

## Validación analítica de técnicas comerciales para la determinación de haptoglobina, proteína C reactiva y amiloide A sérico en caninos

Analytical validation of commercial assays for the determination of haptoglobin, C-reactive protein and serum amyloid A in dogs

S Martínez-Subiela<sup>1,\*</sup>, J J Cerón<sup>1</sup>.

### SUMMARY

All laboratory tests must be validated before being introduced for patient testing. The objective of this work was to perform the analytical validation of three commercial assays that are being used at our laboratory for the determination of haptoglobin (Hp), C reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA) in canine samples with low and high concentrations of these acute phase proteins (APPs). The parameters evaluated for the validation of the methods were: (1) Precision, assessed by determination of the within and between-run coefficients of variation (CVs). (2) Inaccuracy, evaluated indirectly by investigating linearity under dilution. (3) Limit of detection, determined as the lowest concentration of the APPs which could be distinguished from a zero sample.

All within-run CVs were lower than 10%, however between-run CVs were lower than 10% only for Hp. Dilution of a serum sample with high concentrations of the different APPs resulted in a linear regression equation with correlation coefficient  $R^2 > 0.98$  in all cases; so all methods showed a good accuracy. The detection limit of each assay was 0.02 g/L for Hp, 0.15 mg/L for CRP and 0.79 mg/L for SAA. Additionally they differentiate animals with inflammatory or infectious diseases from healthy subjects. Overall results of validation showed that the assays tested can be suitable for the routine measurement of APPs in canine samples, although it would be desirable to reduce the between run imprecision found for CRP and SAA assays.

*Palabras clave:* validación, haptoglobina, proteína C reactiva, amiloide A sérico, perro.

*Key words:* validation, haptoglobin, C reactive protein, serum amyloid A, dog.

### INTRODUCCION

Para poder utilizar adecuadamente un análisis laboratorial e interpretar los resultados obtenidos de forma correcta, es necesario que las técnicas sean validadas antes de ser empleadas de forma rutinaria en un laboratorio (Lumsden 2000). De esta forma, podrá asegurarse que los valores obtenidos cumplen los requerimientos clínicos que se pretenden con una esperada fiabilidad.

Las proteínas de fase aguda (PFAs) se producen en respuesta a una variedad de condiciones patológicas tales como infección, inflamación o trauma y han demostrado tener una importante aplicación práctica en el diagnóstico, pronóstico y monitorización de tratamientos de numerosos procesos patológicos que afectan a distintas especies (Martínez-Subiela y col 2001). En la especie canina serán de gran utilidad para evaluar el estado de salud de los animales, habiéndose afirmado incluso que en el futuro las PFAs serán incluidas como un parámetro de rutina en los perfiles bioquímicos que se realicen a los animales (Eckersall 2004).

Las investigaciones realizadas en el campo de las PFAs han llevado al desarrollo de diferentes métodos de análisis

e incluso de kits comerciales. Así, en la actualidad, se dispone de kits comerciales para la determinación de la haptoglobina, proteína C reactiva y amiloide A sérico en muestras de la especie canina.

El objetivo del presente trabajo fue el validar tres técnicas para determinar estas PFAs en el laboratorio de Patología Clínica del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia para evaluar el grado de error esperado debido a la inexactitud e imprecisión y la capacidad de discriminación entre animales sanos y con diversas patologías.

### MATERIAL Y METODOS

#### ANALISIS DE PROTEINAS DE FASE AGUDA

*Haptoglobina (Hp).* Para la determinación de esta proteína se utilizó el kit comercial Phase Haptoglobin® (Tri-delta Development Limited, Ireland), realizando las determinaciones por duplicado en el autoanalizador de bioquímica Cobas Mira Plus (ABX diagnostic Montpelier, Francia).

Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la determinación de la actividad peroxidasa de los complejos haptoglobina-hemoglobina a pH ácido que fue desarrollado por Eckersall y col (1999). Los procedimientos analíticos realizados por el autoanalizador pueden resumirse de la

Aceptado: 30.11.04.

