



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

# **Analys av KC-like som biomarkör för sepsis hos tikar med pyometra**

*Caroline Klemming*

*Uppsala  
2018*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2018:40*



# Analys av KC-like som biomarkör för sepsis hos tikar med pyometra

## Analysis of KC-like as biomarker for sepsis in bitches with pyometra

*Caroline Klemming*

*Handledare: Sara Wernersson, institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

*Biträdande handledare: Liya Wang, institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

*Biträdande handledare: Ragnvi Hagman, institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examinator: Anna Rising, institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

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

**Kurskod:** EX0830

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2018

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2018:40

**ISSN:** 1652-8697

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

**Nyckelord:** sepsis, blodförgiftning, SIRS, pyometra, hund, tik, biomarkör, cytokin, kemokin, CXCL, KC-like

**Key words:** sepsis, blood-poisoning, SIRS, pyometra, dog, bitch, biomarker, cytokine, chemokine, CXCL, KC-like

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi



## SAMMANFATTNING

Sepsis är ett komplext och livshotande tillstånd orsakat av en infektion som skapar en dysreglerad inflammation, vilket ger upphov till ett så kallat Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Mortaliteten vid sepsis är hög hos hund och en tidig diagnos och insättande av behandling är därför mycket viktigt överlevnaden. Pyometra är en vanlig sjukdom hos tikar och i en studie av tikar med pyometra klassificerades över hälften som SIRS-positiva, enligt de kriterier som idag används för diagnostik av sepsis hos hund. Patogenesen till sepsis är ännu inte helt klarlagd och definitionen och kriterierna har därför ändrats under årens lopp. Senast år 2016 kom nya riktlinjer inom humanmedicinen som ändrade synen på syndromet till att ses som ett obalanserat hyper- och hypoinflammatoriskt tillstånd och även omfatta organsvikt. SIRS-kriterierna som tidigare varit rådande byttes till det så kallade Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA), där fler organspecifika parametrar mäts. Detta system har dock ännu inte utvärderats i större omfattning hos hundar med sepsis.

Biomarkörer som har studerats för identifiering av individer med hög sannolikhet för sepsis är bland annat akutfasproteinet C-reaktivt protein (CRP) och ett antal inflammatoriska cytokiner. Ingen av dessa har dock ännu setts på ett säkert sätt kunna identifiera hundar med sepsis. Studier har istället visat att en antikropp mot kemokinen keratinocyte chemoattractant (KC) hos mus kan känna igen förhöjda koncentrationer av ett protein (kallat KC-like) i blodet hos tikar med sepsis. Vid en gensekvensanalys hittades ingen motsvarande gen hos hund för KC, men ett antal C-X-C motif ligand (CXCL)-kemokiner sågs ha hög likhet.

Studien syftade till att analysera vilken av dessa CXCL-kemokiner som KC-antikroppen binder starkast till samt om förhöjda koncentrationer av protein som KC-antikroppen binder till förekommer hos tikar med pyometra och SIRS jämfört med de utan SIRS. De utvalda CXCL-kemokinerna uttrycktes därför i *Escherichia coli* och analyserades med Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) och western blot. Blodprover insamlade från tikar med pyometra med eller utan SIRS analyserades också med en Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) med KC-antikropp hos mus.

Resultatet från analyserna visar att KC-antikroppen binder framförallt en av de utvalda CXCL-kemokinerna och denna skulle därför kunna vara en potentiell biomarkör för sepsis hos hund. För att bekräfta detta fynd krävs dock ett förbättrat analysprotokoll. Signifikant skillnad i koncentration KC-like sågs mellan grupperna i studien där tikar med pyometra och SIRS sågs ha förhöjda nivåer. Emellertid krävs större och mer detaljerade studier på KC-like för att verifiera dessa resultat. De obalanserade immunologiska processer som sker vid sepsis gör att det i dagsläget är svårt att hitta en tillräckligt säker enskild biomarkör för sepsis. Utveckling av de nuvarande SIRS-kriterierna samt en panel av pro- och antiinflammatoriska biomarkörer, där KC-like skulle kunna ingå, skulle därför kunna vara det effektivaste sättet att identifiera detta allvarliga och komplexa syndrom hos hund.

## SUMMARY

Sepsis is a complex and life-threatening condition caused by an infection creating a dysregulated inflammation, leading to a Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Sepsis-related mortality is high for dogs and an early diagnosis and start of treatment is very important for survival. Pyometra is a common disease in bitches and in a Swedish study of bitches with pyometra over half were classified as SIRS-positive, according to the criterias of that today is used for diagnostics of sepsis for dogs. The pathogenesis of sepsis is not yet clear and the definition and the criterias has changed during the years. The latest guidelines in the human medicine came in 2016 and it changed the view of the syndrome to be seen as an unbalanced hyper- and hypoinflammatory condition and to also include organ failure. The SIRS-criteria which was used earlier were changed to the so called Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA), where multiple organ-specific parameters are measured. This system has not yet been fully evaluated in dogs with sepsis.

Biomarkers that have been studied to identify individuals with a high likelihood of sepsis is among others the acute-phase protein C-reactive protein (CRP) and a number of inflammatory cytokines. None of these have yet, in a safe way, been able to identify dogs with sepsis. Instead studies have shown that an antibody, directed against the chemokine keratinocyte chemoattractant (KC) in mice, can recognize elevated concentrations of a protein (called KC-like) in the blood of bitches with sepsis. A gene-sequence analysis found no corresponding gene in dogs for KC but a number of C-X-C motif ligand (CXCL)-chemokines was seen to have a high resemblance.

This study aimed to analyse which of these CXCL-chemokines the KC-antibody binds the strongest to and if elevated concentrations of protein that the KC-antibody binds to occur in bitches with pyometra and SIRS compared to bitches without SIRS. The selected CXCL-chemokines was therefore expressed in *Escherichia coli* and were analysed with Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot. Blood samples collected from bitches with pyometra with or without SIRS was analysed with an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) with an antibody against KC in mouse.

Results from the analyses show that the KC-antibody especially bind one of the studied CXCL-chemokines, which therefore could be a potential biomarker for sepsis in dogs. To confirm this an improved protocol for analysis is needed. A significant difference in concentration of KC-like was seen between groups in the study where bitches with pyometra and SIRS had higher levels. Detailed studies including more dogs are needed on KC-like to verify these findings. The unbalanced immunologic processes that occur in sepsis make it hard to find a safe individual biomarker for sepsis today. Development of the current SIRS-criteria and a panel of pro- and anti-inflammatory biomarkers, where KC-like could be included, could therefore be the most efficient way to identify this severe and complex syndrome in dogs.

## INNEHÅLL

Förkortningar.....	1
Inledning.....	2
Litteraturoversikt.....	3
Pyometra.....	3
Definition och bakgrund.....	3
Patogenes och kliniska fynd.....	3
Diagnostik.....	4
Behandling.....	4
Sepsis – definition och kriterier.....	5
Definition.....	5
Sepsiskriterier.....	6
Immunförsvaret vid sepsis.....	8
Biomarkörer för sepsis.....	9
C-reaktivt protein.....	10
Procalcitonin.....	10
High-mobility group box protein-1.....	11
Systemiska inflammatoriska cytokiner.....	11
KC och andra CXCL-kemokiner.....	12
Material och metoder.....	13
Odling och framrening av kemokiner.....	14
Gravitationsflödes-affinitetskromatografi.....	15
SDS-PAGE.....	15
Western blot.....	16
Provinsamling.....	17
Sepsiskriterier.....	17
Analys av insamlade prover.....	17
ELISA.....	18
Statistiska analyser.....	19
Resultat.....	19
Optimering av uttryck av kemokiner och interaktion med KC-antikropp.....	19
Framrening av kemokiner och interaktion med antikropp mot mus-KC.....	20
Kliniska data och gruppindelning.....	22
Analys av koncentration KC-like i blodprover.....	23
Diskussion.....	24
Identifiering av KC-like hos hund.....	24
KC-like som biomarkör för sepsis.....	25
Val av sepsiskriterier och referensintervall.....	26
Begränsningar och framtida studier av KC-like.....	27
Konklusion.....	28
Referenser.....	29
Appendix 1: SDS-PAGE av framrenade kemokiner.....	1

## FÖRKORTNINGAR

AF	Andningsfrekvens
ALAT	Alaninaminotransferas
ALP	Alkaliskt fosfatas
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay, enzymlänkad immunoabsorberande analys
CEH	Cystisk endometriehyperplasi
CRP	C-reaktivt protein
CV	Coefficient of variation, varianskoefficient
CXCL	C-X-C motif ligand, kemokin
CXCR	C-X-C-receptor
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation, disseminerad intravaskulär koagulation
DTT	Dithiothreitol
GCS	Glasgow Coma Scale
HF	Hjärtfrekvens
HMGB1	High-mobility group box protein-1
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
KC	Keratinocyte chemoattractant
LPK	Leukocytpartikelkoncentration
LPS	Lipopolysackarid
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome, multipel organsvikt
OHE	Ovariohysterektomi
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PRR	Pattern Recognition Receptor
PCT	Procalcitonin
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis, natriumaurylsulfat polyakrylamid gelelektrofores
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome, systemiskt inflammationsresponsyndrom
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment
qSOFA	quick Sepsis-related Organ Failure Assessment



## INLEDNING

Sepsis, även kallat blodförgiftning, är ett livshotande tillstånd orsakat av en infektion som skapar en dysreglerad inflammation som leder till ett så kallat Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Mortaliteten vid sepsis kan vara så hög som 48 % hos hund (Rau *et al.*, 2007). Inom humanmedicinen är sepsis en av de vanligaste dödsorsakerna på intensivvårdsavdelningar och incidensen för sepsis är ökande (Annane *et al.*, 2003). En tidig diagnos och insättande av behandling med bland annat intravenöst dropp och antibiotika är därför viktigt för att minska mortaliteten hos individer med sepsis.

Då vi i Sverige inte har tradition av att kastrera tikar utan bakomliggande medicinska orsaker förekommer livmodersjukdomar i högre grad här än i många andra länder. Studier visar att mellan 19-24 % av alla tikar har haft pyometra vid 10 års ålder (Jitpean *et al.*, 2012). Mortaliteten vid pyometra är låg och ligger på 3-4 % (Egenvall *et al.*, 2001). En vanlig komplikation hos tikar med pyometra är dock utvecklandet av sepsis och i en svensk studie av tikar med pyometra klassificerades 57 % av dessa som SIRS-positiva (Fransson *et al.*, 2007). Då tikar med pyometra drabbas av allvarligare sjukdom såsom septisk chock stiger mortaliteten till upp mot 37 % (Conti-Patara *et al.*, 2012).

I dagsläget finns ingen "gold standard" för att diagnosticera sepsis. Istället används olika poängsystem som via ett antal fysiologiska och laboratoriska parametrar ger en grund för att identifiera individer med infektion och SIRS. Tidigare användes SIRS-kriterierna som grund till bedömningen, men nya riktlinjer inom humanmedicinen förespråkar nu användning av poängsystemet Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) som bygger på att identifiera organsvikt (Singer *et al.*, 2016). Brister med dessa system är dock att de är ospecifika och de nya kriterierna har ännu inte utvärderats tillräckligt hos hund. Omfattande forskning bedrivs därför både inom humanmedicinen och veterinärmedicinen för att hitta systemiska biomarkörer i blod för att kunna diagnosticera individer med sepsis tidigt. Syftet är att kunna behandla och förhoppningsvis med tidigt insatt behandling bota patienterna, men också att på ett säkert sätt kunna identifiera patienter som inte har sepsis och som därmed inte är i behov av antibiotika.

Flera olika biomarkörer har genom åren diskuterats vara lämpliga kandidater för identifiering av individer som har hög sannolikhet att utveckla sepsis. I dagsläget är immunsystemets inflammationsmediatorer cytokinerna några av de som studeras mest intensivt. Tidigare studier har visat att en antikropp mot kemokinen keratinocyte chemoattractant (KC) hos mus kan korsreagera, det vill säga känna igen ett protein (kallat KC-like) i blodet, som är förhöjt hos hundar med pyometra och SIRS (Karlsson *et al.*, 2016). Jämförelser på gennivå av cytokiner från hund, som presenterats i samma studie, har visat att flera C-X-C motif ligand (CXCL)-kemokiner uppvisar hög likhet med KC från mus, men ingen direkt motsvarighet till KC-genen har hittats. I denna studie har därför CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 och CXCL10 valts ut baserat på sekvenslikhet. Syftet är att ta reda på om KC-antikroppen binder starkast till en eller flera av dessa kemokiner. Studien syftar även till att med hjälp av en så kallad Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) analysera om förhöjda serumkoncentrationer av protein som KC-antikroppen binder till förekommer hos tikar med pyometra och SIRS jämfört med tikar med pyometra utan SIRS, vilket skulle bekräfta tidigare fynd.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Pyometra

#### **Definition och bakgrund**

Pyometra, livmoderinflammation, är en infektion i livmodern som på grund av detta fylls med pus. Så kallad öppen pyometra innebär att cervix är öppen så att pus kan rinna ut från livmodern och djurägaren kan då upptäcka flytningar från vulva. Stängd pyometra innebär i sin tur stängd cervix vilket kan göra det svårare för djurägaren att upptäcka sjukdomen. Det ger också en ökad risk för att livmodern rupturerar till följd av den kraftiga bildningen av pus och att tiken utvecklar sepsis (Smith, 2006). Vid 10 års ålder kommer 19-24 % av alla tikar att ha utvecklat pyometra (Egenvall *et al.*, 2001; Jitpean *et al.*, 2012). Riskfaktorer för pyometra är hög ålder, tikar som inte fått några valpar och tikar som fått hormonterapi med progesteron eller östrogen (Nelson & Couto, 2013). Vissa raser har också högre risk för att utveckla pyometra, till exempel golden retriever, cavalier king charles spaniel, grand danois, rottweiler och berner sennenhund (Smith, 2006; Jitpean *et al.*, 2012). Detta tyder på att genetiska faktorer påverkar benägenheten att utveckla sjukdomen.

#### **Patogenes och kliniska fynd**

Vanligast är att tikar utvecklar pyometra inom fyra månader efter löpning, alltså under diöstrus eller tidig anöstrus. Patogenesen är inte fullständigt utredd men östrogenpåverkan följt av en längre tids påverkan av progesteron under hundens löpcykel tros predisponera och göra att de är mer känsliga för infektion i livmodern. Effekten verkar även vara kumulativ (Smith, 2006). Cystisk endometriehyperplasi (CEH) kan också föregå eller ses samtidigt som pyometra och det diskuteras om CEH är en del i patogenesen för pyometra. CEH och även mukometra leder dock inte alltid till utvecklande av pyometra (Nelson & Feldman, 1986).

Den bakteriella infektionen tros ske vid östrus då cervix är öppen och att opportunisterna från normalfloran får fäste och orsakar sjukdom. *Escherichia coli* (*E. coli*) är den vanligast isolerade bakterien vid pyometra hos hund, men andra bakterier som isolerats vid bakterieodling från livmodern vid pyometra är exempelvis *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp* och *Proteus spp.* (Nelson & Feldman, 1986). De Gramnegativa bakterierna producerar endotoxiner som kan starta en cytokinkaskad genom frisättning av olika inflammatoriska mediatorer (Nelson & Couto, 2013). Dessa kan tillsammans orsaka en lokal och även en systemisk inflammation. Om förloppet får fortgå och bakterier och endotoxin tar sig ut i blodbanan, eller om livmodern brister vilket leder till septisk peritonit, kan ett livshotande tillstånd uppstå i form av sepsis eller septisk chock samt så kallad Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) (Smith, 2006; Jitpean *et al.*, 2014b).

