

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

NMBU Veterinærhøgskolen
Institutt for sport- og familiedyrmedisin
SportFaMed

Fordypningsoppgave 2020, 15 stp

Smådyrdifferensiering

Nyreskade hos hunder bitt av huggorm – biomarkører i urin

Kidney Injury in Dogs Bitten by The European Adder –
Urinary Biomarkers

Lise Myhre,
Rikke Eveline Sundhagen
Kull 2014

Hannah Harjén,
Runa Rørtveit

Innhold

Forord.....	4
Sammendrag	5
Definisjoner og forkortelser.....	6
Innledning	8
Huggorm – <i>Vipera berus</i>	8
Huggormgiftens sammensetning og virkemåte	8
Kliniske sykdomstegn hos hund bitt av huggorm.....	11
Nyreskade og proteinuri.....	12
Anvendelse av tradisjonelle biomarkører for nyrefunksjonen ved diagnostikk av nyreskade	12
Nefronets funksjon og håndtering av proteiner under fysiologiske forhold.....	13
Mekanismene bak renal proteinuri og enzymuri	14
Diagnostikk ved akutt nyreskade hos hund	16
Alternative biomarkører for akutt nyreskade.....	17
Behandling av huggorbitt hos hund.....	19
Formål.....	21
Materiale og metoder	22
Materiale	22
Beskrivelse av kasusgruppen	22
Metoder.....	26
Urinalyse	26
Serumanalyse	26
Statistiske metoder	27

Resultater	29
Konsentrasjon av markørene ALP, GGT og CRP i urinen hos hunder bitt av huggorm sammenlignet med kontrollgruppen	29
Konsentrasjon av markørene ALP, GGT og CRP 24 timer (T1) vs. 14 dager (T2) etter huggorbitt.....	30
Serum kreatinin hos hunder bitt av huggorm.....	32
Diskusjon	33
Konklusjon.....	38
Takk til bidragsytere	39
Summary	40
Referanser	41

Forord

Serum kreatinin og urea som mål på nyrefunksjonen hos hund brukes for å diagnostisere akutt nyreskade. Problemet er at disse markørene har lite sensitivitet. Vi vil ikke kunne oppdage forhøyede serumkonsentrasjoner før ca 75% av nyrefunksjonen er tapt. Dette gir et behov for andre, mer sensitive markører ved diagnostikk av mildere former for nyreskade. Dette er grunnen til at vi valgte denne oppgaven, for å se om vi kunne diagnostisere en nyreskade ved hjelp av mer sensitive markører.

Sammendrag

Tittel: Nyreskader hos hund bitt av huggorm – biomarkører i urin

Forfattere: Lise Myhre og Rikke Eveline Sundhagen

Veileder: Hannah Harjén, institutt for sports- og familiedyrmedisin og Runa Rørtveit, institutt for prekliniske fag og patologi.

Huggorm (*Vipera berus*) er den eneste giftige slangen i Skandinavia, og huggorbitt hos hund forekommer mellom april og oktober. Giften fra huggorm inneholder bestanddeler som kan ha en toksisk virkning på nyrene. Formålet med denne oppgaven var å kartlegge nyreskade etter 24 timer og 14 dager hos hunder bitt av huggorm ved hjelp av biomarkørene serum kreatinin, uALP, uGGT og uCRP. Tilstedeværelse av disse kan indikere en nyreskade. Urinprøver fra 34 hunder bitt av huggorm på Østlandet i Norge og 40 friske kontroller ble analysert for tilstedeværelse av biomarkørene ALP (alkalisk fosfatase), GGT (gamma-glutamyltransferase) og CRP (C-reaktivt protein). Urinprøvene fra kasusene var samlet 24 timer og 14 dager etter huggorbitt. Kontrollgruppen var stratifisert med hensyn på alder og vekt slik at den skulle være så lik populasjonen av hunder i kasusgruppen som mulig. Resultatene viste en statistisk signifikant økning i konsentrasjon av ALP i urinen hos hunder bitt av huggorm både 24 timer og 14 dager etter bitt, sammenlignet med kontrollgruppen. Dette kan tyde på skade i epitelcellene i proksimale tubuli som fører til lekkasje av disse enzymene. Videre viste våre undersøkelser at konsentrasjonen av ALP var signifikant høyere 24 timer etter bitt sammenlignet med prøvene tatt 14 dager etter. Det var ingen signifikant forskjell i konsentrasjonen av CRP og GGT i urinen hos hunder bitt av huggorm sammenlignet med kontrollgruppen.