<sup>1\*</sup> Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Espinardo, Murcia, España.

siguiente forma: a) Inicialmente 2,5 µl de muestra o estándar se mezclan con 200 µl de la solución de trabajo (hemoglobina estabilizada mezclada en igual proporción con el diluyente proporcionado por el kit). b) Después de 25 segundos se añaden 90 µl de cromógeno (SB7) c) 25 segundos más tarde se añaden 50 µl de sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

El incremento en absorbancia que se produce durante los 50 segundos posteriores a la adición del sustrato es medido a 600 nm y usado para calcular la curva de calibración que permitirá determinar la concentración de haptoglobina en muestras de concentración desconocida. Las muestras que sobrepasaron la absorbancia del estándar fueron diluidas 1:5, con el diluyente proporcionado en el kit.

*Proteína C reactiva (CRP).* La concentración de esta proteína se determinó con el kit comercial Tridelta Phase™ range canine CRP kit (Tridelta Development Limited, Irlanda).

El análisis es un inmunoensayo de tipo “sandwich”. Los pasos básicos para la realización del análisis fueron los siguientes: a) Las *muestras* se diluyeron 1:500 con un diluyente especial, y luego se añadieron a micropocillos recubiertos previamente con anticuerpos anti-CRP canina y se incuban durante 15 minutos a 37° C. b) Después de lavar, para eliminar el material que no se ha unido, se añadió el *conjugado* formado por anticuerpos anti-CRP-canina marcados con HRP (horse radish peroxidase) y se volvió a incubar durante 15 minutos a 37° C. De esta forma el anticuerpo inmovilizado fijó de forma específica la CRP presente en el pocillo. c) Después de un nuevo lavado se añadió *tetrame tilbencidina* y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Este reactivo es un cromógeno con actividad peroxidasa que permite cuantificar la cantidad de CRP presente en las muestras. d) Finalmente se añadió una *solución* para detener la reacción y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector Victor 1420 Multilabel Counter.

*Amiloide A Sérico (SAA).* La concentración de esta proteína fue determinada mediante el kit comercial Tridelta Phase Range Serum Amyloid A Assay (Tridelta Development Limited, Irlanda). El kit es un ELISA de tipo “sandwich” que contiene tiras de microtitulación previamente recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos para el amiloide A sérico. Los pasos a seguir para realizar el análisis fueron los siguientes: a) Las *muestras* diluidas 1:500 con el diluyente especial se añadieron a los pocillos conjuntamente con *anticuerpos anti-SAA biotinilados* y se dejaron incubar durante 1 hora a 37° C. Cualquier molécula de amiloide presente es capturada en la placa por el anticuerpo previamente inmovilizado y marcada a su vez con el anticuerpo conjugado en un único procedimiento. b) Después de lavar, para eliminar todo el material que no se ha unido, se añadió un *conjugado* que contiene Streptavidin-Horse Radish Peroxidasa. c) Tras

un periodo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente se volvió a lavar y se añadió *tetrametilbencidina* (TMB), dejándolo incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. d) Después se añadió la solución para detener la reacción. La intensidad de color producida, proporcional a la concentración de amiloide A sérico presente en el espécimen original, fue medida a 450 nm en un lector Victor 1420 Multilabel Counter (Pelkin Elmer Lifesciences, Wallac, Turku, Finland).

#### VALIDACION ANALITICA

*Muestras empleadas.* Se emplearon las muestras que se detallan a continuación:

- Muestras con valores bajos de proteínas de fase aguda. Estas muestras se obtuvieron a partir de animales que, tras someterse a un examen físico y perfil analítico completo, fueron considerados clínicamente sanos.
- Muestras con valores altos de proteínas de fase aguda. Estas muestras se obtuvieron a partir de animales con piómetra. El diagnóstico se estableció en estos mediante los métodos habitualmente empleados en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia (examen físico, perfil analítico completo, radiografía y ecografía).