Vanliga kliniska fynd vid pyometra är inappetens, olika grad av depression, polydipsi, polyuri, kräkning, dehydrering och utspänd buk samt vaginala flytningar. Feber ses i ungefär 30 % av fallen och subnormal temperatur förekommer också framförallt hos de tikar som drabbas av peritonit eller septisk chock (Nelson & Feldman, 1986; Smith, 2006; Jitpean *et al.*, 2014b).

## **Diagnostik**

Diagnosen ställs baserat på kliniska fynd och undersökning med ultraljud där en vätskefylld livmoder kan ses och bedömning av vägg tjocklek, förekomst av cystor och vätskans typ kan göras (Bigliardi *et al.*, 2004; Smith, 2006). Då ultraljud inte finns tillgängligt kan röntgen användas. På röntgen ses ett förstorat tubulärt organ placerat mellan kolon och urinblåsan (Smith, 2006).

Diagnostiskt används även blodprov för att ta reda på mer om organfunktioner och blodbild, samt eventuella inflammatoriska parametrar. Tikar med pyometra, till skillnad från exempelvis tikar med mukometra, har ofta leukocytos med neutrofil och vänsterförskjutning, men de kan även ha neutropeni och degenerativ vänsterförskjutning (Nelson & Couto, 2013). Inflammatoriska mediatorer som setts stiga vid pyometra är exempelvis C-reaktivt protein (CRP). CRP har i kombination med procent stavformiga neutrofiler med hög sensitivitet visats kunna särskilja individer med mukometra eller CEH från de med pyometra (Fransson *et al.*, 2004). Anemi och prerenal azotemi på grund av inflammation respektive dehydrering är vanligt förekommande. Biokemiska förändringar såsom hyperproteinemi, hyperglobulinemi, mild till måttligt förhöjt alaninaminotransferas (ALAT) och alkaliskt fosfat (ALP) förekommer också (Nelson & Couto, 2013).

## **Behandling**

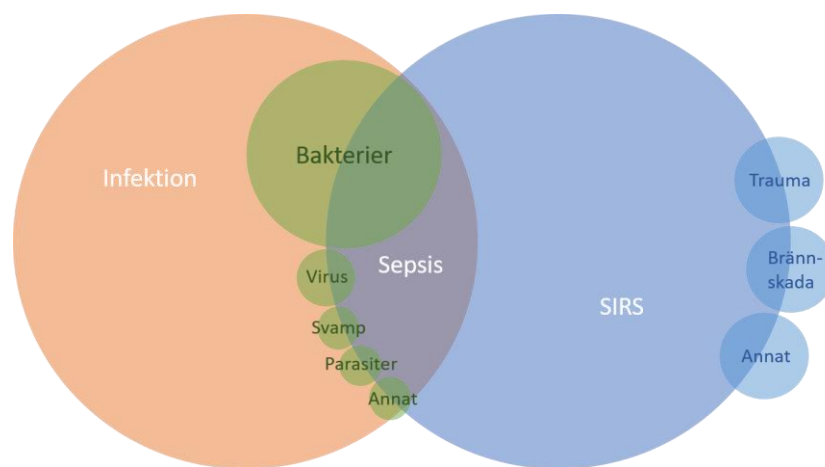
Ovariohysterektomi (OHE) är den säkraste och mest effektiva behandlingen som rekommenderas i första hand vid konstaterad pyometra. Understödjande behandling med vätsketerapi och smärtlindring samt antibiotika sätts även in. Snabb behandling är ofta avgörande vid pyometra. Sepsis, endotoxinemi och brusten livmoder med septisk peritonit som följd är några av de komplikationer som kan inträffa om tiken får gå för länge utan åtgärd. Vätsketerapi innan kirurgisk åtgärd är viktigt då tikarna ofta är dehydrerade och deras vävnadsperfusion och blodflödet till njurarna behöver kunna upprätthållas under narkosen. Vid septisk chock krävs mycket aggressiv vätsketerapi då hundarna drabbas av hypotension. När en existerande azotemi inte kan åtgärdas innan OHE är prognosen sämre för tikens överlevnad (Nelson & Couto, 2013).

Om djurägaren av någon anledning inte vill låta tiken genomgå kirurgisk behandling eller om tikens tillstånd inte tillåter kirurgi kan en enbart medicinsk behandling provas. En förutsättning för medicinsk behandling är att det är en öppen pyometra och att tikens hälsa tillåter den tid det tar att tillfriskna. Kirurgi bör utföras på kritiskt sjuka tikar med pyometra för att avlägsna inflammatoriskt stimuli (Nelson & Couto, 2013). Det är inte heller garanterat att tiken blir helt frisk vid medicinsk behandling och återfall är vanligt. I en retrospektiv studie med 28 tikar sågs recidiv i 48 % av fallen (Ros *et al.*, 2014).

## Sepsis – definition och kriterier

### Definition

Inom humanmedicin har termer och definitioner för sepsis förändrats under de senaste decennierna. De första konsensusriktlinjerna, Sepsis-1, kom ut år 1992 efter en konferens där experter inom området samlats för att nå en standardisering då många olika termer och definitioner användes för syndromet (Bone *et al.*, 1992). Orsaken var att öka förutsättningarna för jämförbarhet och utvärdering av behandling kliniskt och i forskningsstudier. I Sepsis-1 definierades sepsis som det systemiska svaret på infektion med förekomst av SIRS. En distinktion gjordes mellan sepsis och SIRS. Sepsis förutsätter att en infektion föreligger hos patienten som orsak till sjukdomstillståndet, medan det vid SIRS till exempel kan vara allvarliga brännskador eller trauma som orsakar den obalanserade inflammationsreaktionen (Figur 1) (Bone *et al.*, 1992).



Figur 1. Relationen mellan begreppen infektion, SIRS och sepsis, baserat på figur av Bone *et al.*, 1992.

Vid definitionen av dessa syndrom lades vikt vid synen på dem som dynamiska förlopp och som en kontinuerlig utveckling av allt allvarligare art ju längre det får fortgå. Termen svår sepsis infördes samt även septisk chock som begrepp för de allvarligare följderna av sepsis. Svår sepsis ansågs föreligga då även tecken på organ dysfunktion, hypotension eller hypoperfusion såsom exempelvis laktatacidos, oliguri eller förändrat mentalstatus sågs. Septisk chock, det sista stadiet av sepsis, ansågs föreligga vid hypotension, med ett systoliskt blodtryck under 90 mm Hg eller en minskning på 40 mm Hg från baslinjen utan andra orsaker till hypotension, trots adekvat vätsketerapi och samtidigt förekommande tecken på onormal perfusion. Även så kallad Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) definierades i Sepsis-1 som en del i förloppet vid sepsis. MODS definierades som förekomst av förändringar i organfunktioner hos en akut sjuk patient så att homeostasen inte kan upprätthållas utan interventioner (Bone *et al.*, 1992).

Forskningsframstegen som åstadkommit sedan Sepsis-1 publicerades har tydliggjort behovet av uppdateringar av definitionerna och kriterierna för sepsis och det har därför kommit två nya riktlinjer sedan dess, Sepsis-2 år 2001 (Levy *et al.*, 2003) och den senaste Sepsis-3 år 2016 (Singer *et al.*, 2016). Sepsis-2 ändrade egentligen inte definitionerna av sepsis eller de närliggande begreppen, men lade fram grunder till nya kriterier för att identifiera sepsis. Sepsis-3 kom dock med större förändringar i både definitioner av termer och kriterier för sepsis som

enligt författarna bör användas kliniskt och i forskningsstudier framöver inom humanmedicinen.

Enligt Sepsis-3 har allvarlighetsgraden av sepsis höjts och definieras som en livshotande organsvikt orsakat av dysreglerad värdrespons mot en infektion (Singer *et al.*, 2016). Det innebär att kroppens svar på infektion skadar den egna kroppens vävnader och organ, vilket ger upphov till ett livshotande tillstånd. I och med att allvarlighetsgraden av sepsis har höjts har funktionen av att använda termen svår sepsis försvunnit. Septisk chock definieras som en undergrupp till sepsis i vilken den underliggande cirkulatoriska och cellulära metabolismen avviker såpass kraftigt från normalt att detta väsentligt ökar mortaliteten (Singer *et al.*, 2016). I Sepsis-3 framhölls också vikten av att i framtiden fortsätta att uppdatera definitionerna och kriterierna inom området när forskningen går framåt eftersom den fullständiga patogenesen och förloppet vid sepsis ännu inte är helt känt.

### **Sepsiskriterier**

De kriterier för humanmedicinen som lades fram i Sepsis-1 för att identifiera individer med sepsis baserades på förekomst av infektion samt SIRS-kriterierna. Det vill säga två eller fler av följande parametrar utanför satta normalintervall; kroppstemperatur, hjärtfrekvens (HF), andningsfrekvens (AF) eller partiellt koldioxidtryck ( $\text{PaCO}_2$ ) och leukocyt-partikelkoncentration (LPK) eller procent stavformiga neutrofiler (Bone *et al.*, 1992). Studier på senare år har visat att SIRS-kriterierna ger en överdiagnosticering av sepsis och inte ger användbar information om patienten kommer att utveckla ett livshotande tillstånd (Churpek *et al.*, 2015; Donnelly *et al.*, 2017). Definitionen av sepsis har därför ändrats från att fokusera på systemisk inflammation till att innefatta organsvikt, och SOFA introducerades som ersättare till SIRS-kriterierna för bedömningen av sepsis inom humanmedicinen (Singer *et al.*, 2016). I det nya poängsystemet inkluderas utöver cirkulatoriska, respiratoriska och koagulationsparametrar även lever- och njurfunktionsparametrar samt den så kallade Glasgow Coma Scale (GCS) (Tabell 1). SOFA-poäng två eller högre hos en patient med misstänkt infektion bör enligt riktlinjerna föranleda misstanke om sepsis. GCS är en poängskala där medvetandet bedöms utifrån reaktionsförmågan på olika stimuli (Teasdale & Jennett, 1974). Bedömningen sker av ögonöppnande, motorisk och verbal reaktion och poäng från 3-15 sätts beroende på hur starkt stimuli som krävts för reaktion där högre poäng motsvarar en högre medvetandegrad.

Tabell 1. SOFA-kriterierna, baserad på tabell av Singer et al., 2016

Organsystem	Poäng	0	1	2	3	4
Respiration: PaO <sub>2</sub> mmHg		≥400	<400	<300	<200 med andningsstöd	<100 med andningsstöd
Koagulation: TBC x10 <sup>3</sup> /µl		≥150	<150	<100	<50	<20
Levern: Billirubin mg/dl		<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12,0
Kardiovaskulärt: MAP mmHg		≥70	<70	Dopamin eller dobutamin	Dopamin eller epinefrin	Dopamin eller epinefrin
CNS: GCS-poäng		15	13-14	10-12	6-9	<6
Njurar: Kreatinin mg/dl Urinproduktion ml/d		<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 <500	>5,0 <200

SOFA = Sepsis-related Organ Failure, PaO<sub>2</sub> = partiellt syretryck, TBC = trombocyter, MAP = medelartärtryck, CNS = centrala nervsystemet, GCS = Glasgow Coma Scale.

En enklare variant kallad quick-SOFA (qSOFA) som inkluderar blodtryck, andningsfrekvens och bedömning av medvetande enligt GCS (Tabell 2) framhålls också kunna användas framförallt på vanliga vårdavdelningar och på akutmottagningar som en första bedömning om en patient är i riskzonen att utveckla sepsis (Seymour *et al.*, 2016; Singer *et al.*, 2016; Donnelly *et al.*, 2017). Två studier som utvärderat sepsiskriterierna SOFA och qSOFA har visat att dessa bättre kunnat identifiera individer som har en högre risk att avlida på grund av infektion jämfört med SIRS-kriterierna (Seymour *et al.*, 2016; Donnelly *et al.*, 2017). Donnelly *et al.* (2017) framhåller dock att dessa nya kriterier inte definierar vad sepsis är. Williams *et al.* (2017) menar istället att det är för tidigt att överge SIRS-kriterierna för identifieringen av patienter med sepsis. Detta grundas på att SIRS sågs vara associerad med en ökad risk för organsvikt och mortalitet samt att SIRS och qSOFA hade liknande förmåga vad gäller att skilja ut patienter med organsvikt (Williams *et al.*, 2017). qSOFA hade en specificitet för organsvikt på 96,1 % men en sensitivitet på bara 29,7 %, vilket enligt författarna anses göra den mindre användbar som screeningtest för sepsis på vårdavdelningar och att SOFA-systemet kan behöva anpassas för att bättre kunna identifiera patienter med sepsis. Det finns alltså olika åsikter om de nya riktlinjerna och de är ännu inte heller fullt implementerade inom humanmedicinen. Målet med dem är att standardisera och ge samstämmighet i hur sepsis definieras och bedöms. Detta förutsätter dock att de får en bred acceptans och användning, och först då kan de utvärderas i större omfattning.

Tabell 2. qSOFA-kriterierna, baserad på tabell av Singer et al., 2016

qSOFA-kriterie	Poäng
AF ≥ 22/min	1
Ändrad mentalstatus	1
Systoliskt blodtryck ≤ 100 mm Hg	1

qSOFA = quick Sepsis-related Organ Failure Assessment, AF = andningsfrekvens.

### Sepsiskriterier för hund

Poängsystemet SOFA, som föreslås i de nya sepsisriktlinjerna på humansidan, har anpassats och utvärderats i en studie hos kritiskt sjuka hundar (Ripanti *et al.*, 2012), men har ännu inte utvärderats i större omfattning inom veterinärmedicinen för sepsis. Istället används främst de äldre SIRS-kriterierna vid misstanke om sepsis hos hund. Olika referensintervall för parametrarna som definierar tillståndet har tagits fram av Hauptman *et al.* (1997) och DeClue (2017), vilka presenteras nedan (Tabell 3). Två eller fler av kriterierna ska vara uppfyllda, samt att en infektion föreligger, för att individen ska anses ha sepsis.

Tabell 3: Jämförelse av referensintervall för SIRS-kriterier hos hund

SIRS-kriterier	Hauptman <i>et al.</i> , 1997	DeClue, 2017
Kroppstemperatur	<38,1°C eller >39,2°C	<37,2°C eller >39,2°C
HF	>120 slag/min	>140 slag/min
AF	>20 andetag/min	>40 andetag/min
LPK	<6 x10 <sup>9</sup> /l eller >16 x10 <sup>9</sup> /l eller > 3 % stavformiga neutrofiler	<5 x10 <sup>9</sup> /l eller >19,5 x10 <sup>9</sup> /l eller > 5 % stavformiga neutrofiler

SIRS = Systemic Inflammatory Response Syndrome, HF = hjärtfrekvens, AF = andningsfrekvens, LPK = leukocytpartikelkoncentration.

Med referensintervallen satta enligt Hauptman *et al.* (1997) fås en sensitivitet på 97 % och en specificitet på 64 % för sepsis hos hund. De referensintervall som föreslås av DeClue (2017) är snävare och sensitivitet och specificitet finns inte dokumenterat. SIRS-kriterierna har dock generellt inte optimal sensitivitet och specificitet, men för att utvärdera risken för sepsis och prognos för kritiskt sjuka hundar anses de dock användbara kliniskt (Okano *et al.*, 2002).

