).

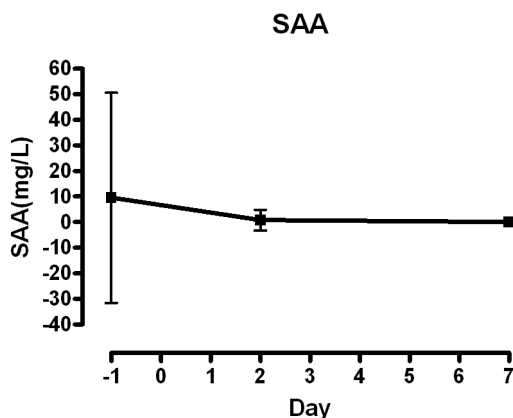
## 4.4 Statistisk analyse

Data er analyseret med en repeated measurements ANOVA (analysis of variance = variansanalyse), hvor markørernes niveau hos hver hest sammenlignes over tid (dvs. der tages hensyn til markørernes udgangsniveau hos den individuelle hest). Markørernes niveauer på de enkelte prøvetidspunkter sammenlignes med Bonferroni's multiple comparison test, og stjernerne på figurerne viser signifikansniveauet af denne test (altså ændringer i forhold til dag -1), hvor \* er  $P < 0.05$  og \*\* er  $P < 0.01$ .

## 5.0 Resultater

### 5.1 SAA

SAA viser i nærværende studie ingen statistisk signifikante forandringer. Værdierne er let forhøjede på dag -1, hvilket kan tilskrives 2 heste med forhøjede værdier (Figur 2).

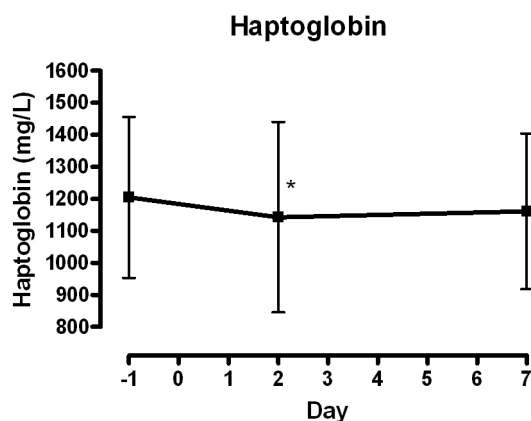


Figur 2 Forandringer i SAA koncentration

### 5.2 Haptoglobin

Haptoglobin har et statistisk signifikant fald i studiet i målingerne dag -1 til dag 2 ( $P=0,039$ ) (Figur 3).

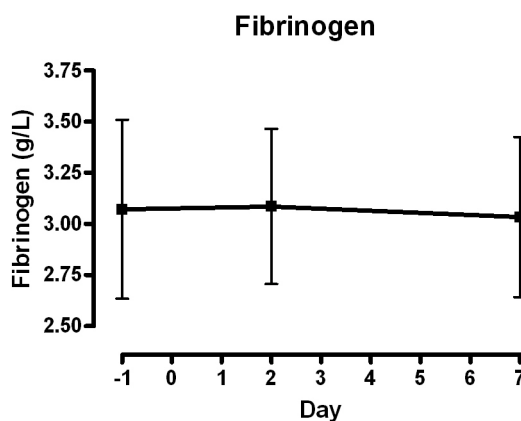
Endvidere er det undersøgt om der kunne påvises sammenhæng mellem koncentrationsfaldet dag -1 til dag 2 og løbslængde eller løbshastighed, men for haptoglobin kan der ikke påvises signifikant korrelation til disse parametre.