*Características analíticas.* La precisión intradeterminación de los análisis de haptoglobina, proteína C reactiva y amiloide A sérico se calculó analizando, por los métodos anteriormente descritos, tres muestras con valores bajos de proteínas de fase aguda y tres muestras con valores altos, cinco veces cada una en una sola serie analítica.

Para establecer la precisión interdeterminación se analizaron tres muestras de valor bajo y tres muestras de valor alto en cinco días diferentes en un intervalo de 15 días.

La exactitud de los métodos se comprobó mediante el método de evaluación de linealidad bajo dilución. Para ello se diluyó de forma seriada una muestra que presentaba una elevada concentración de proteínas de fase aguda. Las diferentes diluciones se analizaron con cada uno de los métodos descritos y mediante análisis de regresión se comprobó la capacidad del método para determinar de forma lineal y proporcional la cantidad de cada proteína de fase aguda presente en cada una de las diluciones.

El límite de detección fue determinado como la mínima concentración de cada una de las proteínas de fase aguda evaluadas que puede distinguirse de una muestra de valor cero.

#### VALIDACION CLINICA

Para realizar la validación clínica se extrajeron muestras de animales sanos y con diferentes procesos patológicos, clasificándose en grupos de la siguiente forma:

- Grupo 1, formado por seis perros que, tras someterse a un examen físico y analítico completo, fueron considerados clínicamente sanos.
- Grupo 2, formado por 10 perros infectados de forma natural por *Leishmania infantum*. Dichos animales provenían de casos clínicos recibidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia y presentaban signos clínicos compatibles con la enfermedad. El diagnóstico fue confirmado mediante la detección de anticuerpos frente a *L. infantum* utilizando un sistema ELISA (Ingezim Leishmania; Ingenasa, Madrid, España) y considerando como positivos aquellos animales cuyo título era igual o superior a 1/100.
- Grupo 3, formado por 10 animales con piómetra. El diagnóstico se estableció en estos mediante los métodos habitualmente empleados en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia (examen físico, perfil analítico completo, radiografía y ecografía).

#### ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico se realizó empleando los programas informáticos Excell 2000 y SPSS v. 10.

La precisión intradeterminación y la interdeterminación se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$CV (\%) = \frac{\text{Desviación Estándar}}{\text{Media}} \times 100$$

La linealidad bajo dilución se comprobó mediante análisis de regresión lineal. El límite de detección se calculó como la media + 2 desviaciones estándar de 10 réplicas del diluyente de muestra empleado en el análisis (Eckersall y col 2001).

Los resultados obtenidos en la prueba de validación clínica para los diferentes grupos fueron comparados mediante el test de Mann-Witney, considerándose significativas las diferencias cuando  $P < 0,05$ .

#### RESULTADOS Y DISCUSION

*Características analíticas.* En el cuadro 1 se muestran las medias, desviaciones estándar y los coeficientes de variación intra e interdeterminación obtenidos en la prueba de precisión para cada uno de los métodos evaluados. Los resultados obtenidos para el ensayo de Hp mostraron que el método presenta una buena precisión tanto intradeterminación como interdeterminación, ya que en ambos casos los coeficientes de variación fueron inferiores al 10%. Dichos coeficientes se asemejan a los obtenidos por Eckersall y col (1999) en sus estudios de validación del método.

En el caso de la CRP los resultados mostraron que el análisis presenta una buena precisión intradeterminación, con coeficientes de variación inferiores a los obtenidos por Kjelgaard-Hansen y col (2003) de 6,9-10,1%. Sin embargo, los coeficientes de variación interdeterminación resultaron elevados (23,9-28,4%), siendo dichos coeficientes similares a los mostrados por Kjelgaard-Hansen y col (2003) (26,2-29%). Estudios posteriores realizados en nuestro laboratorio han mostrado que el empleo de una muestra de suero con concentración conocida de CRP como estándar, en lugar del estándar proporcionado en el ensayo comercial, produce un descenso a 12,3-13,6% en los coeficientes de variación interdeterminación. La causa de este descenso podría estar relacionada con una mayor estabilidad de la proteína en el suero que diluida en los tampones comerciales, o por el uso de factores de dilución similares en muestras y estándar cuando se emplea una muestra de

**Cuadro 1.** Precisión intra e interdeterminación obtenida para los análisis de haptoglobina (Hp), proteína C reactiva (CRP) y amiloide A sérico (SAA) en muestras de sueros de caninos con concentraciones bajas y altas de proteínas de fase aguda (PFAs).