### Immunförsvaret vid sepsis

Sepsis är som ovan nämnt ett komplext och dynamiskt inflammatoriskt syndrom som utvecklas på grund av ett dysreglerat immunologiskt svar på infektion. Detta leder till organsvikt och att kroppens homeostas tillslut inte längre kan upprätthållas (Deutschman & Tracey, 2014). Tidigare ansågs det framförallt vara en hyperinflammation som orsakade sepsissyndromet, men i Sepsis-3 framhävs att det inte bara är proinflammatoriska mediatorer som ligger bakom syndromet utan även antiinflammatoriska. Att det är just obalansen i dessa system som orsakar allvarlig sjukdom och ökad dödlighet vid en infektion (Singer *et al.*, 2016). Den fullständiga patogenesen för sepsis är ännu inte känd men både värdfaktorer såsom anatomisk lokalisering av infektionen, genetik och samtidig sjukdom och typ av patogen och dess egenskaper gällande virulens och infektionsdos spelar in för det svar som skapas (DeClue, 2017).

Det akuta inflammatoriska svaret vid infektion sker genom det medfödda immunförsvaret där strukturer från exempelvis bakterier fungerar som en första varningssignal till immunsystemet, en så kallad pathogen associated molecular pattern (PAMP). Dessa PAMP binder sedan till receptorer, så kallade pattern recognition receptors (PRR), bland annat Toll-like receptors (TLR), hos immunförsvarsceller. Bindningen till PRR aktiverar intracellulära signalvägar vilket vid sepsis resulterar i kraftig frisättning av proinflammatoriska mediatorer såsom cytokiner och

kemokiner. Detta leder i sin tur till exempelvis rekrytering av fagocyterande celler såsom neutrofiler som är mycket viktiga i svaret mot bakteriella infektioner. Vid infektion med Gramnegativa bakterier såsom *E. coli* vid pyometra, fungerar lipopolysackarid (LPS) som PAMP och de proinflammatoriska cytokinerna tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), IL-6 och IL-8/CXCL8 frisätts tidigt i förloppet. Dessa stimulerar i sin tur frisättningen av kväveoxid i cirkulationen samt prostaglandiner och leukotriener som påverkar det vaskulära systemet och uppreglering av adhesionsmolekyler (Tizard, 2013; DeClue, 2017).

Senare aktiveras även komplementsystemet och det adaptiva immunsystemet via antigenpresenterande celler. T-celler differentierar till antingen T-hjälparceller av typ 1 (Th1) och Th17 eller Th2, vilket avgör vilka ytterligare cytokiner som produceras. Regulatoriska T-celler (Treg) är en typ av T-celler som reglerar och balanserar det immunologiska svaret. Ett Th1- eller Th17-svar leder till frisättning av TNF, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-2, IL-12 och leukotriener respektive IL-17A. Dessa driver ett proinflammatoriskt svar medan en aktivering av Th2 och Treg kan leda till frisättning av antiinflammatoriska cytokiner som bland annat IL-10 och TGF- $\beta$ . En reglering mot ett antiinflammatoriskt svar ämnar att balansera nedbrytningen av vävnader och apoptos av celler för att möjliggöra en läkningsfas (Tizard, 2013; DeClue, 2017).

Denna reglering är dock störd vid sepsis och idag anses en individ med sepsis kunna svänga mellan, och också simultant ha, ett hypo- och hyperinflammatoriskt svar under sjukdomsförloppet, vilket gör syndromet komplext att diagnosticera och behandla (Hotchkiss *et al.*, 2013). Vid sepsis sker en övergång från lokaliserad infektion och inflammation till en systemisk via den storm av mediatorer som frisätts och aktiverar immunceller på andra platser i kroppen. I det hyperinflammatoriska stadiet kan sepsis leda till vasodilatation, vaskulärt läckage, hypotension, aktivering av koagulationskaskaden, feber och organdysfunktion då påverkan på cirkulationen och nedbrytningen av vävnaderna blir för kraftig. På en cellulär nivå ses vid sepsis defekt barriärfunktion och dysfunktion hos mitokondrier, vilket leder till att energin tar slut, och ultimatum inträffar då organsvikt (Deutschman & Tracey, 2014). Individer i ett hypoinflammatoriskt stadiet av sepsis verkar ha en ökad apoptos (Hotchkiss *et al.*, 1999) och anergi hos immuncellerna, vilket leder till immunoparalys, och kroppen kan därför inte bekämpa infektionen och riskerar att drabbas av sekundärinfektioner (DeClue, 2017). Sepsis är dock inte bara ett resultat av en obalans i det immunologiska svaret utan också i de neurologiska och neuroendokrina systemen, vilka i normala fall interagerar tätt tillsammans för att upprätthålla kroppens homeostas (Deutschman & Tracey, 2014). Detta bidrar till att komplexiteten av patogenesen för sepsis ökar ytterligare.

### **Biomarkörer för sepsis**

På grund av att sepsissyndromet orsakas av en kraftig frisättning av just immunförsvarsmediatorer har flera av dessa uppmärksammats som möjliga biomarkörer för att kunna upptäcka sepsis i ett tidigt stadium. En biomarkör är en indikator som kan mätas i kroppsvätskor eller vävnader. När den påvisas eller förekommer i lägre eller högre nivå än ett satt gränsvärde visar detta på att ett visst tillstånd föreligger i kroppen. För att vara användbar diagnostiskt bör en biomarkör ha hög sensitivitet och specificitet för att kunna urskilja individer med ett visst tillstånd från de som inte har det. Många potentiella biomarkörer har utvärderats i studier, men ingen enskild markör har ännu visats på ett säkert sätt kunna identifiera hundar med sepsis.



Nedan presenteras några utvalda som redan används som inflammationsmarkörer inom human- och veterinärmedicinen, samt några där resultat tyder på att de kan vara potentiella framtida biomarkörer för sepsis.

### **C-reaktivt protein**

CRP är ett akutfasprotein som produceras i levern och frisätts vid inflammation och infektion. På klinikerna idag används denna redan frekvent eftersom det finns en automatiserad hundspecifik analysmetod, vilket gör den till en attraktiv markör att använda i sepsisdiagnostiken. CRP i serum kan stiga kraftigt vid akut inflammation vilket gör det användbart vid akuta inflammationstillstånd och infektioner, samtidigt som det också sjunker när inflammationen minskar. Det ger möjlighet att följa svar på exempelvis antibiotikabehandling genom upprepade CRP-mätningar (Fan *et al.*, 2016).

Vid pyometra används idag CRP ofta som del i diagnostiken och i studier av tikar med pyometra, CEH, mukometra och friska kontroller har CRP visats vara signifikant högre hos de med pyometra (Enginler *et al.*, 2014; Jitpean *et al.*, 2014a). Liknande resultat sågs i en annan studie där CRP tillsammans med andel stavformiga neutrofiler gav en sensitivitet på 97,7 % och en specificitet på 75 % för att urskilja pyometra från tikar med CEH och mukometra (Fransson *et al.*, 2004). CRP visades också vara korrelerat till längd på sjukhusvistelsen, ett mått som används för allvarlighetsgrad av sjukdom, och sågs vara ett bra mått på återhämtning vid pyometra (Fransson *et al.*, 2004; Dabrowski *et al.*, 2009). Nackdelen i sepsisdiagnostiken är att CRP är ospecifik och stiger inte bara vid infektion utan även vid inflammatoriska tillstånd såsom autoimmuna sjukdomar och vid trauma. CRP stiger dock ofta kraftigare vid allvarliga infektioner. Enligt en humanstudie av Povia *et al.* (1998) bör dagliga CRP-mätningar utföras på patienter i risk att utveckla sepsis och ett CRP-värde på 50 mg/l eller högre bör föranleda en stark misstanke för sepsis, med en sensitivitet på 98,5 % och specificitet på 75 %. Något liknande gränsvärde har ännu inte hittats för hund inom veterinärmedicinen varför CRP inte kan användas som en specifik biomarkör för sepsis.

### **Procalcitonin**

Procalcitonin (PCT) är en prekursor till kalcitonin, ett hormon som styr kalcium- och fosfatbalansen i kroppen. PCT upptäcktes förekomma i förhöjda nivåer vid bakteriella infektioner och sepsis av Assicot *et al.* (1993) och PCT används idag inom humanmedicinen vid diagnosticering av sepsis (Fan *et al.*, 2016).

En humanstudie av Harbarth *et al.* (2001) visade att ur en grupp patienter med misstänkt infektion och SIRS var PCT den biomarkör som bäst kunde urskilja patienter med sepsis, jämfört med IL-6 och CXCL8. Vid ett gränsvärde på 1,1 ng/ml gav PCT en sensitivitet på 97 % och en specificitet på 78 % för att skilja ut patienter med SIRS från de med sepsis eller septisk chock. Becker *et al.* (2008) visade att PCT är förhöjt vid infektion, men även vid icke-infektösa tillstånd, varför den inte sågs vara en specifik biomarkör för infektion eller sepsis. I översiktsstudier av humanartiklar med mål att utröna om PCT kan urskilja septiska patienter från en grupp med SIRS fanns inte entydigt stöd för att ett förhöjt PCT-värde kan användas diagnostiskt för att identifiera patienter med sepsis (Gattas & Cook, 2003; Pierrakos & Vincent,

2010). Gattas & Cook (2003) fann dock att ett lågt PCT-värde var användbart för att utesluta sepsis.

Studier på hästar har också visat att PCT kan identifiera individer med SIRS med gott resultat, men studien särskiljer inte mellan infektiös eller icke-infektiös bakgrund (Bonelli *et al.*, 2015). En kommersiellt tillgänglig ELISA för PCT hos hund har testats men kunde inte identifiera PCT i blod från hundar (Floras *et al.*, 2014b). I dagsläget verkar därför inte PCT, med de metoder som finns att tillgå, kunna användas som biomarkör för sepsis hos hund, och trots att den används är även dess värde som sepsismarkör i humanmedicinen diskuterad.

### **High-mobility group box protein-1**

High-mobility group box protein-1 (HMGB1) är ett intracellulärt DNA-bindande nukleärt protein som normalt säkerställer att DNA veckas rätt, men som vid inflammation och infektion kan fungera som en DAMP och en alarmin (Wang *et al.*, 1999). Det frisätts från makrofager vid bakteriell infektion och från skadade och döende celler och binder sedan till olika TLR som via frisättning av cytokiner har en proinflammatorisk verkan (Bianchi *et al.*, 2017). I slutet av en inflammatorisk process har dock HMGB1 en roll i reparation och läkning. Proteinet är också inblandat i tumörbiologi och kan mätas i förhöjda nivåer i blodet hos människor med mesotheliom (Yang *et al.*, 2010).

Karlsson *et al.* (2008) visade att något förhöjda nivåer av HMGB1 förekom hos människor med svår sepsis jämfört med friska kontroller, men proteinet sågs inte kunna användas för att förutspå mortalitet. HMGB1 sågs inte heller på människa kunna skilja mellan icke-infekterade från infekterade patienter, med eller utan SIRS (Gaïni *et al.*, 2007). Yu *et al.* (2010) undersökte HMGB1 som en prognostisk markör för hundar med SIRS och fann en signifikant högre koncentration i plasma av HMGB1 för de hundar som inte överlevde efter att ha diagnosticerats med SIRS jämfört med överlevande hundar. Hos friska kontrollhundar kunde HMGB1 inte uppmätas i detekterbara nivåer extracellulärt (Yu *et al.*, 2010). I en annan studie som jämförde CRP med HMGB1 som diagnostisk biomarkör vid sepsis hos tikar med pyometra uppmättes dock HMGB1 i detekterbara nivåer även hos friska hundar (Karlsson *et al.*, 2013). I samma studie visade sig HMGB1 också ha begränsad potential att diagnosticera sepsis hos hund då denna inte sågs kunna skilja sepsispositiva hundar från sepsisnegativa. Trots dess tydliga koppling till inflammationsprocessen har dess frisättning alltså inte setts vara specifik för infektion och användbarheten av HMGB1 som biomarkör för sepsis har inte kunnat visas.

### **Systemiska inflammatoriska cytokiner**

IL-1, TNF- $\alpha$  och IL-6 är som tidigare nämnt proinflammatoriska cytokiner som frisätts tidigt i svaret vid bakteriell infektion. De aktiverar det medfödda immunförsvaret, såsom kemotaxis av neutrofiler, och initierar produktion av akutfasproteiner, såsom CRP, i levern. De kan också aktivera ett systemiskt svar via påverkan på sensoriska nerver och genom direkt påverkan på exempelvis hypothalamus termoreglering vilket leder till feber. IL-6 påverkar, utöver det medfödda immunförsvaret, flera olika funktioner i det adaptiva immunförsvaret såsom T-cells proliferation och B-cellers produktion av immunoglobuliner (Van Snick, 1990). IL-6 har även setts ha antiinflammatoriska och regulatoriska egenskaper (Biffi *et al.*, 1996). En annan övervägande antiinflammatorisk cytokin med immunoregulatorisk verkan är IL-10. IL-10 kan

dämpa både det medfödda och det adaptiva immunförsvaret genom att hämma frisättningen av IL-1, IL-6 och TNF- $\alpha$  och också inducera anergi mot specifika antigen.

En studie som undersökte cytokinfrisättningen efter injektion av LPS från *E. coli* hos hundar såg en förhöjd koncentration av IL-6, IL-10 och TNF- $\alpha$  i blodprover tagna 1, 2 och 4 timmar efter injektion (Floras *et al.*, 2014a). I en studie av DeClue *et al.* (2012) på hundar med SIRS, av både infektiös och icke-infektiös bakgrund, kunde förhöjda nivåer av både TNF- $\alpha$  och IL-6 uppmätas, men lägre nivåer av den antiinflammatoriska cytokinen IL-10, jämfört med friska kontroller. Rau *et al.* (2007) uppmätte också högre koncentration av IL-6 i plasma hos hundar med sepsis och höga nivåer av IL-6 var korrelerat med allvarligare sjukdom och mortalitet. Detta stämmer överens med humanstudier där IL-6 har visats vara en användbar prognostisk markör vid sepsis, framförallt i senare stadium och vid septisk chock (Damas *et al.*, 1992; Oda *et al.*, 2005). Fransson *et al.* (2007) såg dock ingen skillnad mellan friska tikar och tikar med pyometra gällande koncentrationen IL-6 i blod, men TNF- $\alpha$  var förhöjd vid pyometra. Dock kunde ingen av de två cytokinerna skilja tikar med pyometra och sepsis från de utan sepsis. I en multiplex cytokinanalys med tolv olika cytokiner sågs inte heller IL-6 kunna urskilja hundar med pyometra och sepsis från de utan sepsis eller friska kontroller (Karlsson *et al.*, 2016). De systemiska inflammatoriska cytokinernas användbarhet som biomarkörer för sepsis är alltså inte helt klarlagt, men dess tydliga koppling till patogenesen vid infektion och sepsis gör dem fortsatt intressanta i sökandet efter biomarkörer för sepsis.