Definisjoner og forkortelser

EKG	Elektrokardiografi
Azotemi	Unormal økning av blodets konsentrasjon av urea og/eller kreatinin
Uremi	Kliniske sykdomstegn på grunn av azotemi
GFR	Glomerulær filtrasjonsrate
kDa	Kilodalton
Lavvektsmolekyl	Størrelse > 100 kDa
Høyvektsmolekyl	Størrelse < 40 kDa
UPC	Urin protein kreatinin ratio
IRIS	International Renal Interest Society
SDMA	Symmetric dimethylarginin
Oliguri	Nedsatt urinutskillelse
Anuri	Manglende urinutskillelse
CRP	C-reaktivt protein
GGT	Gamma-glutamyltransferase

ALP	Alkalisk fosfatase
Alb	Albumin
RBP	Retinol bindende protein

Innledning

Huggorm – *Vipera berus*

Vipera berus, også kalt huggorm, er den eneste giftige slangen vi har i Skandinavia (1).

Slangen tilhører familien *Viperidae* og blir vanligvis mellom 50 og 70 cm lang og veier 150-200 g. Den gjenkjennes på sitt karakteristiske avtegn, et sikksakk-mønster, langs ryggen. Vi finner huggormen både i fjell og sletteland og den trives særlig godt på varme steder, for eksempel i solvendte lier. Den lever i jordhuler og steinrøyser og kommer gjerne frem for å sole seg. I Norge hvor deler av året har lave temperaturer, ligger den i dvale i den kalde årstiden. Ungene fødes levende, er giftige med en gang og kan bite og drepe små dyr.

Huggormen dreper sitt bytte med et momentant hugg av gifttennene. Tennene hos huggormen er små (12 mm) og rørformede og ligger skjult i en slimhinnefold i maxillaen når munnen er lukket. Når slangen åpner munnen, snus maxillaen loddrett slik at gift-tennene rettes fremover, når den biter slynger den hodet med åpen munn frem mot byttet og tennene presses inn i byttet med stor kraft (2). Mengde gift i et bitt varierer fra ingenting, såkalt tørre bitt, til større doser (3).

Huggormgiftens sammensetning og virkemåte

Giften fra *Vipera berus* inneholder en sammensetning av kjemiske substanser som skal immobilisere, drepe og fordøye et bytte. Disse stoffene virker på byttets nerve-, muskel- og kardiovaskulære systemer. Giften har en gul farge og vandig konsistens og består av ca. 25 ulike proteiner og peptider, hvorav 95% peptider som kan ha enzymatisk virkning (4). Mer spesifikt inneholder giften proteaser, fosfolipaser, hyaluronidaser, metalloproteinaser, fosfodiesteraser og L-aminosyre oksidaser. Disse bestanddelene har hemolytiske,

proteolytiske og cytotoxiske egenskaper og kan føre til ødemer, forstyrrelser i hemostasen og hypovolemi (4, 5).

En studie fra Slovakia undersøkte sammensetningen av giften fra innsamlede *Vipera berus* og forklarte de ulike bestanddelenes effekt. Studien viser at de flere av giftens bestanddeler har hemotoksiske effekter som fører til forstyrrelser i hemostasen. Noen av proteinene som ble undersøkt har i tillegg til dette en nevrotoksisk effekt (4). Disse funnene er beskrevet i Tabell 1.

Tabell 1 Venomets bestanddeler og effekt. Innhold hentet fra den slovakiske studien ”Proteome and Peptidome of Vipera berus Venom” (4)

BESTANDDEL I VENOMET	EFFEKT
Snaclec protein innen gruppen C-type lektinlignende proteiner	Non-enzymatiske hemodimerer som fører til agglutinerings av erythrocytter
Fosfolipase A₂ (Utgjorde 60 % av venomet)	Toksisk effekt på nerve- og muskelvev som er viktig ved immobilisering av byttet. Ulike fosfolipaser har ulike skadeeffekter, og venomet består av mange ulike fosfolipaser. Disse kan blant annet føre til blodkoagulering, blokkering av nevro-muskulære signaler og skjelettmuskel- paralyse.
Serine proteaser (trombinlignende enzymer)	Katalyserer reaksjoner i koagulasjonskaskaden, fibrinolyse og plateaggregering.
Slangevenom metalloproteinaser	Viktige ved immobilisering av bytte ved å blokkere transmisjon av nervesignaler, og ved proteolyse av vev som er viktig for fordøyelsen av bytte.
Angiotensinlignende peptider	Kan ha en kontraherende eller dilaterende effekt på blodkar.
L-aminosyre oksidaser	Skaper et oksidativt stress induert av H ₂ O ₂ som produseres ved oksidativ deaminering av L-aminosyrer. Dette har ulike effekter, blant annet antikoagulerende effekter ved å hemme plateaggregering og det kan virke anti-viralt og anti-bakterielt.
CRISP (cysteinrikt protein)	Nevrotoksisitet på grunn av inhibering av ulike ionekanaler som hindrer en depolarisering av cellemembranen.