Within-run and between-run precision obtained for haptoglobin (Hp), C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A assays (SAA) in serum samples of dogs with high and low serum concentrations of acute phase protein (APPs).

PFAs	Muestras	Intradeterminación			Interdeterminación		
		X	DE	CV (%)	X	DE	CV (%)
Hp (g/L)	Bajas	0,86	0,01	1,16	0,87	0,04	4,59
	Altas	8,70	0,05	0,57	8,75	0,2	2,28
CRP (mg/L)	Bajas	4,60	0,28	6,08	3,68	0,88	23,9
	Altas	43,21	2,45	5,66	55,25	14,74	28,4
SAA (mg/L)	Bajas	3,95	0,19	4,81	4,89	0,80	16,3
	Altas	43,87	4,07	9,27	35,8	5,97	16,6

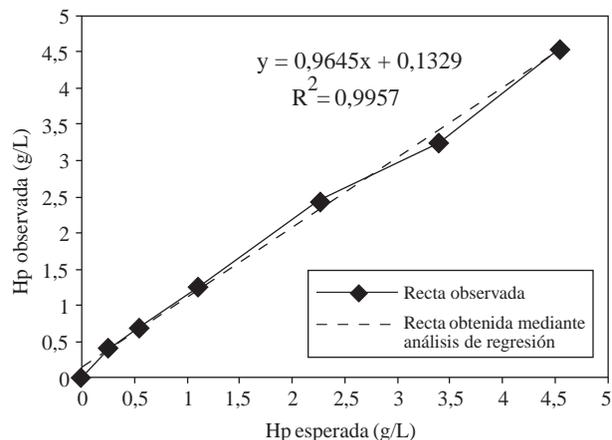
X: media. DE: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

suero en lugar del estándar comercial (Cerón y col 2003). En base a estos resultados se recomendaría el empleo de estándares producidos a partir de suero sin ningún tampón de dilución en caso de desarrollarse nuevos métodos para determinación de esta proteína.

El método empleado para la determinación del SAA mostró una buena precisión intradeterminación, con coeficientes de variación inferiores al 10%. Sin embargo, los coeficientes interdeterminación fueron elevados (16,3-16,6%) y se asemejaron a los obtenidos por Eckersall y col (2001) en sus estudios de validación del análisis en muestras de suero de la especie bovina, siendo inferiores a los obtenidos para muestras de la especie porcina y bovina en estudios realizados entre diferentes laboratorios (Eckersall 2003).

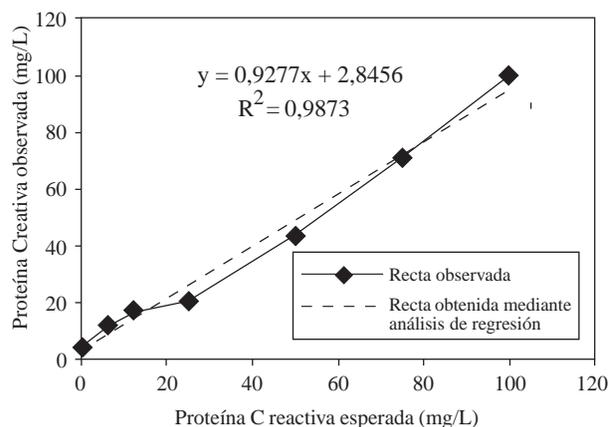
Los resultados de precisión interdeterminación obtenidos para los análisis de CRP y SAA no serían, en principio, adecuados para su empleo con fines diagnósticos, siendo deseable la realización de estudios encaminados a mejorar la precisión en estos dos métodos. Sin embargo, las consecuencias que pueden derivarse de la alta imprecisión observada se ven minimizadas si se considera la gran diferencia existente entre las concentraciones de estas dos proteínas de fase aguda en muestras normales y patológicas. Así, sería muy difícil que un animal que presentase concentraciones normales de CRP o SAA fuera clasificado como un animal enfermo, o viceversa, a causa de la imprecisión de los métodos, ya que el rango de valores obtenido en este estudio para la CRP en animales sanos fue 0,49-6,21 mg/L y sin embargo el rango obtenido para la CRP en perros con diversas enfermedades fue 21,2-39,3 mg/L en leishmaniasis y 144,4-243,9 mg/L en piómetra (cuadro 2).