### **KC och andra CXCL-kemokiner**

Kemokiner är kemotaktiska cytokiner som produceras av bland annat makrofager stimulerade av IL-1 och TNF- $\alpha$  vid infektion och de har funktionen att attrahera leukocyter till platsen för inflammation. De delas in i olika familjer beroende på strukturella skillnader i aminosyrasekvensen, som också påverkar deras förmåga att attrahera olika typer av leukocyter. CC-familjen har de två första cysteiner (C) bredvid varandra medan CXC-familjen har de två första cysteiner separerade med en annan aminosyra (X). CXCL-kemokinerna delas också in efter om de är ELR+ eller ELR-, beroende på om deras N-terminal utgörs av denna aminosyrasekvens. ELR+ kemokiner attraherar och aktiverar framförallt neutrofiler medan ELR- kemokiner framförallt attraherar lymfocyter och monocyter (Proost *et al.*, 1996). Kemokinernas effekt beror också på receptoruttrycket av deras receptorer. Ett antal olika receptorer finns för CXC-kemokinerna, bland annat CXC-receptor 1 (CXCR1) och CXCR2, som finns på ytan av leukocyter. Olika CXCL-kemokiner binder med olika affinitet till de olika typerna av receptorer vilket styr effekten (Proost *et al.*, 1996).

En av de mest studerade CXCL-kemokinerna är CXCL8. Den har hos människa setts vara den mest potenta i rekrytering och aktivering av neutrofiler vid bakteriell infektion (Yoshimura *et al.*, 1987; Proost *et al.*, 1993b; a). Det sker som ovan nämnt via bindning till CXCR1 och CXCR2 som uttrycks på neutrofilerna. När CXCL8 jämfördes *in vitro* med CXCL1/KC, CXCL5, CXCL6 och CXCL10 visades både CXCL1 och CXCL6 nå samma maximala effekt på neutrofiler som CXCL8, men de krävde högre koncentrationer (Proost *et al.*, 1993a). CXCL5 hade lägre potens än CXCL1, och CXCL10 sågs inte ha effekt i de analyserade koncentrationerna. Författarna framhåller att detta inte behöver betyda att deras roll är mindre framträdande vid inflammation då de frisatta koncentrationerna kan variera *in vivo*. I en annan

studie visades CXCL6 från mus ha högre kemotaktisk effekt än CXCL1 från mus och CXCL8 har ännu inte hittats hos mus, varför CXCL6 kan fungera som den viktigaste kemokinen för neutrofiler hos mus (Wuyts *et al.*, 1997). CXCL5, CXCL6 och CXCL7 har också visats ha en direkt baktericid effekt på gramnegativa och grampositiva bakterier liknande den för defensiner (Linge *et al.*, 2008). Den antibakteriella effekten visade sig i studien vara starkare hos CXCL6 än hos både CXCL5 och CXCL7.

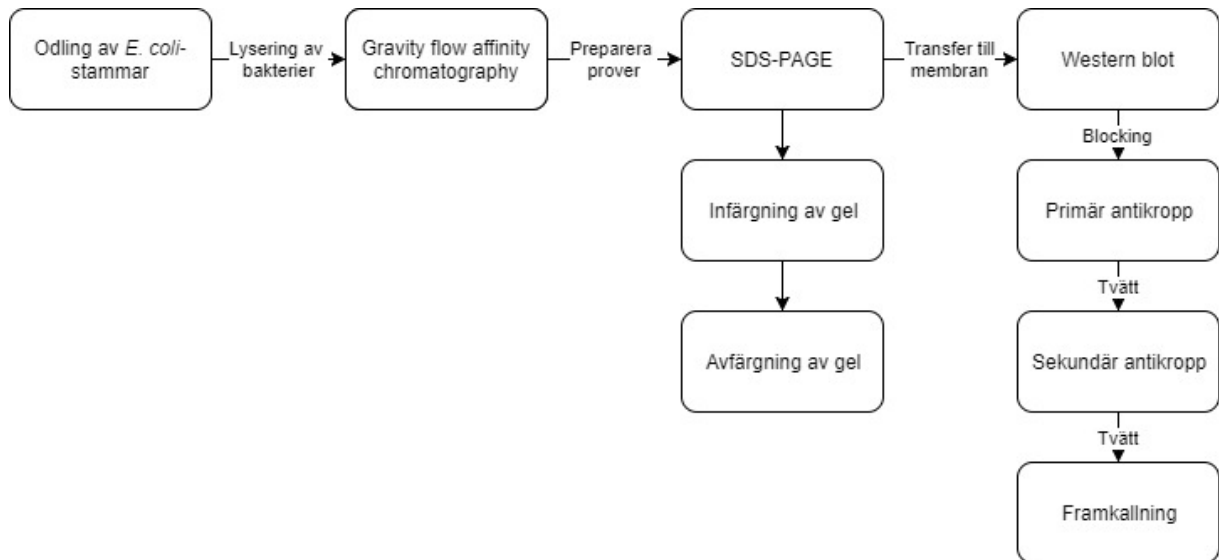
På grund av deras tydliga samband med bakteriell infektion har också möjligheten att detektera CXCL-kemokinerna i cirkulationen vid sepsis studerats. Hirao *et al.* (2000) stimulerade humana blodceller i helblod med bland annat LPS från *E. coli*-bakterier och kunde uppmäta förhöjda koncentrationer av CXCL8. Hos människa har CXCL8 uppmätts i förhöjda nivåer systemiskt hos individer med sepsis (Hack *et al.*, 1992; Hirao *et al.*, 2000). CXCL8 visades dock inte förekomma i förhöjda nivåer hos hundar jämfört med hundar med icke-infektiös SIRS och friska kontroller (DeClue *et al.*, 2012).

KC-like, som tidigare nämnt ett protein som binder till en antikropp riktad mot KC/CXCL1 hos mus, har i nya studier undersökts hos hund. Högre serumkoncentrationer av KC-like, kunde ses hos hundar injicerade med LPS från *E. coli* 1, 2 och 4 timmar efter injektion och högre koncentrationer av CXCL8 och CXCL10 efter 4 timmar jämfört med placebogruppen (Floras *et al.*, 2014a). Karlsson *et al.* (2016) såg i sin tur en förhöjd nivå av KC-like hos hundar med pyometra och SIRS jämfört med de utan SIRS. Därför jämförde forskarna också gensekvensen för KC hos mus och människa med hundens genom och de fann då högst likhet med CXCL-kemokinerna CXCL7, CXCL5 och IL-8/CXCL8, men ingen gen hos hund som motsvarade KC kunde hittas. CXCL7 uppvisade högst likhet (88,6 %) jämfört med CXCL5 (77,8 %) och CXCL8 (75,5 %).

Liksom cytokinerna har kemokinerna visats vara inblandade i utvecklingen av sepsis men resultaten har hittills visat viss tvetydighet för de nämnda CXCL-kemokinerna. En förhöjd nivå hos tikar med pyometra och sepsis har dock visats för det ännu okända proteinet KC-like hos hund, vilket pekar på att den skulle kunna användas som biomarkör för sepsis hos hund.

## **MATERIAL OCH METODER**

Studien omfattade två olika delar, en första del där de utvalda kemokinerna CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 och CXCL10 odlades och renades fram med gravitationsflödes-affinitetskromatografi och analyserades genom Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) och western blot (Figur 2). Detta utfördes för att se hur specifik den antikropp mot mus-KC är och om denna binder till någon av de framrenade hundkemokinerna, för att ta reda på vilket protein KC-like är hos hund. I den andra delen av studien analyserades blodproverna tagna från tikar med pyometra och friska kontroller med ELISA med antikropp mot mus-KC. Detta för att se om nivåerna av det KC-antikroppen binder till skiljer sig signifikant hos hundar med sepsis jämfört med de utan sepsis.



Figur 2. Översikt över processen för odling, SDS-PAGE, Western blot.

### Odling och framrening av kemokiner

Redan klonade *E. coli* av stam BL21(DE3)plysS, en stam av bakterien som saknar kända proteaser, innehållande plasmider med gener för de olika kemokinerna, CXCL5, CXCL6, två olika kloner av CXCL7 (benämnda CXCL7.1, CXCL7.2), CXCL8 och CXCL10 användes. Dessa kemokiner valdes ut på grund av att de visats vara de med störst likhet med mus-KC i en studie av Karlsson *et al.* (2016). Molekylvikt för CXCL-kemokinerna är ungefär 10 kDa. Vid kloningen har även en His-tag infogats för varje kemokin för att i senare steg möjliggöra framrening av dessa, varför kemokinernas molekylvikt ökas till ungefär 10-12 kDa. Varje *E. coli*-klon ströks på respektive uppmärkt agarplatta med ampicillin (0,1 mg/ml) och kloramfenikol (0,034 mg/ml) och sattes för inkubering i 37°C över natt. Därefter fördes kolonierna över till 15 ml Lysogeny Broth-medium (LB-medium) med tillsatt ampicillin (0,1 mg/ml) och kloramfenikol (0,034 mg/ml). Dessa sattes i roterande inkubator i 37°C i 3 timmar och sedan fördes kulturerna över till 200 ml LB-media med ampicillin och kloramfenikol och inkuberades i 5 timmar.

Kulturerna överfördes till LB-plus medium och fördelades i flaskor á 500 ml med tillsatts av 50 ml 10X M9-salt, 5 ml glukos 40 %, 0,5 ml magnesiumsulfat (1M), 0,5 ml kloramfenikol (34 mg/ml), 0,5 ml ampicillin (100 mg/ml) samt 0,5 mM Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), som inducerar uttryck av proteiner via transkription av gener. Kulturerna inkuberades över natt i 25°C. Kulturerna centrifugerades och varje pellet suspenderades i 50 ml buffert bestående av 25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,4 M NaCl. Suspensionen hälldes över i glasbägare (100 ml i varje bägare) och 50  $\mu$ l DNase (slutlig koncentration 3,5  $\mu$ g/ml) tillsattes till respektive bägare. DNase bryter upp DNA som underlättar kommande steg.

I ett första steg utfördes en optimering där bakterierna inkuberades med IPTG i två olika temperaturer, 25°C respektive 30°C, för att ta reda på vilken temperatur som var mest optimal för produktionen av kemokinerna. Därefter användes även tre olika pH, pH 7, 7,6 och 8 för att kunna ta reda på i vilket pH som störst andel av kemokinerna förekom i löslig form.

Därefter kördes lösningarna genom en Cell disrupter (Constant systems, Inc., UK) som med hjälp av högt tryck lyserar bakteriecellerna när lösningen trycks genom två membran. Lösningarna centrifugerades därefter i 14500 rpm i 30 minuter. Supernatanten innehåller efter centrifugering de lösliga proteinerna.

### **Gravitationsflödes-affinitetskromatografi**

Gravitationsflödes-affinitetskromatografi användes för att rena fram proteinerna, CXCL5, CXCL6, CXCL7.1, CXCL7.2, CXCL8 och CXCL10. Kolonner förbereddes genom att tillsätta en lösning med Nickel-Sepharose. Nickel-Sepharose innehåller nickeljoner som de proteiner som har His-tag binder till, vilket CXCL-proteinerna som användes i försöket har, övriga proteiner passerar. Bägarna med de olika kemokinerna kopplades till varsin kolonn och lösningen flöddades genom kolonnen över natt i kylrum.

Dagen efter tvättades kromatografikolonnerna så att icke-bundna proteiner tvättades bort och enbart de proteinerna med His-tag fanns kvar bundna till kulorna i kolonnen. Två olika tvättbuffert tillreddes, tvättbuffert 1 med 5 mM Imidazol, 25 mM Tris/HCl, pH 8 och 0,4 M NaCl och tvättbuffert 2 med 30 mM Imidazole, 25 mM Tris/HCl, pH 8 och 0,4 M NaCl. Eluering av bundet protein startades med buffert av 0,3 M Imidazol, 25 mM Tris/HCl, pH 8.0 och 0,4 M NaCl. Proteinlösningen fångades upp i Eppendorfrör med ungefär 1,5 ml i varje fraktion. För att kontrollera att fraktionerna innehöll de rena kemokinerna kördes SDS-PAGE på utvalda fraktioner av varje kemokin.

### **SDS-PAGE**

SDS-PAGE är en metod som används för att separera protein beroende på dess storlek. Resultatet är en gel med band på olika nivåer som motsvarar storleken på proteinerna och genom att veta storleken på det protein som söks kan detta identifieras. SDS är en anjonisk tensid som används för att denaturera proteinerna genom att SDS hindrar nästan alla icke-kovalenta interaktioner i proteinerna. Detta tillsätts till proverna som ska köras på gelen och gör att proteinerna hålls separerade och passerar genom gelen beroende på varje enskilt proteins storlek.

Buffert innehållande 50 mM Tris/HCl pH 6.8, 5 % SDS, 18 % Glycerol, 20 mM Dithiothreitol (DTT) och 0,2 % Bromophenol blue tillsattes till proverna. Proverna förbereddes genom att 30 µl av varje kemokin som skulle sättas på gelen fördes över i ett Eppendorfrör tillsammans med 30 µl av bufferten beskriven ovan. Rören kokades därefter i 3 minuter i värmeblock. Därefter sattes prover på gelen med 15 µl i varje brunn. I första brunnen sattes alltid 6 µl av en proteinstege med protein av känd molekylvikt. En proteinstege (Low molecular weight) användes vid enbart SDS-PAGE och en annan proteinstege (Spectra™ BR, Multicolor broad range protein ladder) användes om gelen skulle användas för western blot. Elektroforesbuffert, bestående av 20mM Tris/HCl, 190 mM Glycin och 0,1 % SDS, fylldes på och elektroforesen startades på 165 V i en timme. Gelerna plockades ur satserna och lades för infärgning i Coomassie brilliant blue R-250 över natten. Morgonen efter avfärgades de genom att kokas i mikrovågsugn och de skannades därefter in och analyserades.

## **Western blot**

Överföring av proteinerna från SDS-PAGE-geler till membran som sedan användes för western blot utfördes genom så kallad semi-dry transfer. Detta innebar att gelerna lades i transferbuffert bestående av 25 mM Tris, 200 mM Glycin och 20 % metanol på ett nitrocellulosa- respektive polyvinylidendifluoridmembran (PVDF-membran) med tre stycken filterpapper på var sida om gelen och membranet. Nitrocellulosamembran användes enbart i den första western blot analysen, resterande analyser utfördes med PVDF-membran. Därefter lades dessa mellan två keramiska block med membranet nederst och gelen ovanpå (detta då pluspolen utgjordes av det nedersta keramiska blocket och proteinerna är negativt laddade vilket gör att de vandrar nedåt mot membranet). Det andra keramiska blocket lades ovanpå och ström kopplades över de två blocken, 180 milliampere under en timme. För att kontrollera att överföring skett lades gelerna därefter för infärgning (Coomassie brilliant blue R-250).

Membranen användes sedan till western blot, även kallat immunoblot. Det är en detektionsmetod för att identifiera protein som bygger på användningen av antikroppar som binder till protein på ett membran. Innan själva detektionen kan ske utförs ovan beskrivna steg med SDS-PAGE och överföring av protein till membranet. De proteiner som bundit till antikroppen kan efter tillsatts av en sekundär antikropp åskådliggöras via fluorescens genom olika detektionstekniker. Två olika western blot detektionsmetoder användes i denna studie Odyssey CLx Near-infrared Western Blot Detection (LI-COR, Biosciences, UK) och ECL Western Blotting system (GE Health care, UK).