Figur 3 Koncentrationsændringer i haptoglobin

### 5.3 Fibrinogen

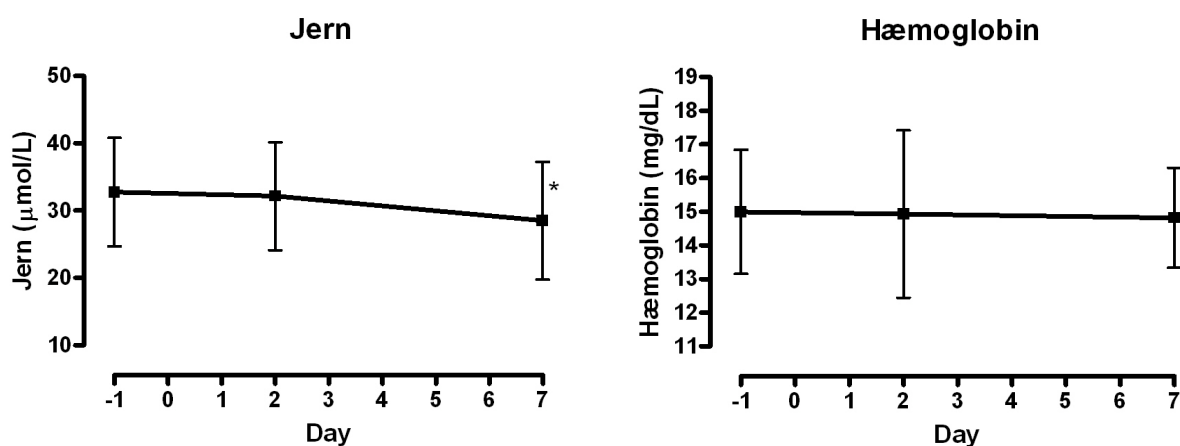
Der kunne for fibrinogen ikke påvises nogen statistisk signifikante forandringer i prøveresultaterne (Figur 4).



Figur 4 Koncentrationsændringer i fibrinogen

## 5.4 Jern og hæmoglobin

Jernkoncentrationen faldt over tid. Bonferroni-testen viste, at serum Fe koncentrationen på dag 7 var signifikant lavere end dag -1 ( $P=0,011$ ), mens koncentrationen på dag 2 ikke var signifikant lavere en koncentrationen på dag -1 (Figur 5). Koncentrationsfaldet i jern dag 7 er forsøgt korreleret mod løbshastighed og løbslængde, men der kunne ikke påvises nogen statistisk signifikante sammenhænge. For hæmoglobin fandtes ingen statistisk signifikant forandringer.

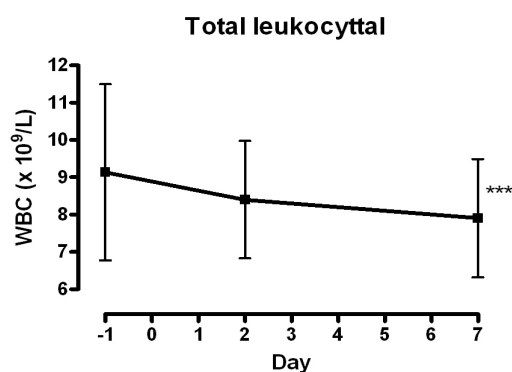


Figur 5 Koncentrationsforandringer af Fe og Hb

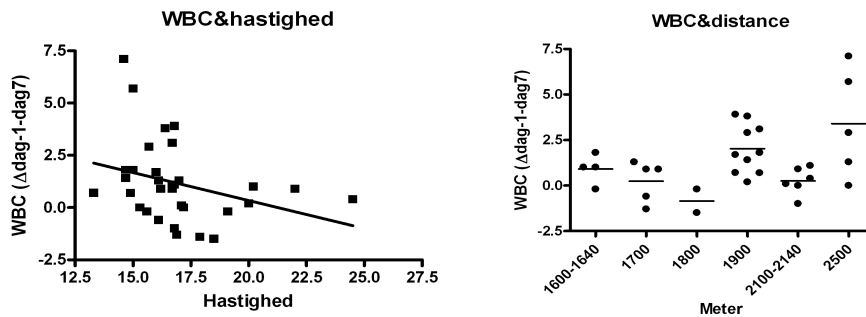
## 5.5 Hvide blodlegemer

WBC koncentrationen falder samlet set hen over alle målinger. Bonferroni-testen viser, at niveauet på dag 7 er signifikant lavere end niveauet på dag -1 ( $P=0,0011$ ) (Figur 6).

DeltaWBC (dag -1 minus dag 7) er efterfølgende korreleret mod løbslængde og løbshastighed. For hastighed fandtes en negativ korrelation mod øget løbslængde, dvs at jo længere hesten løber, jo større er faldet i WBC dag 7 ( $P = 0,0067$ ). Der fandtes også en tendens til sammenhæng mellem samme deltaWBC og løbshastigheden ( $P = 0,079$ ) (Figur 7).