Como puede observarse en las figuras 1, 2 y 3 la dilución de una muestra de suero con elevadas concentraciones de las APPs estudiadas resultó en una recta con una ecuación de regresión lineal con un coeficiente de correlación de  $R^2 > 0,98$  en todos los casos. Estos resultados muestran que los ensayos evaluados determinan las concentraciones de haptoglobina, CRP y SAA de una forma lineal y proporcional y puede indicarse, por tanto, que estos análisis determinan con una exactitud adecuada di-



**Figura 1.** Valores de haptoglobina (Hp) (g/l) obtenidos al diluir de forma seriada una muestra con valor elevado.  $R^2$ : coeficiente de determinación.

Haptoglobin values obtained for a pathologic sample serially diluted.  $R^2$ : coefficient of determination.



**Figura 2.** Valores de proteína C reactiva (CRP) (mg/L) obtenidos al diluir de forma seriada una muestra con valor elevado.  $R^2$ : coeficiente de determinación.

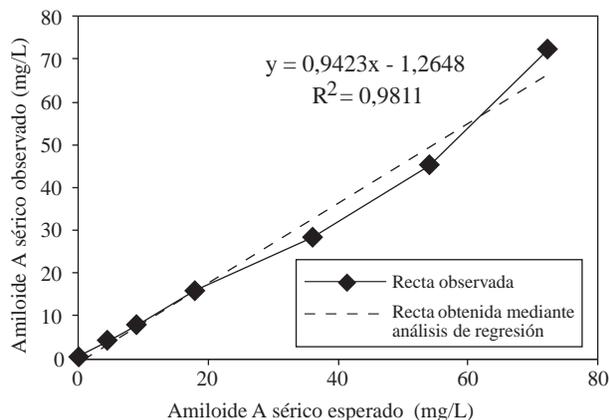
C-reactive protein (CRP) values obtained for a pathologic sample serially diluted.  $R^2$ : coefficient of determination.

**Cuadro 2.** Valores de proteínas de fase aguda obtenidos en perros sanos (Grupo 1), perros con leishmaniasis (Grupo 2) y con piómetra (Grupo 3).

Acute phase protein values obtained in healthy dogs (Group 1), dogs with leishmaniasis (Group 2) and dogs with pyometra (Group 3).

Grupo	Haptoglobina (g/L)	Amiloide A sérico (mg/L)	Proteína C reactiva (mg/L)
Grupo 1 (n = 6)	2,17 ± 0,97	3,61 ± 0,72	3,35 ± 2,86
Grupo 2 (n = 10)	6,01 ± 2,74*	58,75 ± 47,90*	30,58 ± 9,34*
Grupo 3 (n = 10)	8,46 ± 3,52*	47,58 ± 39,17*	194,14 ± 49,78*

n = número de animales. \*P < 0,05 respecto grupo 1.



**Figura 3.** Representación de los valores de amiloide A sérico (mg/L) obtenidos al diluir de forma seriada una muestra con valor elevado.  $R^2$ : coeficiente de determinación

Serum amyloid A values (SAA) obtained for a pathologic sample serially diluted.  $R^2$ : coefficient of determination.

chas proteínas de fase aguda. La exactitud se comprobó de esta forma (linealidad bajo dilución), ya que no se dispone de un método de referencia para medir estas proteínas, y tampoco existe material de referencia para realizar controles de calidad con concentraciones conocidas de PFAs de la especie canina.