Membranen inkuberades med Odyssey blocking buffer (LI-COR, Biosciences, UK) över natten i kylrum. Därefter hälldes blocking bufferten av och buffert bestående av Odyssey blocking buffert med TBS (Tris buffered saline), TBS-T (TBS med tillsatts av 0,1 % Tween 20) och den primära antikroppen mot mus KC, Monoclonal Rat IgG2A (klon #48415, R&D systems, Inc., USA) till en spädning av 1:400 tillsattes och membranet inkuberades över natt på skakplatta i kylrum. Dagen efter tvättades icke-bunden antikropp bort med 1X TBS-T (0,1 % Tween 20) under 5 minuter 5 gånger på skakplatta i rumstemperatur. Efter denna procedur inkuberades membranet i buffert bestående av Odyssey blocking buffer med TBS, 0,2 % Tween 20 och den sekundära antikroppen Goat anti-rat (IRDye®800CW, LI-COR, UK) till en spädning av 1:12000 av antikropp i en timme på skakplatta i rumstemperatur övertäckt, då den sekundära antikroppen är ljuskänslig. Den sekundära antikroppen tvättades bort enligt ovan beskriven tvätt. En sista sköljning med TBS utfördes som sista steg för att tvätta bort all Tween 20. Membranen framkallades därefter med Odyssey CLx Near-infrared Western Blot Detection som skickar ut infrarött ljus och läser av fluorescens i våglängderna 700 nm och 800 nm från de proteinband som bundit KC-antikroppen, varvid en bild skapas.

För kontroll av uttrycket av kemokinerna tvättades KC-antikroppen bort från membranet efter framkallningen. Detta utfördes genom att låta membranerna inkubera med 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS och 0,1 % Tween 20 i 10 minuter två omgångar i rumstemperatur. Därefter inkuberas de i enbart TBS i 10 minuter två omgångar och sist med TBS-T i 5 minuter i två omgångar. Genom dessa steg är sedan membranet redo för blockering inför en ny western blot. Blockeringen utfördes i detta fall med en buffert bestående av 3 % skummjölkspulver (Semper AB, Sverige) och resterande TBS-T och membranerna inkuberades i 30 minuter i rumstemperatur.

I studien användes sedan en primär antikropp riktad mot His-tag på proteinerna, Monoclonal mouse IgG2a anti-his antibody (27-4710-01, GE Health care, UK) som tillsattes till en spädning av 1:2500 i skummjölksbufferten. Inkubering skedde sedan i 2 timmar i rumstemperatur och tvätt skedde enligt ovan tvättprocedur men i enbart 3 omgångar. Inkubering med sekundär antikropp, ECL™ Anti-mouse IgG (horseradish peroxidase linked F(ab')<sup>2</sup> fragment from sheep, NA9310V, GE Health care, UK) skedde sedan i en spädning av 1:4800 i skummjölksbufferten under en timme i rumstemperatur. Ytterligare en tvätt utfördes enligt ovan och därefter framkallades membranet. Framkallningen skedde genom att ECL Prime Western blotting detection reagent (ECL, GE Health care, UK) upprepade gånger sköljdes över membranet. Reagenten reagerar med ett enzym som finns kopplat till den sekundära antikroppen, så kallad kemiluminescens immunodetektion. När membranet sedan läggs i ECL™ Western Blotting system (ChemiDoc™ Touch, Imaging System, BIO-RAD, UK) som skickar ut ljus mot membranet fluorescerar detta komplex och maskinen skapar en bild av detekterad fluorescens.

### **Provinsamling**

Den andra delen av studien innefattade en provinsamling av tikar diagnosticerade med pyometra som inkom till smådjurskliniken på Universitetsdjursjukhuset (UDS) vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala, Sverige, under våren och hösten år 2017. Studien har erhållit godkännande från djurförsöksetiska nämnden, godkännandenummer 21/2016. Tikar togs med i studien efter att preliminär diagnos av pyometra ställts baserat på anamnes, klinisk undersökning, blodprovanalyser och bilddiagnostik (ultraljud och/eller röntgen) och efter medgivande från djurägaren. Diagnosen bekräftades med bakteriologisk odling och makroskopisk och histologisk undersökning av livmodern efter OHE. Tikar med tidigare känd sjukdom uteslöts från studien genom kontroll av journaler och anamnes. Efter genomgång av dessa data inkluderades 23 tikar i studien, varav sex stycken var kontroller. Nio tikar togs med från provinsamling som skett under år 2011-2013. Blodprover från dessa tikar var förvarade i frys (-80°C) sedan insamlandet. Mängden blod som samlades från varje hund anpassades efter hundens kroppsvikt och allmäntillstånd. Venöst blodprov togs i EDTA- och serumrör, och i de fall där blodvolymen tillät även ett heparinrör (Becton-Dickinson, Plymouth, UK).

### **Sepsiskriterier**

Tikarna i studien delades in i tre grupper beroende på de kliniska data som samlats in; en kontrollgrupp med friska tikar som kastrerats (OHE), tikar med pyometra utan SIRS (SIRS-), och tikar med pyometra och SIRS (SIRS+). Individer med två eller fler av Hauptman *et al.*'s (1997) SIRS-kriterier uppfyllda samt påvisad infektion i livmodern via bakteriell odling och/eller histopatologisk diagnos av pyometra grupperades som SIRS+.

### **Analys av insamlade prover**

#### *Blodprovanalyser*

Vid kliniskt kemiska laboratoriet på UDS utfördes följande analyser. Fullständig hematologi med differentialräkning av vita blodkroppar och trombocyter, ALAT, albumin, ALP, gallsyror, glukos, kreatinin, urea samt CRP. För studiens specifika analyser centrifugerades separat och omgående ett serumrör ett EDTA-rör och i de fall detta kunnat samlas in även ett heparinrör i



30 000 varv/min i 10 minuter. Plasma respektive serum togs av och delades upp till 200 µl alliquoter i kryorör. Dessa förvarades direkt i frys (-80°C).

### *Bakteriologisk odling*

Efter det att livmodern opererats ut, användes en steril skalpell för att göra ett litet snitt genom livmoderväggen varefter en steril provtagningspinne för bakteriell odling (Transystem™ Amies W/CH sterile transport swab, Copan Italia S.p.A., Brescia, Italien) infördes i lumen. Provtagningspinnen skickades med remiss till Sveriges veterinärmedicinska anstalt (SVA), Uppsala, Sverige, för aerob bakterieodling samt antimikrobiell resistensbestämning.

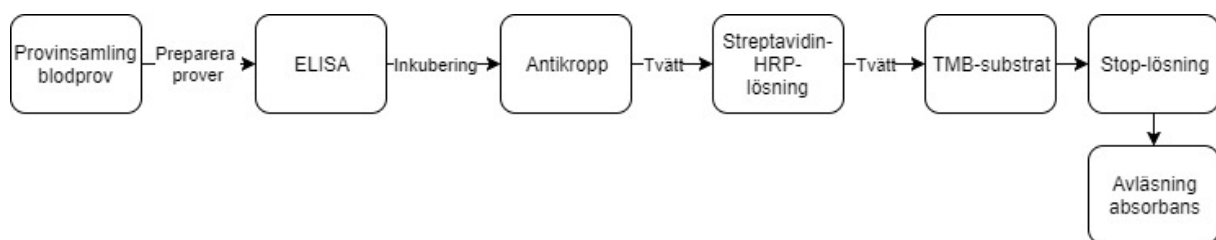
En steril spruta med 5 ml blod togs ut aseptiskt som första blodprov vid blodprovstagningen och 2,5 ml tillsattes sterilt direkt i anaerob blododlingsflaska och 2,5 ml i aerob blododlingsflaska (Biomérieux, Inc., Durham, USA). Blododlingsflaskorna förvarades därefter i värmeskåp, 37°C, och hämtades av personal från SVA inom 24 timmar för vidare odling och resistensbestämning.

### *Patologianatomisk diagnostik*

Livmodern med äggstockar togs om hand efter OHE och öppnades med steril skalpell. De tömdes på innehåll och livmodern samt äggstockar fixerades snarast efter operation i formalin varefter de transporterades till Enheten för patologi på Institutionen för biomedicin och folkhälsovetenskap vid SLU för makroskopisk och histopatologisk diagnos.

## **ELISA**

För att analysera mängden av det sökta KC-like proteinet i blodprover användes en ELISA, Mouse CXCL1 (KC) ELISA Kit (EMCXCL1, Thermo Scientific, Inc., Maryland, USA). Analysen utfördes i rumstemperatur och i enlighet med instruktionerna från tillverkaren (Figur 3). Tillverkaren till ELISA-kittet uppger en detektionsgräns på 1pg/ml och en intra-assay precision med variationskoefficient, så kallad Coefficient of Variation (CV), på <10 %.



Figur 3. Översikt över tillvägagångssätt ELISA.

Prover tillsattes i duplikat, 100 µl per brunn till en 96-håls mikrotiterplatta preparerad med Anti-Mouse CXCL1-antikropp. Plattan inkuberades på skakplatta i 2,5 timmar. Efter inkuberingen hölls lösningarna av och plattan tvättades fyra gånger med 300 µl buffert i varje brunn. Biotinylated antikropp tillsattes (100 µl i varje brunn) och plattan inkuberades på skakplatta i en timme. Därefter upprepades tvätten ovan. Till varje brunn tillsattes 100 µl Streptavidin-HRP-lösning varpå plattan inkuberades i 45 minuter på skakplatta. En ytterligare tvätt enligt tidigare procedur utfördes och därefter tillsattes 100 µl TMB substrat. Efter inkubering i 30 minuter i

mörker på skakplatta tillsattes 50 µl stopp-lösning. Till sist avlästes absorbans för 450 nm inom 30 minuter med hjälp av plattläsare, Sunrise (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

### **Statistiska analyser**

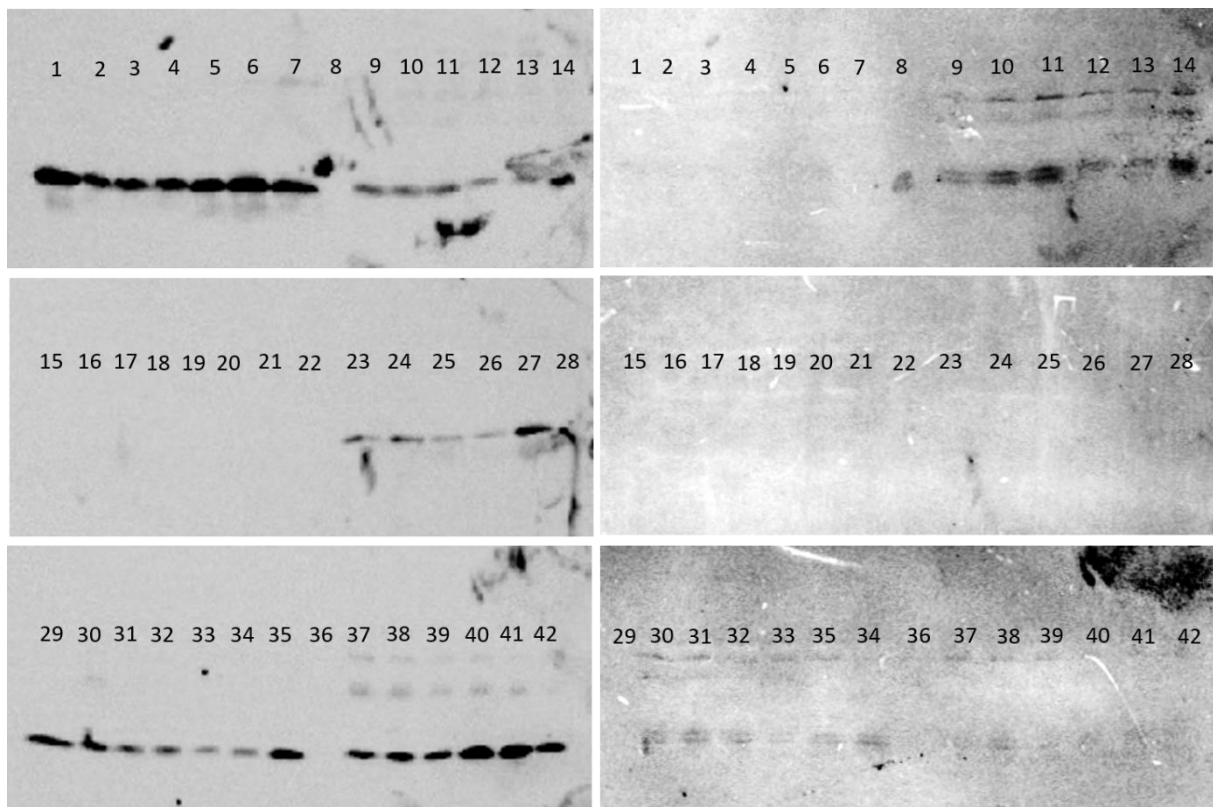
Standardkurvan och data bearbetades med statistikprogramvaran GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Kalifornien, USA). Statistiska test för icke-normalfördelade data användes på grund av få antal individer i varje grupp samt att data inte var normalfördelad enligt Shapiro-Wilks normalitetstest. Ett p-värde under 0,05 ansågs vara signifikant (\*). Kruskal-Wallis test användes för att analysera om alla tre grupper skiljde sig signifikant från varandra i koncentration KC-like. Mann Whitneys test användes sedan för att jämföra varje grupp mot varandra två och två.

## **RESULTAT**

### **Optimering av uttryck av kemokiner och interaktion med KC-antikropp**

Nedan visas resultatet av optimeringen som utfördes med två olika western blot analyser på tre stycken nitrocellulosamembran (Figur 4). Till vänster i figuren visas membran som inkuberats med primär antikropp mot protein med His-tag, efter det att KC-antikroppen tvättats bort från membranet. Detta analyserades för att kontrollera nivåerna av uttrycket och lösligheten av kemokinerna. Storleken på CXCL-kemokinerna ligger på ungefär 10-12 kDa och de band som ses i figuren motsvarar denna storlek. Generellt visar alla tre membran hög bakgrundsfärgning vilket gör proteinbanden svårare att se. Figuren visar att det för alla kemokinerna utom CXCL7.1 finns protein på membranet som binder till His-antikroppen (Figur 4B) och CXCL6 har svagast band av de som kan ses (Figur 4A). Brunn nummer 8 (Figur 4A), som ska vara tom, kan ses innehålla protein som binder His-antikroppen. Detta är troligt kontamination från brunn nummer 7 eller enbart bakgrundsfärgning vilket kan ses på alla membran. Av brunnarna för CXCL6 ses starkast band för prover odlade med IPTG i 25°C (Figur 4A), och för både CXCL6 och CXCL8 visar proverna satta på gelen med pH 8 starkast band (Figur 4A och 4B).

Till höger i samma figur visas ovan nämnda tre membran men inkuberade med antikropp mot KC, vilket utfördes för att undersöka kemokinernas interaktion med antikroppen (Figur 4). Starkast band ses för brunnarna som innehåller CXCL6 (Figur 4A), men även något svagare band ses för CXCL8 och mycket svagt för CXCL10 (Figur 4C). Alla brunnar för CXCL5, CXCL7.1 och CXCL7.2 är helt utan band.