Kliniske sykdomstegn hos hund bitt av huggorm

Den vanligste tiden vi ser huggormbitt hos hund er i sommerhalvåret, april-september (1). Det er beskrevet flere kliniske sykdomstegn ved huggormbitt, for eksempel letargi, smerte, hypotensjon, takykardi, sjokk, oppkast, diaré og takypné (6). Av og til kan man se selve bittsåret som to små hull i huden med 1 cm mellomrom (6). Andre kliniske tegn kan være hypertermi, hypersalivering og halthet (7).

En lokal hevelse ved bittstedet er normalt. En retrospektiv studie fra Storbritannia så på tilfeller av hunder bitt av huggorm og tilfeller der huggormbitt var mistenkt i perioden 1985-2010. Studien viste at hevelser i ansiktet var vanligst, etterfulgt av hevelser i ekstremiteter, larynx og pote, hvor hevelsene tilsvarte bittstedet (7). Lokalt er det også vanlig å se hematomer, som gir en blårød misfarging av huden (6).

Giften kommer inn i sirkulasjonen via lymfesystemet og fører til økt permeabilitet i kapillærer som vil kunne resultere i lokale ødemer og hypovolemi, som kan ende i hypovolemisk sjokk (7). Man går ut ifra at giften spres effektivt i kroppen ved muskelarbeid. Dette betyr at hunder som er bitt i ekstremitetene burde hindres i å bevege seg for å hindre spredning, dette kan oppnås ved burhvile i noen dager etter bitt (3). En svensk studie som omfattet 170 hunder bitt av huggorm konkluderte med at hundens størrelse ikke hadde noen innvirkning på forløp etter bitt, og at prognose var vanskelig å vurdere tidlig i forløpet (3). Den samme studien fant at lokalisasjon av bitt derimot var en viktig prognostisk faktor, og at bitt i ekstremiteter og hals var mest dødelig (3).

Takykardi og ulike hjertearrytmier er vanlige funn hos hund bitt av huggorm. Den vanligste arrytmien er ventrikulære ekstraslag, oftest ett til to døgn etter bitt (3). En svensk studie utførte 24-t EKG monitorering av 17 hunder de første 24-32 timene etter bitt av *Vipera berus*.

Denne studien konkluderte med at så mange som 47% av hundene hadde ventrikulære arrytmier (8).

Nyrefunksjonen kan påvirkes av giften, og dette kan vise seg ved azotemi, en økning av blodets konsentrasjon av urea og kreatinin (9). Azotemien vil deretter kunne gi kliniske sykdomstegn hos dyret. Denne tilstanden kjenner vi som uremi og er et resultat av den nedsatte nyrefunksjonen (3, 10, 11). Uremien i de fleste tilfeller forsvinne ved rask og tilstrekkelig behandling (3, 9). I tilfeller der hunder med uremi har dødd, er det blitt påvist patologiske forandringer i nyrene i form av infarkter og tromber (3).

Nyere studier viser derimot at azotemi som resultat av et huggorbitt er svært sjelden hos hund (7, 12). Dette kan forklares av at de fleste hundene i disse studiene alle har vært behandlet med intravenøs væske, som dermed har økt den glomerulære filtrasjonen og dermed også forhindret den negative påvirkningen slangegiften kan ha på nyrene (7).

Nyreskade og proteinuri

Anvendelse av tradisjonelle biomarkører for nyrefunksjonen ved diagnostikk av nyreskade

Et så høyvaskularisert organ som nyret er spesielt utsatt ved forgiftninger. Noen av de vanligste tegnene på at nyrene er involvert eller skadet, er blant annet proteinuri, hematuri og nedsatt nyrefunksjon i form av azotemi eller uremi (13). En mindre nyreskade vil ikke kunne avsløres ved hjelp av de tradisjonelle biomarkørene for nyrefunksjon, serum kreatinin og urea. Urea og kreatinin brukes som et indirekte mål på den glomerulære filtrasjonsraten (GFR) i nyrene, altså hvor mye blodplasma som filtreres i nyrene per tidsenhet og er et mål på nyrefunksjonen (14). Disse vil ikke kunne brukes for å diagnostisere en akutt nyreskade før om lag 50-75% av nyrefunksjonen er tapt. Grunnen til dette er at nyrenes store

reservekapasitet gjør at økte blodkonsentrasjoner av urea og kreatinin ikke ses før ca $\frac{3}{4}$ av funksjonen av begge nyrene er påvirket (15).