Los límites de detección calculados para cada análisis fueron 0,02 g/L para la Hp, 0,15 mg/L para la CRP y 0,79 mg/L para el SAA. En el caso de la Hp el límite de detección obtenido fue semejante al calculado por Eckersall y col (1999). Para la CRP y el SAA el límite establecido fue inferior al determinado por Kjelgaard-Hansen y col (2003) y Eckersall y col (2001) respectivamente, hecho que podría atribuirse a diferencias en la metodología empleada para la determinación y el cálculo del mismo. Los valores obtenidos para el límite de detección indican que los métodos son adecuados para determinar la concentración de estas PFAs en muestras de suero de la especie canina, pero no permiten su medición en otros fluidos de menor concentración proteica como la saliva.

*Validación clínica.* Como puede observarse en el cuadro 2 las concentraciones de las PFAs estudiadas fueron más elevadas en animales con piómetra y leishmaniasis que en el grupo control. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios que muestran un incremento de estas proteínas de fase aguda en diversas patologías en el perro, tales como Ehrlichiosis (Rikihisa y col 1994, Shimada y col 2002), Tripanosomiasis (Ndung'u 1991), Leishmaniasis (Martínez-Subiela y col 2002), diversos tumores (Caspi y col 1987, Ogilvie y col 1993), así como enfermedades del tracto gastrointestinal, respiratorio o urinario (Solter y col 1991). Este hallazgo pone de manifiesto la utilidad clínica de los métodos estudiados para detectar animales que presentan procesos inflamatorios.

Además, la medición de estas proteínas de fase aguda presenta una serie de ventajas frente a los métodos utilizados tradicionalmente para detectar la presencia de inflamación como el recuento de leucocitos, por tener una mayor estabilidad que los componentes celulares de la sangre, mayor sensibilidad para la detección de procesos inflamatorios (Solter y col 1991), mayor capacidad para determinar la severidad de un proceso inflamatorio (Yamamoto y col 1993) y, además, pueden ayudar a determinar la existencia de inflamación en los animales que presentan supresión o disminución de la actividad de la médula ósea (Jain 1989). Si bien, dada la gran cantidad de causas que pueden estimular la respuesta de fase aguda, en caso de encontrar aumentos de estas proteínas, sería preciso realizar pruebas complementarias que nos permitieran detectar la etiología del proceso (Eckersall 2004).

En base a los resultados obtenidos en este trabajo puede decirse que los ensayos disponibles actualmente para la determinación de haptoglobina, proteína C reactiva y amiloide A sérico pueden ser empleados de forma rutinaria en un laboratorio de patología clínica para medir la concentración de dichas proteínas en muestras de suero de la especie canina y detectar animales con procesos inflamatorios. Sin embargo, se recomendaría la realización de posibles estudios encaminados a reducir la imprecisión interdeterminación encontrada en los ensayos de proteína C reactiva y amiloide A sérico.

## RESUMEN

Los métodos analíticos deben ser validados antes de emplearlos de forma rutinaria en un laboratorio. El objetivo de este trabajo fue validar tres métodos analíticos comerciales usados en nuestro laboratorio para la determinación de haptoglobina (Hp), proteína C reactiva (CRP) y amiloide A sérico (SAA) en muestras de la especie canina con concentraciones bajas y altas de proteínas de fase aguda (PFAs). Los parámetros que se evaluaron para la validación fueron: (1) Precisión, determinada mediante el cálculo de los coeficientes de variación (CVs) intra e interdeterminación. (2) Exactitud, evaluada indirectamente comprobando la linealidad bajo dilución. (3) Límite de detección, determinado como la mínima concentración que puede distinguirse de una muestra de valor 0.