Figur 4. Samma tre western blot-membran inkuberade med antikropp mot His-tag till vänster respektive antikropp mot KC till höger för alla CXCL-kemokinerna. På det översta membranet (4A) sattes CXCL5 och CXCL6, på det mittersta (4B) CXCL7.1 och CXCL7.2 och på det nedersta (4C) CXCL8 och CXCL10. Proverna sattes i följande ordning i brunnarna på membranerna: 1, kontroll med CXCL5 i 30°C utan pH justering; 2, CXCL5 25°C pH 7; 3, CXCL5 25°C pH 7.6; 4, CXCL5 25°C pH 8; 5, CXCL5 i 30°C pH 7; 6, CXCL5 i 30°C pH 7.6; 7, CXCL5 i 30°C pH 8; 8, tom; 9, CXCL6 25°C pH 7; 10, CXCL6 25°C pH 7.6; 11, CXCL6 25°C pH 8; 12, CXCL6 30°C pH 7; 13, CXCL6 30°C pH 7.6; 14, CXCL6 30°C pH 8; 15, kontroll med CXCL7.1 i 30°C utan pH justering; 16, CXCL7.1 25°C pH 7; 17, CXCL7.1 25°C pH 7.6; 18, CXCL7.1 25°C pH 8; 19, CXCL7.1 30°C pH 7; 20, CXCL7.1 30°C pH 7.6; 21, CXCL7.1 30°C pH 8; 22, tom; 23, CXCL7.2 25°C pH 7; 24, CXCL7.2 25°C pH 7.6; 25, CXCL7.2 25°C pH 8; 26, CXCL7.2 30°C pH 7; 27, CXCL7.2 30°C pH 7.6; 28, CXCL7.2 30°C pH 8; 29, kontroll med CXCL8 i 30°C utan pH justering; 30, CXCL8 25°C pH 7; 31, CXCL8 25°C pH 7.6; 32, CXCL8 25°C pH 8; 33, CXCL8 30°C pH 7; 34, CXCL8 25°C pH 7.6; 35, CXCL8 25°C pH 8; 36, tom; 37, CXCL10 25°C pH 7; 38, CXCL10 25°C pH 7.6; 39, CXCL10 25°C pH 8; 40, CXCL10 30°C pH 7; 41, CXCL10 30°C pH 7.6; 42, CXCL10 30°C pH 8.

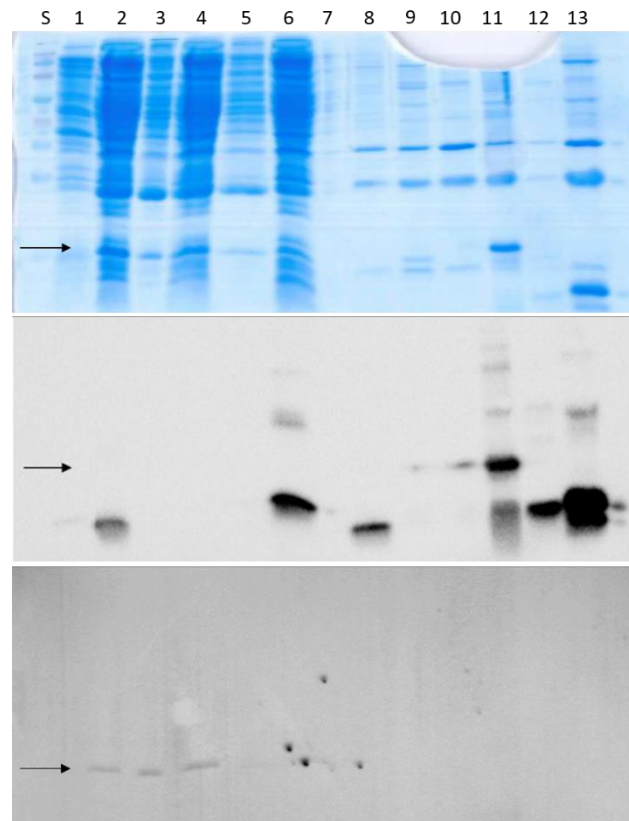
### Framrening av kemokiner och interaktion med antikropp mot mus-KC

SDS-PAGE användes för att kontrollera framreningen av CXCL-kemokinerna med gravitationsflödes-affinitetskromatografi. Flera fraktioner av varje CXCL-kemokin sattes på geler för att också utvärdera mängden protein som varje fraktion innehöll. Framreningen lyckades med gott resultat då tydliga band kan ses på gelerna i rätt storlek, ungefär 10 kDa (Appendix 1, Figur 7).

I den slutgiltiga analysen förbereddes prover från de icke-framrenade samt de framrenade fraktionerna av kemokinerna. Prover från odlingarna som sparats innan framrening användes till de icke-framrenade proverna. För de framrenade proverna användes fraktion 2 för CXCL5, CXCL7.1 och CXCL10, fraktion 6 för CXCL6 och CXCL8 samt fraktion 3 för CXCL7.2. Detta

eftersom ovan kontroll med SDS-PAGE av alla framrenade fraktionerna visat att dessa fraktioner hade ungefär motsvarande mängd protein.

Proteinband på SDS-PAGE-gelen motsvarande 10kDa ses nedan för de icke-framrenade kemokinerna, utom för CXCL5 (Figur 5A). I brunnarna för de framrenade kemokinerna ses endast CXCL7.2 ha band som motsvarar rätt molekylvikt, 10kDa. Istället ses i brunnarna för de framrenade kemokinerna tydliga band på ungefär två respektive tre gånger molekylvikten för kemokinerna, samt även för framförallt CXCL10 ett tydligt band som motsvarar en lägre molekylvikt.



Figur 5. Analyser av alla CXCL-kemokinerna, både icke-framrenade och framrenade. SDS-PAGE-gelen visas överst (5A) och nedanför denna western blot-membran inkuberat med antikropp mot His-tag i mitten (5B), respektive antikropp mot KC nederst (5C). Proverna sattes enligt följande: S, proteinstege Spectra™ BR, Multicolor broad range protein ladder; 1, icke-framrenad CXCL5; 2, icke-framrenad CXCL6; 3, icke-framrenad CXCL7.1; 4, icke-framrenad CXCL7.2; 5, icke-framrenad CXCL8; 6, icke-framrenad CXCL10; 7, tom; 8, framrenad CXCL5; 9, framrenad CXCL6; 10, framrenad CXCL7.1; 11, framrenad CXCL7.2; 12, framrenad CXCL8; 13, framrenad CXCL10. Svart pil markerar ungefär 10kDa.

Till den nya omgången western blot användes ett PVDF-membran vid överföringen från gel till membran istället för nitrocellulosamembran då det i föregående western blot ovan sågs mycket bakgrund efter framkallningen. Resultatet kan ses i figurerna ovan (Figur 5B och 5C) som visar betydligt mindre bakgrund jämfört med nitrocellulosamembranet (Figur 4).

I ovan figur visas en western blot med His-antikropp för att åskådliggöra hur mycket protein med His-tag som fanns på membranet (Figur 5B). Western blot med KC-antikroppen utfördes först på membranet och därefter tvättades antikroppen bort och en ny western blot med His-

antikropp utfördes. Detta genomfördes som en kontroll för att jämföra med western blot av samma membran med KC-antikroppen (Figur 5C), för att se hur mycket av de kemokiner som finns på membranet som KC-antikroppen binder. Det enda band som kan ses tydligt och som är i rätt storlek för kemokinerna, se svart pil, är framrenad CXCL7.2, men även ett kort litet band för framrenad CXCL7.1 ses till vänster om detta (Figur 5B). Övriga band är för protein med His-tag av lägre molekylvikt än vad kemokinerna i sin fulla längd bör ha, 10kDa. De band av dessa med lägre molekylvikt som är starkast är för CXCL10, både i icke-framrenad och framrenade prover, samt framrenad CXCL8. Detta kan jämföras med de kraftigare proteinband som sågs på SDS-PAGE-gelen överst i figuren, som också låg under 10kDa (Figur 5A). Dessa lägre proteinband fanns inte i föregående western blot med antikropp mot His-tag (Figur 4).

Nederst i figuren ovan ses även den andra analysen med western blot med antikropp mot KC, av samma membran som ovan SDS-PAGE och western blot med antikropp mot His-tag (Figur 5C). I detta fall ses enbart svaga band för de icke-framrenade kemokinerna CXCL6, CXCL7.1 och CXCL7.2 som KC-antikroppen bundit till. Storleken på dessa band är rätt, alltså ungefär 10kDa. Inga av de lägre proteinband som ses på western blot med antikropp mot His-tag kan ses.

### Kliniska data och gruppindelning

Efter provinsamlingen delades tikarna in i grupper beroende på om de bedömdes ha SIRS (SIRS+) eller inte (SIRS-) utifrån om de uppfyllde två eller fler av Hauptman *et al.*'s (1997) SIRS-kriterier och var diagnosticerade pyometra enligt ovan beskrivning. Detta resulterade i 10 tikar i SIRS+, 7 tikar i SIRS- och 6 tikar i kontrollgruppen. Information om tikarnas kliniska status ses nedan (Tabell 4).

Tabell 4. Median och spridning (lägsta och högsta värde inom gruppen) för kliniska data från tikarna i grupperna SIRS+, SIRS- och kontroll

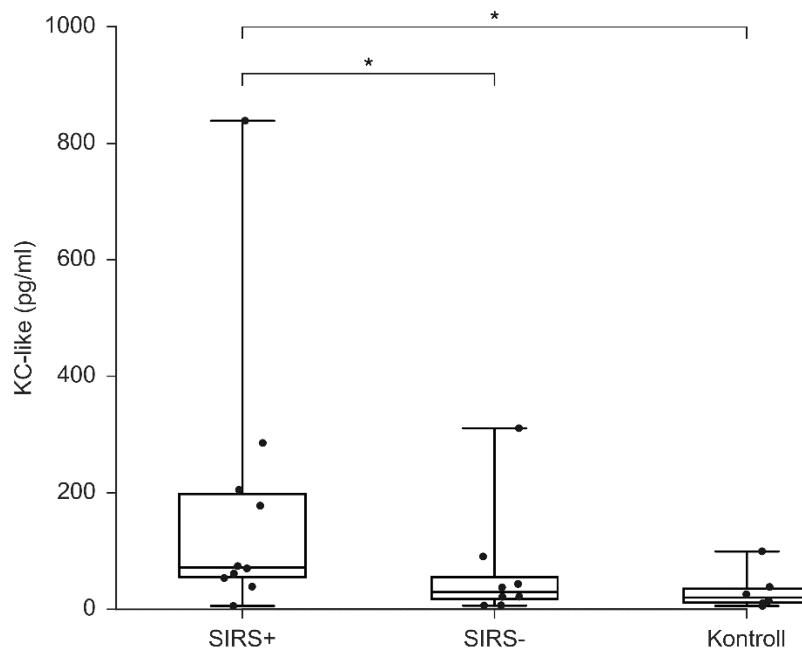
Parameter	SIRS+ (n = 10)	SIRS- (n = 7)	Kontroll (n = 6)
Ålder	6,7 år (3,9-12,6)	9 år (5,5-12,3)	2,8 år (1,9-7)
Vikt	22,8 kg (10,4-35,2)	26,3 kg (11,1-41,2)	14,5 kg (12-31)
Klinikvistelse	3 dagar (2-4)	2 dagar (2-3)	2 dagar (2)
Temperatur	38,9°C (37,7-39,7)	38,6°C (38-38,8)	38,3°C (38-38,5)
HF	100/min (72-160)	100/min (88-160)	89/min (72-92)
AF	34/min (24-64)	20/min (16-30)	18/min (12-42)
LPK	19,9 x10 <sup>9</sup> /L (4,9-39,9)	8,4 x10 <sup>9</sup> /L (7,1-13)	8,3 x10 <sup>9</sup> /L (7,5-13,9)
CRP	162 mg/L (42-291)	10 mg/L (<5-171)	5 mg/L (<5-11)

HF = hjärtfrekvens, AF = andningsfrekvens, LPK = leukocytpartikelkoncentration, CRP = C-reaktivt protein.

Vid användning av DeClue's (2017) referensintervall som SIRS-kriterier ändrades grupperna i studien avsevärt och kvar i SIRS+ gruppen blev endast 4 tikar, 6 tikar tillkom alltså till SIRS-gruppen. En statistisk analys av resultatet från ELISA med KC-antikropp utfördes ej med dessa ändrade kriterier då SIRS+ gruppen innehöll för få tikar.

### Analys av koncentration KC-like i blodprover

Alla blodprover från tikarna hade mätbara nivåer av KC-like och dessa värden tillsammans med resultat från statistiska tester presenteras nedan för de tre olika grupperna SIRS+, SIRS- och kontroll (Figur 6). Ett p-värde under 0,05 ansågs vara signifikant (\*). Kruskal-Wallis test visade en signifikant skillnad mellan alla tre grupper med ett p-värde på 0,039. Utöver det jämfördes även grupperna två och två mot varandra (SIRS+ mot SIRS-, SIRS+ mot kontroll, SIRS- mot kontroll) med Mann Whitney's test. Detta visade signifikant skillnad mellan SIRS+ och SIRS- samt mellan SIRS+ och kontroll med ett p-värde på 0,033 (\*) respektive 0,042 (\*). Mellan SIRS- och kontroll sågs ingen signifikant skillnad.



Figur 6. Boxplot över koncentration KC-like i blodprover i de tre grupperna samt signifikans (\*) vid Mann Whitney's test mellan grupperna SIRS+ mot SIRS- och SIRS+ mot kontroll.

Tillverkaren till ELISA-kittet uppgav en intra-assay precision med CV-värde på <10 %. Detta stämde för de prover som kördes i studien då CV-värden mellan duplikaten på mikrotiterplattan var 3,5 % i medel, varav de två högsta värdena låg på 9 %. Variationen när samma prov sätts i flera duplikat i en analys var alltså låg.

## DISKUSSION

Sepsis är ett svårdefinierat begrepp och diskussion pågår kring dess patogenes, diagnostik och behandling. Detta beror på att sepsis utvecklas genom ett mycket komplext samspel mellan värden och patogenen och alla de signalvägar och mediatorer som aktiveras och frisätts. I denna studie var målet att komma närmare att hitta en sensitiv och specifik biomarkör för att identifiera sepsis hos hund genom att analysera kemokinen KC-like vidare, som i tidigare studier visats ha potential som biomarkör (Floras *et al.*, 2014a; Karlsson *et al.*, 2016).

### Identifiering av KC-like hos hund

I ett första steg genomfördes en optimering av odlingsbetingelserna av *E. coli*-bakterierna och uttrycket av kemokinerna visade att den optimala temperaturen var 25°C och pH 8 (Figur 4). Dessa användes därför i de slutgiltiga analyserna med western blot. Vid odlingen av bakterierna och vid alla analyser sågs också att de bakteriekulturerna med CXCL7 växte sämre än kulturerna för de andra CXCL-kemokinerna. Det är därför intressant att tänka sig att CXCL7 kan ha någon typ av antibakteriell effekt så att den, när den uttrycks, avdödar *E. coli*-bakterierna som producerar den. Linge *et al.* (2008) har påvisat en sådan antibakteriell effekt hos CXCL7, men också för CXCL5 och effekten visades vara starkast för CXCL6. Att effekten i våra resultat endast visat sig för CXCL7 kan bero på att det i denna studie endast använts *E. coli* men i studien av Linge *et al.* (2008) studerades ett antal både Grampositiva och Gramnegativa bakterier. Effekten kan variera beroende på bakterie, precis som olika antibiotika är effektivt mot olika bakterier. Denna egenskap skulle vara intressant att studera vidare i framtida studier.

Resultaten från den först genomförda western blot analysen med KC-antikropp med icke-framrenade kemokiner visade att CXCL6 var den som antikroppen bundit till i störst mängd (Figur 4). När samma membran inkuberades med His-antikropp sågs istället CXCL6 vara den som fanns i minst mängd på membranet (Figur 4). Dessa fynd tillsammans innebär att trots att CXCL6 finns i mindre mängd än övriga kemokiner på membranet binder KC-antikroppen mest till denna CXCL-kemokin. Resultatet från Karlsson *et al.*'s (2016) gensekvensjämförelse visade att KC från mus visade störst likhet med CXCL7, och även CXCL8 och CXCL5. Utökade undersökningar av gensekvenserna för CXCL7 och CXCL6 har utförts och de sågs ha stora områden med identisk sekvens. När dessa två sedan jämfördes med KC sågs de tre kemokinerna ha flera områden med identisk sekvens. Någon av dessa överensstämmande sekvenser är troligt den struktur som KC-antikroppen binder till. Den höga sekvenslikheten tillsammans med resultatet från western blot analysen tyder på att CXCL6 kan motsvara det som benämns som KC-like, och alltså vara det protein som antikroppen riktad mot KC hos mus binder till.