Figur 6 Koncentration af WBC

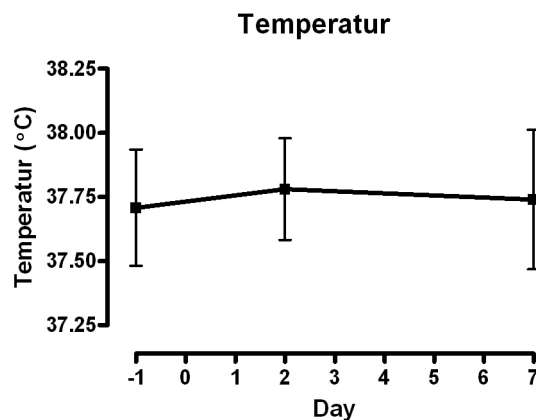


Figur 7 WBC korreleret mod distance (m) og hastighed

## 5.6 Temperatur og løbsdata

To heste opgav deres løb på grund af galop og en hest kom ikke til start som følge af en hovbyld. Tretten af de 35 startende heste blev placeret blandt de 3 første i deres respektive løb og 13 heste blev ikke placeret i deres løb (heri ikke medregner de 3 heste, som udgik, eller ikke kom til start). Hestene løb i gennemsnit en kilometer på 1.16,8 (1 minut 16 sekunder og 8/100 sek) med en spredning fra 1.13,3 minut/km til 1.24,5 minut/km.

Hestens temperatur var i gennemsnit  $37,7^{\circ}\text{C}$ , med en spredning fra  $37,1^{\circ}\text{C}$  til  $38,6^{\circ}\text{C}$ . To heste var ved en fejl lukket på fold før prøveudtagningen dag 7. De var varme og svedige og havde henholdsvis temperatur  $38,2^{\circ}\text{C}$  og  $38,6^{\circ}\text{C}$ . Resten af temperaturene lå ellers under  $38,1^{\circ}\text{C}$ . For de noterede temperaturværdier fandtes ingen signifikant forandring (Figur 8).



Figur 8 Temperaturmålinger

## 6.0 Diskussion

### 6.1 SAA

I nærværende studie sker ikke en signifikant stigning i SAA hos nogen af de 37 travheste efter løb. Non-infektøs leddlidelse er almindelig årsag til halthed hos heste og har speciel betydning hos sportshesten. Non-infektøs arthritis hos hesten er normalt ikke forbundet med en systemisk inflammatorisk sygdom som ved reumatoid arthritis hos mennesker, men kan i stedet for betragtes

som en lokal inflammatorisk proces. Dog kan en lokal inflammatorisk proces, forudsat at den er kraftig nok, fremkalde et systemisk inflammatorisk respons (Hulten *et al.* 2002). Det tyder således på, at den præstation som travhestene i dette studie udsættes for ikke giver anledning til så kraftige påvirkninger af deres led, at det kan fremkalde systemisk inflammatorisk respons eller APR.

I en undersøgelse med 10 raske heste og 21 heste med forskellige typer leddelider, konkluderes, at hverken serum eller synovialvæske SAA koncentrationer hos heste med leddelider med lavgradig inflammation varierer signifikant fra de raske i kontrolgruppen (Jacobsen, Thomsen & Nanni 2006). Studier af SAA responset på leddelider hos heste er begrænset, men det er dog kendt, at SAA koncentrationer stiger i serum såvel som i synovialvæske efter eksperimentel induktion af aseptisk inflammatorisk arthritis (Hulten *et al.* 2002; Jacobsen, Thomsen & Nanni 2006).

Da der ikke forekommer signifikant stigning i SAA efter løb i nærværende undersøgelse, tyder det på, at hestene ikke har pådraget sig hverken bakterie- eller virusinfektioner, da bakterieinfektioner fremkalder en høj SAA koncentration, og virusinfektioner giver et mere moderat respons (Hulten *et al.* 1999a).

Transport til og fra travløb og selve løbet kunne forventes at medføre fysisk og psykologisk stress. Stressniveauet hos travhestene i dette studie har ikke været højt nok til at udløse et APR, som kunne medføre forhøjede SAA værdier. Det er ellers beskrevet, at fysisk og psykologisk stress humant og hos forsøgsdyr giver forhøjet plasmaniveau af APP (Deak *et al.* 1997; Nukina *et al.* 2001), og hos kvæg udsat for fysisk stress er der dokumenteret forhøjede SAA værdier (Murata & Miyamoto 1993; Alsemgeest *et al.* 1995).