Todos los CVs intradeterminación fueron < 10%, mostrando buena precisión intradeterminación. Sin embargo, los CVs interdeterminación de CRP y SAA fueron > 10%. La dilución de una muestra de suero con elevada concentración de PFAs resultó en una recta con una ecuación de regresión lineal con un valor de  $R^2 > 0,98$  en todos los casos, mostrando una buena exactitud. Los límites de detección calculados para cada análisis fueron 0,02 g/L para la Hp, 0,15 mg/L para la CRP y 0,79 mg/L para el SAA. Adicionalmente, todos los métodos permitieron diferenciar animales con procesos inflamatorios o infecciosos de animales sanos. Por lo tanto, los resultados de la validación realizada muestran que los ensayos evaluados pueden ser empleados para la medición rutinaria de estas PFAs en muestras de la especie canina. Sin embargo, sería deseable reducir la elevada imprecisión interdeterminación encontrada para los análisis de CRP y SAA.

## REFERENCIAS

- Caspi D, FWJJ Snel, D Batt Bennet, GR Rutteman, EG Hartman, ML Baltz, E Gruys, MB Pepys. 1987. C reactive protein in dogs. *Am J Vet Res* 48, 919-921.
- Cerón JJ, MD Parra, F Tecles, S Martínez-Subiela. 2003. Recent advances in methodology for acute phase protein measurements in dogs. En: XI Cong. Int. Soc. An. Clin. Biochem. Valdivia, Chile, pp. 76.
- Eckersall PD, S Duthie, S Safi, D Moffatt, NU Horadagoda, S Doyle, R Parton, D Bennett, JL Fitzpatrick. 1999. An automated biochemical assay for haptoglobin: prevention of the interference from albumin. *Comp Haematol Int* 9, 117-121.
- Eckersall PD, FJ Young, C Mc Comb, CJ Hogarth, S Safi, A Weber, T Mc Donald, AM Nolan, JL Fitzpatrick. 2001. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec* 148, 35-41.
- Eckersall PD. 2003. Coordination, harmonisation and standardisation of measurement of bovine and porcine acute phase protein in blood; reference preparations for animal protein assays. En: Informe final de la acción concertada europea para la estandarización internacional de proteínas de fase aguda número QLK5-CT-1999-0153.
- Eckersall PD. 2004. The time is right for acute phase protein assays. *Vet J* 168, 3-5.
- Jain NC. 1989. Acute phase proteins. En: *Current Veterinary Therapy X: Small animal practice*, Ed: R.W. Kirk, J.D. Bonagura, pp. 468-471 W. B. Saunders, Philadelphia.
- Kjelgaard-Hansen M, AT Kristensen, AL Jensen. 2003. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of C-reactive protein in canine serum. *J Vet Med A* 50, 164-168.
- Lumsden JH. 2000. Laboratory test methods validation. *Revue Med Vet* 151, 623-630.
- Martínez-Subiela S, F Tecles, MD Parra, JJ Cerón. 2001. Acute phase proteins: general concepts and main clinical applications in veterinary medicine. *An Vet (Murcia)* 17, 99-116.
- Martínez-Subiela S, F Tecles, PD Eckersall, JJ Cerón. 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec* 150, 241-244.
- Ndung'u JM, PD Eckersall, FW Jennings. 1991. Elevation of the concentration of acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*. *Acta Trop* 49, 77-86.
- Ogilvie GK, LM Walters, SG Greeley, SE Henkel, Salman MD. 1993. Concentration of alpha 1 acid glycoprotein in dogs with malignant neoplasia. *J Am Vet Med Assoc* 203, 1144-1146.
- Rikihisa Y, S Yamamoto, I Kwak, Z Iqbal, G Kociba, J Mott, W Chichanasiriwithaya. 1994. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J Clin Micro* 32, 912-917.
- Shimada T, Y Ishida, M Shimizu, M Nomura, K Kawato, K Iguchi, T Jinbo. 2002. Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Vet Res Commun* 26, 171-177.
- Solter P, WE Hoffmann, LL Hungerford, JP Siegel, SH St Denis, JL Dorner. 1991. Haptoglobin and Ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *Am J Vet Res* 52, 1738-1742.
- Yamamoto S, T Shida, H Miyaji, H Santsuka, H Fujise, K Mukawa, E Furukawa, T Nagae, M Naiki. 1993. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Vet Res Comm* 17, 85-93.