Efter framreningen av kemokinerna utfördes samma western blot analys med KC-antikropp och His-antikropp, men då kunde inte samma resultat bekräftas (Figur 5). Mindre mängd protein i rätt storlek kunde ses på geler och membran med de framrenade kemokinerna och kraftigare band sågs istället med större respektive mindre storlek. De högre banden motsvarar troligt dimerer och trimerer av kemokinerna då dessa band motsvarar ungefär två respektive tre gånger kemokinernas storlek, vilka verkar kunna kännas igen av His-antikroppen men inte av KC-antikroppen. Att det bildas en stor mängd av dessa med det använda protokollet kan vara en nackdel eftersom det stör analysen. De lägre banden som inte förekom på den första western

blot analysen kan vara nedbrutna strukturer av kemokinerna som har kvar sin His-tag och därför känns igen av His-antikroppen men som inte har kvar de strukturer som KC-antikroppen binder till.

Steget med framreningen tar 1-2 dagar och vissa av proverna hade, när de sattes på gelerna, stått ett antal dagar utöver detta då det inte gick att utföra nya odlingar för varje analys. De prover som förvarats i kylan innan SDS-PAGE och western blot var framförallt CXCL6 och CXCL8, både icke-framrenade och framrenade prover som förvarats i ungefär en vecka i kylrum. De icke-framrenade proverna av resterande CXCL-kemokinerna förvarades också i kylrum under 3-4 dagar, då dessa prover sparades i kyl under framreningen av resterande celllysats. Förvaringen har troligt orsakat de uteblivna resultaten från den senare western blot analysen i studien för undersökning av interaktion med KC-antikroppen (Figur 5). *E. coli*-stammen som använts i studien saknar vissa kända proteaser som skulle kunna bryta ner kemokinerna, vilket borde minska risken men det kan dock inte garanteras att det inte finns några proteaser i bakterierna som kan ha brutit ner kemokinerna under förvaringen. Tidsfaktorn antas också vara viktig då det är känt att cytokiner är instabila och har en kort halveringstid (Zachary & McGavin, 2012). Detta är fysiologiskt då regleringen av immunsystemet måste ske mycket exakt och kemokiner som ligger kvar och är aktiva länge riskerar att exempelvis skapa ett för kraftigt inflammatoriskt påslag och försvåra styrningen mot nästa steg i förloppet för att åstadkomma läkning. Ytterligare fördjupning i cytokinernas instabilitet och laborationsprotokoll anpassade efter risken för nedbrytning krävs därför för att kunna bekräfta vilken kemokin KC-antikroppen från mus binder starkast hos hund.

### **KC-like som biomarkör för sepsis**

Resultatet från ELISA med antikropp mot mus-KC visade positiva resultat vad gäller KC-like som en biomarkör för sepsis hos hund då en signifikant högre koncentration kunde ses i gruppen SIRS+ jämfört med SIRS- och kontroll (Figur 6). En låg koncentration KC-like verkar dock inte kunna utesluta sepsis, baserat på resultaten från denna studie, men en hög koncentration bekräfta diagnosen. Skillnaden mellan grupperna var inte lika stor i denna studie som i den utförd i större skala av Karlsson *et al.* (2016), som också använde en annan analysmetod där ett flertal cytokiner analyserades samtidigt. För att bekräfta dessa resultat ytterligare skulle studier med större stickprov därför behövas. Andra skillnader som skulle kunna vara orsaken till något olika resultat är när i förloppet blodproven tas på hundarna. Detta då det kan vara så att KC-like frisätts i högre nivåer tidigt i förloppet vid sepsis, vilket resultatet från Floras *et al.* (2014a) tyder på där KC-like uppmättes i högre nivåer 1, 2 och 4 timmar efter LPS injektion hos hundar, men inte efter 24 timmar. Den stimulering av immunförsvaret som skedde hos hundarna efter LPS-injektion var dock mer kortvarig och kan ha varit otillräcklig för att starta det förlopp som sker vid bakteriell sepsis där levande bakterier fortsätter stimulera immunförsvaret.

Just tidsaspekten för frisättningen av olika inflammationsmediatorer påverkar dess användbarhet att identifiera individer med sepsis. En bra biomarkör för sepsis bör ge möjlighet till tidig diagnos, varför den bör frisättas snabbt och gå att uppmäta tidigt i sjukdomsförloppet. Samtidigt bör den ge information om tillståndets utveckling senare i tiden och alltså tala om hur stor risken är för högre mortalitet som vid sepsis eller dess efterstadium septisk chock. Blodproverna i studien togs vid olika tidpunkter i sjukdomsförloppet hos olika individer, men alltid



preoperativt. Detta eftersom hundarna kom in till smådjurskliniken vid UDS i olika faser av sjukdomen och därmed bör urvalet och resultatet av ELISA mot mus-KC spegla även olika tidpunkter i frisättningen.

### **Val av sepsiskriterier och referensintervall**

Det finns som nämnt ingen "gold standard" som enskilt test för sepsisdiagnostik hos hund idag. Valet av referensintervall för SIRS-kriterierna avgjorde därför istället hur tikarna delades in i de tre olika grupperna i studien och utgjorde det facit som KC-like ställdes emot. De valda sepsiskriterierna av Hauptman *et al.* (1997) är validerade varför dessa anses vara de bästa möjliga kriterierna att jämföra resultaten med. De valda kriterierna uppges ha en hög sensitivitet på 97 % men en specificitet på 64 %. Det innebär att användning av dessa kriterier ger en överdiagnostisering av sepsis, men fördelen är att de ger få falskt negativa individer (Hauptman *et al.*, 1997). De kan därför användas som screeningtest för individer som kommer in till kliniken som anses vara i riskzonen för att ha eller kan komma att utveckla sepsis.

CRP är en ospecifik inflammatorisk biomarkör som korrelerar med klinikvistelse och är ett bra mått på återhämtning (Fransson *et al.*, 2004; Dabrowski *et al.*, 2009), vilket gör den användbar som mått på sjuklighet. I presentationen av kliniska data för hundarna i studien (Tabell 4) ses också att sjukligheten varierar mellan grupperna. Tikarna i SIRS+ har i median ett tydligt högre CRP-värde än SIRS- och kontroller, median 167 mg/L jämfört med 10 respektive 5 mg/L, vilket visar att tikar klassificerade som SIRS+ enligt kriterierna av Hauptman *et al.* (1997) hade en kraftig systemisk inflammation (Tabell 4).

Vad hade då hänt med resultaten vid ändrade referensintervall? Enligt en studie av Klouwenberg *et al.* (2012) sågs en stor skillnad i SIRS-incidens, från 99 % incidens till 49 %, vid ändring av kriterierna för människa mellan de mest restriktiva till de mest generösa. DeClue (2017) föreslår ett snävare referensintervall för sepsiskriterierna till hund och detta bör resultera i färre hundar diagnostiserade med sepsis. I kliniken skulle valet av ett snävare referensintervall kunna uppmärksamma individer med allvarligare sjukdom bättre, men det ökar dock risken att missa individer som är på väg att utveckla sepsis. Vid användning av till exempel DeClue's (2017) referensintervall bör nya bedömningar göras oftare på individer som är i riskzonen att utveckla sepsis. För att se hur ändring av kriterierna skulle påverka grupperna i denna studie testades dessa snävare referensintervall vid gruppindelningen. Detta visade också att stora förändringar skedde och endast fyra tikar blev kvar i gruppen för SIRS+, vilket stämmer med resultaten av Klouwenberg *et al.* (2012). Något som skulle kunna påverka resultatet kring hur väl KC-like kan identifiera hundar med sepsis. Då endast få hundar blev kvar i SIRS+ gruppen i denna studie har dock inte detta studerats vidare.

Ändring av alla parametrar i kriterierna, som vid byte från Hauptman *et al.*'s (1997) till DeClue (2017) kan vara drastiskt, men att titta på vilka parametrar som genom ändring kan ge en högre specificitet utan att ge avkall på sensitiviteten vore intressant. Det använda referensintervallet för andningsfrekvens (>20 andetag/min) ligger exempelvis inom normalintervallet för hundar (<30 andetag/min) och kan påverkas av både stress och smärta, vilket kan utlösas av många olika stimuli. En hund som på grund av stress har en förhöjd hjärtfrekvens och andningsfrekvens kan därför räknas som SIRS-positiv. Andningsfrekvens kunde heller inte ses skilja

mellan septiska och icke-septiska hundar (Hauptman *et al.*, 1997). En ökning av referensintervallet till <40 andetag/min, enligt DeClue (2017), skulle kunna resultera i en högre specificitet för sepsis. I den kliniska situationen kan dock det bredare referensintervallet vara användbart då risken minskar att missa individer som är på väg att utveckla sepsis, men som ännu inte visar alla tecken. En förändring av antal parametrar som ska vara utanför referensvärdena från två till tre skulle också kunna vara ett sätt att utveckla kriterierna.

Istället för att förändra de befintliga SIRS-kriterierna är ett alternativ att använda sig utav det nyare SOFA-systemet (Ripanti *et al.*, 2012). Systemet används ännu inte i så stor omfattning vid sepsismisstanke hos hund, men värden för njur- och leverfunktionsparametrar, blodtryck, koagulation och medvetandegrad analyseras ofta hos hundar inlagda på intensivvårdsavdelningar för bedömning av allvarlighetsgraden av sjukdom. Mer omfattande utvärdering av bland annat sensitivitet och specificitet för SOFA-systemet vid sepsis hos hund behövs dock för att eventuellt kunna ersätta SIRS-kriterierna.

### **Begränsningar och framtida studier av KC-like**

Målet är att en biomarkör för sepsis ska kunna urskilja individer med sepsis ur en grupp med SIRS, alltså kunna urskilja de med infektiös etiologi. CXCL-kemokiner har en specifik roll i svaret mot bakteriell infektion genom sina neutrofilattraherande egenskaper och är därför intressanta vid just sepsis. Resultatet från denna studie bygger på individer med en infektiös orsak till sjukdomen, pyometra, och jämför inte icke-infektiösa orsaker till utvecklandet av SIRS. Detta bör studeras vidare för KC-like för att se om den som biomarkör är specifik för just sepsis och inte SIRS av icke-infektiös etiologi.

De olika resultaten som presenterats från studierna som analyserat IL-6 hos hund kan ha att göra med skillnaden i etiologin till sepsis hos hundarna i studierna. Rau *et al.* (2007) har i sin studie hundar med många olika typer av infektioner, varav ett fåtal är pyometra, medan både Fransson *et al.* (2007) och Karlsson *et al.* (2016) har studerat sepsis med tikar med pyometra som modell. En modell som även använts i denna studie och nämnda studier på KC-like. Karlsson *et al.* (2015) har visat att KC-like och flera andra CXCL-kemokiner kan uppmätas i ökad koncentration efter LPS-stimulering av stromala endotelceller i livmodern. Det skulle kunna vara så att det sker en lokal frisättning av KC-like från cellerna i livmodern och att det därför förekommer i högre nivå när infektionen härrör från denna. Andra kemokiner och exempelvis IL-6 skulle då kunna förekomma i högre nivåer vid bakteriell infektion med annan lokalisering. Fler och större studier behövs dock för att säkert kunna uttala sig om andra etiologier och användbarheten av både IL-6 och KC-like i sepsisdiagnostiken hos hund.

Hur och i vilket sjukdomsstadium olika proteiner frisätts är som nämnt tidigare en viktig faktor för dess värde som biomarkör. Att hitta en enda biomarkör som korrekt kan identifiera hundar i olika stadier av sepsis, och med olika etiologier, har visats vara svårt. Ljungström *et al.* (2017) såg att en kombination av olika biomarkörer kunde förbättra diagnostiken för bakteriell sepsis hos människa. En panel av både pro- och antiinflammatoriska biomarkörer, som frisätts vid olika tidpunkter, i kombination med en utvecklad typ av SIRS-kriterier eller det nya SOFA-systemet, skulle därför kunna öka chanserna att inte bara identifiera sepsis, utan också i vilken

fas av sepsis hunden är. I framtiden skulle det ge möjlighet att vägleda rätt val av behandling och därigenom minska mortaliteten.

### **Konklusion**

Utifrån denna studie kan ingen av kemokinerna inkluderade säkert sägas vara den som KC-antikroppen binder till, dock verkar CXCL6 kunna vara en trolig kandidat. Vidare utvärdering av detta kräver ett mer robust protokoll som minskar risken för nedbrytning av kemokinerna under framreningen. Trots att strukturen som KC-antikroppen binder till i blodproverna från hundarna i studien ännu inte är känd visar resultaten från ELISA att denna har potential att identifiera hundar med pyometra och SIRS. KC-like hos hund bör därför undersökas vidare i större studier för att ta reda på om den i framtiden kan fungera som biomarkör för sepsis hos hund.

## REFERENSER

- Annane, D., Aegerter, P., Jars-Guincestre, M. C., Guidet, B. & CUB-Réa Network (2003). Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168(2), pp 165–172.
- Assicot, M., Gendrel, D., Carsin, H., Raymond, J., Guilbaud, J. & Bohuon, C. (1993). High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*, 341(8844), pp 515–518.
- Becker, K. L., Snider, R. & Nylén, E. S. (2008). Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Critical Care Medicine*, 36(3), pp 941–952.
- Bianchi, M. E., Crippa, M. P., Manfredi, A. A., Mezzapelle, R., Rovere Querini, P. & Venereau, E. (2017). High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair. *Immunological Reviews*, 280(1), pp 74–82.
- Biffi, W. L., Moore, E. E., Moore, F. A. & Peterson, V. M. (1996). Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Annals of Surgery*, 224(5), pp 647–664.
- Bigliardi, E., Parmigiani, E., Cavirani, S., Luppi, A., Bonati, L. & Corradi, A. (2004). Ultrasonography and cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 39(3), pp 136–140.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101(6), pp 1644–1655.
- Bonelli, F., Meucci, V., Divers, T. J., Jose-Cunilleras, E., Corazza, M., Tognetti, R., Guidi, G., Intorre, L. & Sgorbini, M. (2015). Plasma procalcitonin concentration in healthy horses and horses affected by systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(6), pp 1689–1691.
- Churpek, M. M., Zdravcevic, F. J., Winslow, C., Howell, M. D. & Edelson, D. P. (2015). Incidence and prognostic value of the systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunctions in ward patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192(8), pp 958–964.
- Conti-Patara, A., de Araújo Caldeira, J., de Mattos-Junior, E., de Carvalho, H. da S., Reinoldes, A., Pedron, B. G., Patara, M., Francisco Talib, M. S., Faustino, M., de Oliveira, C. M. & Cortopassi, S. R. G. (2012). Changes in tissue perfusion parameters in dogs with severe sepsis/septic shock in response to goal-directed hemodynamic optimization at admission to ICU and the relation to outcome. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 22(4), pp 409–418.
- Dabrowski, R., Kostro, K., Lisiecka, U., Szczubiał, M. & Krakowski, L. (2009). Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. *Theriogenology*, 72(4), pp 471–476.
- Damas, P., Ledoux, D., Nys, M., Vrindts, Y., De Groote, D., Franchimont, P. & Lamy, M. (1992). Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Annals of Surgery*, 215(4), pp 356–362.
- DeClue, A. E. (2017). Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. I: Ettinger, S. J., Feldman, E. C., & Côté, E. (red) *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and the Cat*. Eighth edition, pp 554–560. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- DeClue, A. E., Sharp, C. R. & Harmon, M. (2012). Plasma inflammatory mediator concentrations at ICU admission in dogs with naturally developing sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(3), pp 624–630.