Urea dannes i lever etter nedbrytning av ammoniakk og filtreres fritt i glomeruli på grunn av sin lave molekylære størrelse (60 kilodalton (kDa)), og absorberes passivt i renale tubuli.

Kreatinin dannes ved metabolisme av kreatinin og fosfokreatin i muskler. Produksjonen er konstant og proporsjonal med dyrets muskelmasse. Kreatinin-nivåene er konstante, påvirkes ikke av fôrintak og skilles hovedsakelig ut over nyrene. Dette betyr at dersom det er en økning i serum-kreatinin så er dette et resultat av nedsatt ekskresjon over nyrene (10).

Både prerenale, renale og post-renale årsaker kan føre til nedsatt ekskresjon av urea og kreatinin, og nedsatt ekskresjon over nyrene vil føre til økt innhold av disse stoffene i blodet. Dette skjer blant annet pre-renalt ved dehydrering eller redusert minuttvolum, post-renalt ved for eksempel obstruksjoner i urinveiene eller blæruktur, og på renalt nivå ved primær dysfunksjon i nyret (10).

Fordi forøkte verdier av de tradisjonelle biomarkørene ikke vil oppdages på blodprøver før $\frac{3}{4}$ av nyrefunksjonen er tapt, er det et behov for andre, mer sensitive markører, og flere markører i urin er angitt å være mer sensitive ved diagnostisering av nyreskade (16). Disse markørene beskrives senere i oppgaven.

Nefronets funksjon og håndtering av proteiner under fysiologiske forhold

Oppbygningen av glomeruli med Bowmans kapsel og den restriktive permeabilitet i glomeruluskapillærene er med på å holde molekyler av en viss størrelse tilbake i blodet slik at de ikke filtreres over til urinen (10). Filtratet passerer først gjennom porer i glomerulært endotel, deretter gjennom et kollagenøst nettverk i den glomerulære basalmembranen og til slutt skal det passere gjennom podocytlaget (17). Store molekyler filtreres i mindre grad enn

små molekyler (10). Den glomerulære filtrasjonsbarrieren holder tilbake alle molekyler på størrelse med eller større enn albumin. Molekyler med størrelse < 40 kDa klassifiseres som lavvektsmolekyler, og kan fritt passere over den glomerulære filtrasjonsbarrieren.

Høyvektsmolekyler, molekyler med størrelse >100 kDa, vil normalt hindres i å filtreres på grunn av sin store størrelse (18). Størrelse alene kan likevel ikke forklare hvilke molekyler som filtreres og hvilke som ikke filtreres, det har også med molekylets ladning å gjøre (17).

Positivt ladde molekyler passerer filtrasjonsbarrieren lettere enn de negativt ladde molekylene, som følge av at filtrasjonsbarrieren selv har en negativ ladning (19).

I renale tubuli skjer det normalt en reabsorpsjon av de proteiner som har blitt filtrert i glomeruli. Reabsorpsjonen foregår i proksimale tubulis epitelceller ved hjelp av endocytose. Proteinene hydrolyseres intracellulært til sine respektive aminosyrer. Dette foregår inne i vesikler og ved hjelp av lysosymer. Aminosyrene krysser deretter den basolaterale cellemembranen og returnerer tilbake til sirkulasjonen (17).

Oppsummert kan vi si at under fysiologiske forhold er det en minimal tilstedeværelse av proteiner og større molekyler i urinen. En økt tilstedeværelse av proteiner i urinen kan indikere skade på glomeruli eller tubuli (10).

Mekanismene bak renal proteinuri og enzymuri

Proteinuri defineres som tilstedeværelse av protein i urinen. Urinen hos hund inneholder normalt kun små mengder proteiner (10). Proteiner i urinen kvantifiseres ved hjelp av urin protein:kreatinin ratio (UPC ratio). Dersom man kun måler mengde protein i urinen vil dette variere mye sammen med konsentrasjonsgraden til urinen. Derfor angis proteinmengden i forhold til mengden kreatinin i urinen, som skilles ut konstant og ikke absorberes. UPC gir

dermed et mer korrekt mål på om protein-ekskresjonen er økt eller ikke (20). Hos hunder sier man at det er en signifikant proteinuri ved vedvarende $UPC > 0.5$. Ved UPC -verdier < 0.2 defineres det ikke som proteinuri (21).