Nyere dansk forskning har vist, at mavesår rammer alle heste uanset alder og arbejdsniveau. Gastroskopi blev udført på 201 heste og ponyer fra 5 regioner i Danmark, og 53% af alle undersøgte heste havde klinisk mavesår. Der blev ikke fundet nogen forskel på racernes disponering for mavesår (Luthersen 2007). Tidligere antagelser har været, at især højtydende væddeløbsheste er i risikogruppen for at udvikle mavesår. Den nuværende viden om forekomsten af mavesår er først og fremmest baseret på væddeløbsheste i USA og England. De fleste undersøgelser har konkluderet, at op mod 90% af væddeløbsheste i hård træning og konkurrence har mavesårsforandringer (Johnson *et al.* 2001; Luthersson 2007). Franskmanden Couroucè-Malblanc har påvist SAA som en markør for mavesår hos heste, da han fandt at heste med mavesår havde forhøjede SAA værdier (Couroucè-Malblanc *et al.* 2009). Det er derfor overraskende, at der ikke ses stigning af SAA hos nogen af de 37 travheste i nærværende studie, da det må forventes, at en hvis procentdel af disse heste har udiagnosticerede mavesår.



## 6.2 Haptoglobin

Koncentrationen af Hp i studiet her faldt over tid og var signifikant lavere 2 dage efter løb end dagen før løb. At Hp ligesom SAA, Fb og temperatur ikke stiger signifikant efter løb er med til at bekræfte, at travhestene ikke har været udsat for nogen inflammatorisk tilstand for eksempel infektion, traume, allergi eller stress, som har været højt nok til at fremkalde APR (Crisman *et al.* 2008). Hos heste er fald i serum Hp en tidlig og sensitiv indikation på hæmolyse (Allen & Archer 1971). Faldet i Hp koncentrationen i nærværende studie antages således at skyldes hæmolyse.

## 6.3 Fibrinogen

Der kunne for fibrinogen ikke påvises nogen statistisk signifikante stigninger i prøveresultaterne. Selvom serum Fb koncentrationen normalt stiger langsomt i forbindelse med vævsskade, og først topper 1-2 uger efter stimulus (Jacobsen *et al.* 2005), er det nærliggende at antage, at de ret uforandrede værdier for Fb, både dag 2 og dag 7, tyder på at hestene ikke har været udsat for infektiøse eller inflammatoriske påvirkninger.

## 6.4 Jern og hæmoglobin

Fe koncentrationen i nærværende studie faldt over tid. Serum Fe koncentrationen på dag 7 var signifikant lavere end før løb, mens koncentrationen på dag 2 ikke var signifikant lavere end koncentrationen før løb. Fald i serum Fe koncentrationen er beskrevet både ved inflammation (Borges *et al.* 2007) og som følge af hæmolyse. Et studie, med fokus på effekten af træning på jernmetabolismen hos fire 4-års fuldblodshingste, har konkluderet, at jo hårdere træning, des større fald i serum jern og Hp koncentrationen. Dette indikerer, at hård træning inducerer hæmolyse, hvilket studiet også konkluderer (Inoue *et al.* 2005). Da der i nærværende studie ikke ses stigning i hverken SAA, Hp, Fb, WBC eller temperatur, er det nærliggende at antage, at faldet i serum Fe skyldes hæmolyse og ikke inflammation.

## 6.5 Hvide blodlegemer

Umiddelbart er det overraskende med et signifikant lavere WBC niveau på dag 7 end på dag -1, da leukocytose er en beskrevet konsekvent virkning af motion på immunsystemet. Dette ses hos heste efter anstrengende arbejde (Snow *et al.* 1983; Rose & Allen 1985; Wong *et al.* 1992). WBC tallet er beskrevet at stige i takt med, at intensiteten og varigheden af arbejdet øges (Brenner *et al.* 1998). Kronisk stress, med fald i plasma cortisol koncentrationen kunne være en mulig forklaring på faldet i WBC (Mills *et al.* 1997; Hamlin *et al.* 2002). Det signifikante fald i WBC fra dag -1 til dag 7, kunne

også forklares med "fysiologisk leukocytose" (Schalm *et al.* 1975), begrundet i en stigning af plasma cortisol (Kurcz *et al.* 1988) og WBC umiddelbart efter løb og medførende et efterfølgende fald af WBC. Et forhøjet WBC niveau umiddelbart efter løb i nærværende studie vil være forblevet uopdaget, da målinger først blev foretaget på 2. dagen efter løb. Det skal bemærkes, at selvom der ses et signifikant fald i WBC niveauet til dag 7, så falder værdierne dog ikke under normalværdier. Da der i nærværende undersøgelse ikke ses stigning i hverken SAA, Hp eller Fb efter løb, er det mest nærliggende at antage, at faldet i WBC skyldes "fysiologisk leukocytose" i umiddelbar forbindelse med løbet og derefter et hurtig fald i WBC de efterfølgende dage.