- Deutschman, C. S. & Tracey, K. J. (2014). Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity*, 40(4), pp 463–475.
- Donnelly, J. P., Safford, M. M., Shapiro, N. I., Baddley, J. W. & Wang, H. E. (2017). Application of the Third International Consensus Definitions for Sepsis (Sepsis-3) Classification: a retrospective population-based cohort study. *The Lancet. Infectious Diseases*, 17(6), pp 661–670.
- Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett, B. N., Hedhammar, A., Olson, P. & Lagerstedt, A. S. (2001). Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(6), pp 530–538.
- Enginler, S. O., Ateş, A., Diren Sığırcı, B., Sontaş, B. H., Sönmez, K., Karaçam, E., Ekici, H., Evkuran Dal, G. & Gürel, A. (2014). Measurement of C-reactive protein and prostaglandin F2 $\alpha$  metabolite concentrations in differentiation of canine pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 49(4), pp 641–647.
- Fan, S.-L., Miller, N. S., Lee, J. & Remick, D. G. (2016). Diagnosing sepsis - The role of laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 460, pp 203–210.
- Floras, A. N. K., Holowaychuk, M. K., Bienzle, D., Bersenas, A. M. E., Sharif, S., Harvey, T., Nordone, S. K. & Wood, G. A. (2014a). N-terminal pro-C-natriuretic peptide and cytokine kinetics in dogs with endotoxemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(5), pp 1447–1453.
- Floras, A. N. K., Holowaychuk, M. K., Hodgins, D. C., Marr, H. S., Birkenheuer, A., Sharif, S., Bersenas, A. M. E. & Bienzle, D. (2014b). Investigation of a commercial ELISA for the detection of canine procalcitonin. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(2), pp 599–602.
- Fransson, B. A., Karlstam, E., Bergstrom, A., Lagerstedt, A.-S., Park, J. S., Evans, M. A. & Ragle, C. A. (2004). C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(5), pp 391–399.
- Fransson, B. A., Lagerstedt, A.-S., Bergstrom, A., Hagman, R., Park, J. S., Chew, B. P., Evans, M. A. & Ragle, C. A. (2007). C-reactive protein, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 17(4), pp 373–381.
- Gäini, S., Pedersen, S. S., Koldkjaer, O. G., Pedersen, C. & Møller, H. J. (2007). High mobility group box-1 protein in patients with suspected community-acquired infections and sepsis: a prospective study. *Critical Care*, 11(2), p R32.
- Gattas, D. J. & Cook, D. J. (2003). Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis: health technology assessment in the ICU. *Journal of Critical Care*, 18(1), pp 52–58.
- Hack, C. E., Hart, M., van Schijndel, R. J., Eerenberg, A. J., Nuijens, J. H., Thijs, L. G. & Aarden, L. A. (1992). Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infection and Immunity*, 60(7), pp 2835–2842.
- Harbarth, S., Holeckova, K., Froidevaux, C., Pittet, D., Ricou, B., Grau, G. E., Vadas, L., Pugin, J. & Geneva Sepsis Network (2001). Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(3), pp 396–402.
- Hauptman, J. G., Walshaw, R. & Olivier, N. B. (1997). Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Veterinary Surgery: VS*, 26(5), pp 393–397.
- Hirao, Y., Kanda, T., Aso, Y., Mitsuhashi, M. & Kobayashi, I. (2000). Interleukin-8 - An early marker for bacterial infection. *Laboratory Medicine*, 31(1), pp 39–44.
- Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 13(12), pp 862–874.

- Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Freeman, B. D., Tinsley, K. W., Cobb, J. P., Matuschak, G. M., Buchman, T. G. & Karl, I. E. (1999). Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Critical Care Medicine*, 27(7), pp 1230–1251.
- Jitpean, S., Hagman, R., Ström Holst, B., Höglund, O. V., Pettersson, A. & Egenvall, A. (2012). Breed variations in the incidence of pyometra and mammary tumours in Swedish dogs. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 6, pp 347–350.
- Jitpean, S., Holst, B. S., Höglund, O. V., Pettersson, A., Olsson, U., Strage, E., Södersten, F. & Hagman, R. (2014a). Serum insulin-like growth factor-I, iron, C-reactive protein, and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra. *Theriogenology*, 82(1), pp 43–48.
- Jitpean, S., Ström-Holst, B., Emanuelson, U., Höglund, O. V., Pettersson, A., Alneryd-Bull, C. & Hagman, R. (2014b). Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. *BMC Veterinary Research*, 10, p 6.
- Karlsson, I., Hagman, R., Guo, Y., Humblot, P., Wang, L. & Wernersson, S. (2015). Pathogenic *Escherichia coli* and lipopolysaccharide enhance the expression of IL-8, CXCL5, and CXCL10 in canine endometrial stromal cells. *Theriogenology*, 84(1), pp 34–42.
- Karlsson, I., Hagman, R., Johannisson, A., Wang, L., Södersten, F. & Wernersson, S. (2016). Multiplex cytokine analyses in dogs with pyometra suggest involvement of KC-like chemokine in canine bacterial sepsis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 170, pp 41–46.
- Karlsson, I., Wernersson, S., Ambrosen, A., Kindahl, H., Södersten, F., Wang, L. & Hagman, R. (2013). Increased concentrations of C-reactive protein but not high-mobility group box 1 in dogs with naturally occurring sepsis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 156(1–2), pp 64–72.
- Karlsson, S., Pettilä, V., Tenhunen, J., Laru-Sompa, R., Hynninen, M. & Ruokonen, E. (2008). HMGB1 as a predictor of organ dysfunction and outcome in patients with severe sepsis. *Intensive Care Medicine*, 34(6), pp 1046–1053.
- Klein Klouwenberg, P. M. C., Ong, D. S. Y., Bonten, M. J. M. & Cremer, O. L. (2012). Classification of sepsis, severe sepsis and septic shock: the impact of minor variations in data capture and definition of SIRS criteria. *Intensive Care Medicine*, 38(5), pp 811–819.
- Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S. M., Vincent, J.-L., Ramsay, G. & International Sepsis Definitions Conference (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine*, 29(4), pp 530–538.
- Linge, H. M., Collin, M., Nordenfelt, P., Mörgelin, M., Malmsten, M. & Egesten, A. (2008). The human CXC chemokine granulocyte chemotactic protein 2 (GCP-2)/CXCL6 possesses membrane-disrupting properties and is antibacterial. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), pp 2599–2607.
- Ljungström, L., Pernestig, A.-K., Jacobsson, G., Andersson, R., Usener, B. & Tilevik, D. (2017). Diagnostic accuracy of procalcitonin, neutrophil-lymphocyte count ratio, C-reactive protein, and lactate in patients with suspected bacterial sepsis. *PloS One*, 12(7), p e0181704.
- Nelson, R. W. & Couto, C. G. (2013). *Small Animal Internal Medicine*. Fifth edition. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Nelson, R. W. & Feldman, E. C. (1986). Pyometra. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 16(3), pp 561–576.

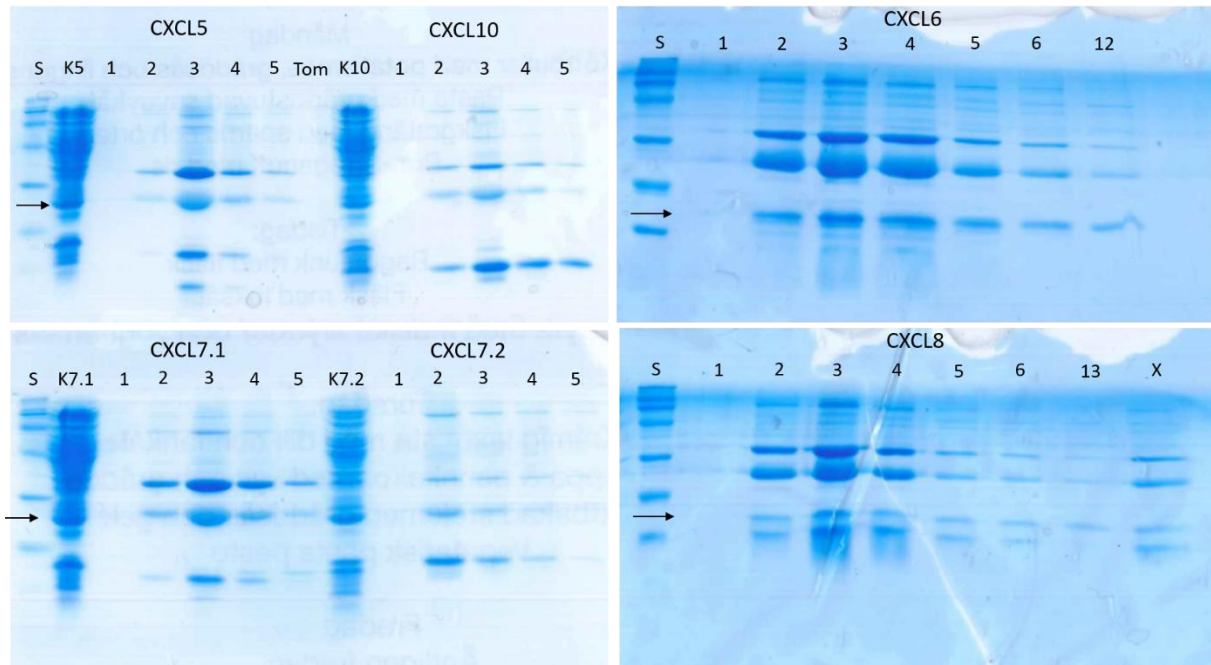
- Oda, S., Hirasawa, H., Shiga, H., Nakanishi, K., Matsuda, K. & Nakamura, M. (2005). Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine*, 29(4), pp 169–175.
- Okano, S., Yoshida, M., Fukushima, U., Higuchi, S., Takase, K. & Hagio, M. (2002). Usefulness of systemic inflammatory response syndrome criteria as an index for prognosis judgement. *The Veterinary Record*, 150(8), pp 245–246.
- Pierrakos, C. & Vincent, J.-L. (2010). Sepsis biomarkers: a review. *Critical Care*, 14(1), p R15.
- Póvoa, P., Almeida, E., Moreira, P., Fernandes, A., Mealha, R., Aragão, A. & Sabino, H. (1998). C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Medicine*, 24(10), pp 1052–1056.
- Proost, P., De Wolf-Peeters, C., Conings, R., Opdenakker, G., Billiau, A. & Van Damme, J. (1993a). Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumor cells. In vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO, IP-10, and IL-8. *Journal of Immunology*, 150(3), pp 1000–1010.
- Proost, P., Wuyts, A., Conings, R., Lenaerts, J. P., Billiau, A., Opdenakker, G. & Van Damme, J. (1993b). Human and bovine granulocyte chemotactic protein-2: complete amino acid sequence and functional characterization as chemokines. *Biochemistry*, 32(38), pp 10170–10177.
- Proost, P., Wuyts, A. & van Damme, J. (1996). The role of chemokines in inflammation. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, 26(4), pp 211–223.
- Rau, S., Kohn, B., Richter, C., Fenske, N., Küchenhoff, H., Hartmann, K., Härtle, S., Kaspers, B. & Hirschberger, J. (2007). Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(3), pp 253–260.
- Ripanti, D., Dino, G., Piovano, G. & Farca, A. (2012). Application of the Sequential Organ Failure Assessment Score to predict outcome in critically ill dogs: preliminary results. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 154(8), pp 325–330.
- Ros, L., Holst, B. S. & Hagman, R. (2014). A retrospective study of bitches with pyometra, medically treated with aglepristone. *Theriogenology*, 82(9), pp 1281–1286.
- Seymour, C. W., Liu, V. X., Iwashyna, T. J., Brunkhorst, F. M., Rea, T. D., Scherag, A., Rubenfeld, G., Kahn, J. M., Shankar-Hari, M., Singer, M., Deutschman, C. S., Escobar, G. J. & Angus, D. C. (2016). Assessment of clinical criteria for sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), pp 762–774.
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J.-L. & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), pp 801–810.
- Smith, F. O. (2006). Canine pyometra. *Theriogenology*, 66(3), pp 610–612.
- Teasdale, G. & Jennett, B. (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*, 2(7872), pp 81–84.
- Tizard, I. R. (2013). *Veterinary immunology*. Ninth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Van Snick, J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annual Review of Immunology*, 8, pp 253–278.
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K. R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P. E., Abumrad, N. N., Sama, A. & Tracey, K. J. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 285(5425), pp 248–251.

- Williams, J. M., Greenslade, J. H., McKenzie, J. V., Chu, K., Brown, A. F. T. & Lipman, J. (2017). Systemic inflammatory response syndrome, quick sequential organ function assessment, and organ dysfunction: Insights from a prospective database of ED patients with infection. *Chest*, 151(3), pp 586–596.
- Wuyts, A., Haelens, A., Proost, P., Lenaerts, J. P., Conings, R., Opdenakker, G. & Van Damme, J. (1996). Identification of mouse granulocyte chemotactic protein-2 from fibroblasts and epithelial cells. Functional comparison with natural KC and macrophage inflammatory protein-2. *Journal of Immunology*, 157(4), pp 1736–1743.
- Wuyts, A., Van Osselaer, N., Haelens, A., Samson, I., Herdewijn, P., Ben-Baruch, A., Oppenheim, J. J., Proost, P. & Van Damme, J. (1997). Characterization of synthetic human granulocyte chemotactic protein 2: Usage of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and in vivo inflammatory properties. *Biochemistry*, 36(9), pp 2716–2723.
- Yang, H., Rivera, Z., Jube, S., Nasu, M., Bertino, P., Goparaju, C., Franzoso, G., Lotze, M. T., Krausz, T., Pass, H. I., Bianchi, M. E. & Carbone, M. (2010). Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28), pp 12611–12616.
- Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E. A., Appella, E., Oppenheim, J. J. & Leonard, E. J. (1987). Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(24), pp 9233–9237.
- Yu, D.-H., Nho, D.-H., Song, R.-H., Kim, S.-H., Lee, M.-J., Nemzek, J. A. & Park, J. (2010). High-mobility group box 1 as a surrogate prognostic marker in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(3), pp 298–302.
- Zachary, J. F. & McGavin, M. D. (2012). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Fifth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby.



## APPENDIX 1: SDS-PAGE AV FRAMRENADE KEMOKINER

Resultatet från SDS-PAGE av utvalda framrenade fraktioner av alla kemokinerna kan ses nedan (Figur 7).



Figur 7. SDS-PAGE på framrenade fraktioner av CXCL-kemokinerna, utfört på fyra olika geler. Proverna sattes enligt följande på gelerna; S, proteinstege; K5, kontroll CXCL5; 1-6 samt 12-13, fraktion 1-6 samt 12-13 av framrenade CXCL; K10, kontroll CXCL10; K7.1, kontroll av CXCL7.1; K7.2, kontroll av CXCL7.2; X, okänd fraktion av CXCL8 då den fallit vid sidan under uppsamlingen. Svart pil markerar ungefär 10 kDa.