Proteinuri kan deles inn i tre underklasser; pre-renal, renal og post-renal proteinuri. Pre-renal proteinuri skyldes forøket mengde små proteiner i plasma. Dette er som regel lavvektsmolekyler som for eksempel hemoglobin, myoglobin og immunoglobulin. Den økte mengden plasmaproteiner vil lede til økt konsentrasjon i filtratet, som vil medføre metning av reabsorpsjonsmekanismene i tubuli og resultatet blir økt mengde proteiner i urinen.

Post-renal proteinuri forekommer når proteiner kommer over i urinen fra urinveiene distalt for nyrene. Dette kan blant annet oppstå ved urinveisinfeksjoner, inflammasjoner eller blødninger (21).

Renal proteinuri kan skyldes endring i glomerulus-kapillærenes selektive permeabilitet, ved nedsatt reabsorpsjon av filtrerte proteiner i proksimale tubuli, ved skade på epitelceller i proksimale tubuli som fører til lekkasje av enzymer (18), eller ved en interstitiell skade. For at en interstitiell eller parenchymal skade skal kunne føre til proteinuri må det være en inflammasjon tilstede i vevet (21). En svekkelse i glomerulis permeabilitet fører til at unormale mengder proteiner og større molekyler ender opp i tubuli-lumen. Dermed kan prosessene som styrer reabsorpsjon mettes, og proteinene/molekylene skilles ut i urinen istedenfor å reabsorberes (17). Affiniteten til de tubulære reseptorene megalin og cubulin varierer mellom proteinene i filtratet. Dette kan føre til en konkurranse om bindings seter når det blir mange proteiner i filtratet (19). Generelt kan man si at ved glomerulære skader får man markert proteinuri på grunn av den økte permeabiliteten og stor lekkasje av større

molekyler. Ved tubulær skade får man en mild proteinuri på grunn av nedsatt reabsorpsjon av filtrerte proteiner, lekkasje av proteiner fra skadde epitelceller og en oppregulering av proteiner som er involvert i skade og reparasjonsprosesser i kroppen (18). Hemodynamiske faktorer påvirker også proteinuri. De afferente og efferente renale arteriolene responderer på angiotensin II, prostaglandiner, endotelin og andre vasoaktive mediatorer ved at de enten kontraherer eller dilaterer. Dersom afferente arterioler dilateres samtidig som efferente kontraheres oppstår glomerulær hypertensjon som kan føre til proteinuri på grunn av økt GFR. GFR øker ved hypertensjon på grunn av en forstørring av porene i filtrasjonsbarrieren i glomerulus, og større porer fører til økt filtrering av proteiner (21).

Diagnostikk ved akutt nyreskade hos hund

I tillegg til økte blodkonsentrasjoner av kreatinin og urea, som er nevnt tidligere, er det også andre undersøkelser som kan være til hjelp dersom man mistenker en akutt nyreskade. Anamnese, klinisk undersøkelse, biokjemiske tester, ultralydfunn og av og til nyrehistologi benyttes ved diagnostisering av akutt nyreskade. En hund med akutt nyreskade har oftest ingen langvarig historie som tyder på kronisk nyresykdom og vil typisk presentere med akutt innsettende symptomer, blant andre oppkast, diarè, anorexi og letargi. Disse pasientene vil også kunne presentere med andre komorbiditeter, for eksempel pankreatitt og gastroenteritt (22). En akutt nyreskade vil kunne føre til økte fosforkonsentrasjoner i blodet, derfor kan også hyperfosfatemi brukes som en diagnostisk faktor i utredningen. Hyperfosfatemi oppstår fordi de aktive kompensatoriske mekanismer som fremmer fosfor-ekskresjon er tidkrevende prosesser og setter derfor ikke inn ved en akutt nyreskade (22). Kalsiumkonsentrasjon i blod er vanligvis normal til lav hos dyr med akutt nyreskade. Ultralyd kan benyttes for å skille mellom akutt og kronisk nyresykdom. Ved akutt nyreskade det liten endring i nyrets form,

men kan vise hyperekkogen cortex og nyret kan være noe forstørret (22). En akutt nyreskade graderes I-V, i følge International Renal Interest Society (IRIS) og presenteres i Tabell 2 (23).