HemoCue analyseinstrumenterne er kompakte, lette at tage med ud i stalden og enkle at håndtere. I studiet her blev prøverne ikke lavet i stalden, for ikke at tage for meget af trænerens tid. Når blodet som her opsamles i prøverør med antikoagulant (EDTA), er det vigtigt, at prøverørene fyldes med den korrekte mængde blod (selvom der kun skal bruges en dråbe), og at prøven blandes grundigt før måling. Hvis blodet har været opbevaret i køleskab, skal det opnå stuetemperatur, 15-30 °C, inden analysering.

## 7.0 Konklusion og perspektivering

Resultaterne af denne undersøgelse viser, at der ikke er fundet signifikant stigning i nogen af de målte inflammationsmarkører. Derfor konkluderes det, at den præstation travhestene i dette studie udsættes for i forbindelse med konkurrencedeltagelse tilsyneladende ikke giver anledning til småskader og deraf følgende subkliniske inflammationstilstande som kan måles. Fald i Hp og Fe antages at relatere sig til arbejdsinduceret hæmolyse, og faldet i WBC efter løb tillægges "fysiologisk leukocytose" i umiddelbar forbindelse med løbet og derefter et fald i WBC.

Mere forskning på området kunne være ønskeligt. Måling af SAA før og efter løb samtidig med nøjere undersøgelser for muskel- og ledlidelser kunne være berettiget. Gastroskopi før og efter løb samtidig med måling af SAA kunne være interessant, for at undersøge om der er en sammenhæng mellem de to parametre og om løb forværrer mavesårs status.

Taksigelser: For hjælp og vejledning før og under projektet og for hjælp med de statistiske beregninger takkes lektor, ph.d., dyrlæge Stine Jacobsen, KU-Life. For hjælp ved den praktiske blodprøveudtagning takkes træner og deres staldpersonale. Patricia og Tonny Hass Pilborg takkes for hjælp gennem hele forløbet. For sponsorat takkes: Kongeriget Danmarks Hesteforsikring, Boehringer Ingelheim Danmark, E-vet., HemoCue Danmark og Merial Norden.

## 8. 0 Referenceliste

Alexander SL., Irvine CHS. & Donald RA: "Dynamics of the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis determined using a nonsurgical method for collecting pituitary venous blood" *Front. Neuroendocrinol.* (1996)17:1-50

Allen B. & Archer RK: "Haptoglobins in the horse" *The Veterinary Record* (1971) 89:106-109

Allen & Kold: "Fibrinogen response to surgical tissue trauma in the horse" *EVJ* (1988) 20:6, 441-443.

Alsemgeest SPM., Lambooy IE., Wierenga HK., Dieleman SJ. Meerkerk B., Ederen AM van & Niewold TA.: "Influence of physical stress on the plasma concentration of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) in calves" *The Veterinary Quarterly* (1995) 17(1):9-12

Andrews GA & Smith JE 2000: "Iron metabolism." in Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds. *Schalms Veterinary Haematology* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins

Anon: "Revised nomenclature for serum amyloid A (SAA)." Editorial part 2. Report from the meeting of the International Nomenclature Committee on Amyloidosis, *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest* (1999) 6:67-70

Auer DE., NG JC. Thompson HL., Inglis S. & Seawright AA.: "Acute phase response in horses: Changes in plasma cation concentrations after localised tissue injury" *Veterinary Record* (1989) 124: 235-239

Barrelet A. & Ricketts SW.: "Haematology and blood biochemistry in the horse: a guide to interpretation." In *Practice* (2002) 24 (6): 318-327

Becht JL.: "Interpretation of erythrocyte and leukocyte responses, dynamics of plasma proteins and assesment of fibrinogen." *Proc 32nd Ann Conc Am Ass Practnr* (1986): 605-612

Bradshaw RH., Hall SJG. & Broom DM.: "Behavioural and cortisol responses of pigs and sheep during transport" *The Veterinary Record* (1996) 138:233-234

Brenner I, Shek PN, Zamecnik J, Shephard RJ: "Stress hormones an the immunological response to heat and exercise." *Int J Sports med* 1998; 19:130-143

Borges AS., Divers TJ., Stokol T. & Mohammed OH.: "Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory disease in horses" *Journal of Veterinary Internal Medicine* (2007) 21: 489-494

Carlson G: "A survey of iron status of thoroughbred horses in race training." In: *Prodceedings of the 10th annual ACVIM forum.* San diego: American College of veterinary internal medicin; (1992) 10: 448-449

Chavatte PM., Pepys MB., Roberts B., Ousey JC. McGladdery AJ. & Rossdale PD: "Measurement of serum amyloid A protein (SAA) as an aid to differential diagnosis of infections in newborn foals" *Equine Infectious Disease VI: Proceedings of the 6. international Conference* (1991) pp. 33-38

Cohen ND., Chaffin MK., Vandenplas ML., Edwards RF., Nevill M. & Martens RJ: "Study of serum amyloid A concentrations as a means of achieving early diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia" *Equine Veterinary Journal* (2005), 37(3):212-216

Couroucé-Malblanc A., Maliverney C., Launois T., van Erck E., Pitel PH. & Fortier G.: *Haematology and biochemistry in horses with gastric ulcers: Experimental study on 66 horses.* *Handbook of Precentations*, 48 th BEVA Congress (2009), p. 104

Crisman MV., Scaratt WK & Zimmermann KL.: "Blood proteins and inflammation in the horse" *Vet Clin Equine* (2008) 24: 285-297

- Deak T., Meriether JL, Fleshner M., Spencer RL., Abouhamze A., Moldawer LL., Grahn RE., Watkins LR & Maier SF.: "Evidence that brief stress may induce the acute phase response in rats" *American Journal of Physiology, Integrative Comp Physiol* (1997)273:1988-2004
- Dobryszczyka W.: "Haptoglobin: Retrospectives and perspectives" In: Mackiewicz A, Kushner I, Baumann H. (Eds.), *Acute Phase Proteins – Molecular Biology, biochemistry and Clinical Applications*, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida (1993), pp. 185-206
- DTC: Mailkorrespondance med Dansk Travsports Centralforbund ved Peter Stenaa, oplysninger findes også på [www.trav.dk](http://www.trav.dk)
- Eurell TE., Wilson DA & Baker GJ.: "The effect of explorative laparotomy on the serum and peritoneal haptoglobin concentrations of the pony" *Canadian journal of Veterinary Research* (1993) 57: 42-44
- Fagliari JJ., McClenahan, Evanson OA. & eiss DJ.: "Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis" *American Journal of Veterinary Research* (1998) 59:1234-1237
- Gabay C. & Kushner I.: "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation" *The New England Journal of Medicine* (1999) 340(vol. 6):448-455
- Geor RJ, Weiss DJ: "Drugs affecting the hematological system of the performance horse." *Vet clin north Am Equine pract* (1993) 9(3): 649-667
- Giguere S., Hernandez J., Gaskin J., Miller C. & Bowman JL.: "Evaluation of white blood cell concentration, plasma fibrinogen concentration and agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia" *JAVMA* (2003) 6: 775-781
- Gruys E., Obwolo MJ. & Toussaint MJM.: "Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review" *Veterinary Bulletin* (1994) 64(11):1009-1018
- Hamlin MJ., Shearman JP. & Hopkins WG.: "Changes in physiological parameters in overtrained Standardbred racehorses" *Equine Veterinary Journal* (2002) 34(4): 383-388
- Harvey JW.: "Microcytic anemias." In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds. *Schalms Veterinary Haematology* 5th edn. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins (2000), pp.200-204
- HemoCue Danmark, Bygstubben 5, 2950 Vedbæk, Danmark. Telefon: +4545661320. [info@hemocue.dk](mailto:info@hemocue.dk), [www.hemocue.com](http://www.hemocue.com)
- Hillmann RS. & Finch CA.: "Red Cell Manual" 5.th edition, FA Davies Company, Philadelphia, (1985) p. 52
- Hobo S., Niwa H & Anzai T.: "Evaluation of serum amyloid A and surfactant protein D in sera for identification of the clinical condition of horses with bacterial pneumonia" *J.Vet. Med Sci.* (2007) 69(8): 827-830
- Hulten C. & Demmers S.: "Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen" *Equine Veterinary Journal* (2002) 34(7): 693-698
- Hulten C., Grønlund U., Hirvonen J., Tulamo RM., Suominen MM. Marhaug G. & Forsberg M.: "Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA) haptoglobin, fibrinogen and  $\alpha_2$ -globulins, during induced noninfectious arthritis in the horse" *Equine Veterinary Journal* (2002) 34(7):699-704
- Hulten C., Sandgren B., Skjöldebrand E., Klingeborn B., Marhaug G. & Forsberg M.: "The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection" *Acta Veterinaria Scandinavica* (1999a) 40:323-333
- Hulten C., Sletten K., Bruun CF., Marhaug G.: "The acute phase serum amyloid A (SAA) in the horse: isolation and characterization of three isoforms" *Veterinary Immunology and immunopathology* (1997) 57: 215-227

- Hulten C., Tulamo RM., Suominen MM., Burvall K., Marhaug G. & Forsberg M.: "A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) – a clinically useful inflammatory marker in the horse" *Veterinary Immunology* (1999b) 68:267-281
- Hørder K. & Hørder M.: "Plasma haptoglobin and physical exercise; changes in individuals concomitant with strenuous march" *Clin. Chim. Acta* (1970)30:369-372
- Inoue Y., Matsui A., Asai Y., Fumiki a., Matsui T. & Hideo Y. : "Effects of exercise on iron metabolism in horses" *Biological Trace Element Reseach* (2005) vol 107: 33- 42
- Jacobsen S.: "Review of equine acute-phase proteins" *AEEP Proceedings* (2007) Vol. 53:230-235
- Jacobsen S. & Andersen PH.: " Tutorial article: The acute phase serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses" *Equine Veterinary Education* (2007), 19(1), 38-46.
- Jacobsen S., Jensen JC, Frei S., Jensen AL & Tøfner MB: "Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study" *Equine veterinary journal* (2005), 37 (6): 552-556
- Jacobsen S., Nielsen JV., Kjølgaard-Hansen M., Tølbøll T., Fjeldborg J., Halling-Thomsen M., Martinussen T. & Tøfner MB.: "Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: A preliminary study" *Veterinary Surgery* (2009), 62: 769
- Jacobsen S., Niewold TA., Halling-Thomsen M., Nanni S., Olsen E., Lindegaard C. & Andersen PA.: "Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis" *Veterinary immunology and Immunopathology* (2006) 110: 325-330
- Jacobsen S., Thomsen MH. & Nanni S.: "Concentrations of serum amyloid A in the serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease" *AJRV*, vol 67 no 10, October 2006: 1738-1742
- Janssens CJG., Helmond FA. & Wiegant VM.: "The effect of chronic stress on plasma cortisol concentration I cyclic female pigs depends on the time of day" *Dom. Anim. Endocrinology* (1995)12:167-177
- Jeffcott LB.: "Clinical haematology of the horse" In: Archer RK, Jeffcott LB eds. *Comparative clinical haematology*, Oxford: Blackwell scientific (1977): 161-213
- Johnson JH., Vatisas N. Castro L., Fischer T. *et al*: "Field survey of the prevalence of gastric ulcers in Thoroughbred racehorses and on response to treatment of affected horses with omeprazole paste" *Equine Vet Ed* (2001)13:221
- Kent J. & Goodall J: "Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations" *Equine Veterinary Journal* (1991) 23(1):59-66
- Kingston JK.: "Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training" In: *Equine Sports Medicine and Surgery – basic and clinical sciences of the equine athlete*, Hinchcliff KW., Kaneps AJ. & Geor RJ, Saunders, Elsevier Limited (2004), ISBN 0702026719
- Kushner I. & Mackiewicz A.: "The acute phase response: an overview" In: Mackiewics A., Kushner I., Baumann H. (Eds.), *Acute Phase Proteins – Molecular Biology, biochemistry and Clinical Applications*, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida (1993), pp. 3-19
- Kurcz EV., Lawrence LM., Kelly KW. & Miller PA: "The effect of intense exercise on the cell-mediated immune response of the horse" *Journal of Equine Veterinary Science* (1988) 8(3): 237-239
- Ley SJ., Livingstone A. & Watermann AE.: "Effects of chronic lameness on the concentrations of cortisol, prolactin and vasopressin in the plasma of sheep" *The Veterinary Record* (1991) 129:45-47
- Ley SJ., Waterman AE., Livingstone A. & Parkinson TJ.: Effects of chronic pain associated with lameness on plasma cortisol concentrations in sheep: a field study. *Res. Vet. Sci.* (1994) 57, 332-335

- Luthersson N.: "Hver anden hest har mavesår" Dyrlægemagasinet: for praktiserende dyrlæger (2007) 4(5):20-25
- McDonald, TL., Larson, MA., Marck, DR. & Weber, A.: Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2001) 83,203-211
- Miller MS., Moritz A., Röcken M. & Litzke LF.: "Bestimmung von Serum Amyloid A, Haptoglobin und Fibrinogen als Entzündungsparameter nach Kastration von Hengsten" *Tierärztliche Praxis* (2007) 35 (G):69-74
- Miller MS., Moritz A., Röcken M., Roth J. & Litzke LF.: "Die Akute Phase Reaktion nach minimalinvasiven Eingriffen beim Pferd" *Pferdheilkunde* (2003) 19(6):354-360
- Milne EM., Doxey DL., Kent JE. & Pemberton A.: "Acute phase proteins in grass sickness (equine dysautonomia)," *Research in Veterinary Science* (1991) 50:273-278
- Mills PC.; NG JC & Auer DE.: "The effect of the acute phase response on *in vitro* drug metabolism and plasma protein binding in the horse" *Veterinary Research Communications* (1997) 21: 361-368
- Murata H. & Miyamoto T.: "Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves" *Br. Veterinary Journal* (1993) 149: 277-283
- Murata H., Shimada N & Yoshioka M: "Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview" *The Veterinary Journal* (2004) 168: 28-40
- Nukina H., Sudo N., Aiba Y., Oyama N., Koga Y. & Kubo C.: "Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice" *Journal of neuroimmunology* (2001) 115: 46-51
- Nunokawa Y., Fujinaga T., Taira T., Okumura M., Yamashita K., Tsunoda N. & Hagio M.: "Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses" *Journal of Medical Science* (1993) 55(4/6): 1011-1016
- Pepys MB., Baltz ML., Tennent GA., Kent J., Ousey J. Rosedale PD.: "Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of acute phase response" *Equine veterinary Journal* (1989) 21 (2): 106-109
- Petersen HH., Nielsen JP & Heegaard PMH.: "Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry" *Veterinary Research* (2004) 35:163-187
- Pollock P.J., Prendergast M., Schumacher J. & Bellanger CR.: "Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses" *The Veterinary Record* (2005) 156: 538-542
- Ricketts SW.: "Hematological and biochemical abnormalities in the athletic horse" In: *Equine Sports Medicine and Surgery – basic and clinical sciences of the equine athlete*, Hinchcliff KW., Kaneps AJ. & Geor RJ, Saunders, Elsevier Limited (2004), ISBN 0702026719
- Rose R. & Allen L.: "Haematological response to exercise and training." *Vet Clin North Am; Equine Prac* (1985);1:461-476
- Schalm OW., Jain NC., Carrol EJ.: "Schalm's Veterinary haematology 5.th Edition", Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins; Febiger, (1975)
- Schwarzwald CC. & Schuback K.: "Abnormalities of the erythron" In: *Equine Sports Medicine and Surgery – basic and clinical sciences of the equine athlete*, Hinchcliff KW., Kaneps AJ. & Geor RJ, Saunders, Elsevier Limited (2004), ISBN 0702026719
- Smith JE. & Cipriano JE: "Inflammation-induced changes in serum iron analytes and ceruloplasmin in Shetland ponies" *Veterinary Pathology* (1987) 24: 354-356

Snow DH.; Ricketts S., Mason DK.: "Haematological responses to racing and training exercise in thoroughbred horses, with particular reference to the leucocyte response." *Equine Vet J*, (1983): 15:149-154

Spitler DL., Alexander WC., Hoffler G., Doerr DF. & Buchanan P.: "Haptoglobin and serum enzymatic response to maximal exercise in relation to physical exercise" *Med. Sci. Sports and Exercise* (1984)16:366-370

Stoneham SJ., Palmer CR. & Rossdale PD.: "Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidometric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease" *Equine Veterinary Journal* (2001) 33(6): 599-603

Taira T., Fujinaga T., Okumura M., Yamashita K., Tsunoda N. & Mizuno S.: "Equine Haptoglobin: Isolation, characterization, and the effects of ageing, delivery and inflammation on its serum concentration" *Journal of Veterinary Medical Science* (1992) 54(3): 435-442

Takagi S., Ito K., Shibata H.: *Experimental Reports of Equine health laboratory.* (1974) 11, 94-105

Thomas JS.: "Overview of plasmaproteins" In: Feldman BF, Zinkl JG & Jain NC (eds.), *Schalms Veterinary Haematology* 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins (2000), pp. 891-898

Vandenplas ML., Moore JN., Barton MH., Roussel AJ & Cohen ND.: "Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic" *AJVR* (2005) 66(9):1509-1515

Vreugdenhill ACE., Dentener MA. Snoek AMP., Greve JWM & Buurmann WA.: "Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response" *Journal of Immunology* (1999) 163:2792-2798

Warkentin DL., Marchand A. & van Lente F.: "Serum haptoglobin concentrations in concurrent hemolysis and acute-phase reaction" *Clinical Chemistry* (1987) 33 (7): 1255-1256

Willett K. & Blackmore DJ.: "Haptoglobin in the serum of thoroughbreds in training" *Research in Veterinary Science* (1979) 26/27:308-314

Wong C, Smith SE; Thong YH et al: "Effects of exercise stress on various immune infections in horses". *Am J vet res* (1992); 5:1414-1417