Alternative biomarkører for akutt nyreskade

Tilstedeværelse av utvalgte biomarkører i urinen kan måles og anvendes til å si noe om det kan ha skjedd en skade i glomeruli eller tubuli. Biomarkører er definert som biologiske variabler som kan måles på en objektiv måte, og kan være indikatorer på normale prosesser, patologiske prosesser eller indikere respons på behandling. En god biomarkør for nyreskade bør kunne identifisere mild nyreskade, samt lokalisere skaden til tubuli eller glomeruli (19). Markørene vi skal lete etter i urin fra hunder bitt av huggorm er C-reaktivt protein (CRP), gamma-glutamyltransferase (GGT) og alkalisk fosfatase (ALP), og resultatene skal sammenlignes med nivåer fra friske hunder som ikke er bitt av huggorm.

Enzymene GGT og ALP finnes i lysosymer på brush-border eller i cytoplasma i proksimale tubuliceller (19). Disse enzymenes størrelse tilsier at de er for store til å kunne filtreres over glomerulus (24). Funn av disse markørene i urin vil derfor være en indikasjon på proksimal tubulær skade og viser at det har skjedd en unormal lekkasje av disse enzymene (25).

CRP er et akutfaseprotein som hovedsakelig produseres av hepatocytter. Molekylervekten for CRP varierer mellom 110-144 kDa (18). CRP finnes i forhøyede serumkonsentrasjoner ved inflammatorisk sykdom. Dersom CRP detekteres i en urinprøve tyder dette på en glomerulær skade, da CRP er et høyvektsmolekyl som normalt ikke filtreres over glomeruli. (26).

Tabell 2 IRIS gradering av akutt nyreskade (23)

GRAD	KRITERIER
I	<p>Ingen azotemi men pasienten har sykehistorie, kliniske funn, laboratoriefunn¹⁾ eller bildediagnostikk som peker i retning akutt nyreskade og/eller klinisk oliguri/anuri.</p> <p>Progressiv økning i serum-kreatinin ≥ 0.3 mg/dl (≥ 26.4 $\mu\text{mol/l}$) i løpet av et 48 t intervall, uten at pasienten er azotemisk.</p> <p>Nedsatt urinproduksjon, men responderer på væskebehandling²⁾.</p>
II	<p>Dyr med dokumentert akutt nyreskade som karakteriseres ved mild azotemi og andre anamnetiske, biokjemiske og anatomiske tegn til akutt nyreskade, samt en avvikende urinproduksjon (som beskrevet for grad I).</p> <p>Dyr med oliguri og/eller azotemi som er væskerresponsive³⁾</p> <p>Dyr som har en økning i kreatinin konsentrasjon som tilsvarer ≥ 0.3 mg/dl (≥ 26.4 $\mu\text{mol/l}$) i løpet av et 48 timers intervall assosiert med allerede eksisterende kronisk nyresykdom</p>
III-V	<p>Dyr med dokumentert akutt nyreskade med større grad av progressive parenchymale skader og funksjonell nyresvikt⁴⁾</p>

¹⁾Laboratoriefunn: SDMA, glukosuri, cylinduri, proteinuri, inflammatorisk sediment, mikroalbuminemi)

²⁾Respons på væskebehandling: representerer en økning i urinproduksjonen på >1 ml/kg/t innen 6 timer, eller en nedgang i blod-kreatinin til baseline innen 48 t^o.

³⁾Væskerrespons som forklart ved grad I

⁴⁾Funksjonell nyresvikt = uremi

Behandling av huggorbitt hos hund

Ved behandling av hund bitt av huggorm deles pasientene inn i tre pasientgrupper (A-C) hvor hver gruppe har sin egen behandlingsprotokoll. Disse behandlingsprotokollene er utarbeidet for hund av NMBU smådyrklubben. Protokollen kan også benyttes for andre små (<10kg) arter enn hund, for eksempel katt (27) .

Tabell 3 BEHANDLING AV HUND BITT AV HUGGORM – Utdrag fra protokoll ved NMBU smådyrklubben, rev. 2017.

PASIENTGRUPPE	BEHANDLING
Gruppe A: Uten lokale eller systemiske symptomer	<u>Ingen behandling, men tilsyn:</u> tilsyn i minimum 12 t etter bitt, enten av eier selv eller på klinikk. Eier må selv oppsøke veterinær dersom hunden utvikler sykdomstegn etter hjemsendelse fra klinikk.
Gruppe B: Milde lokale eller milde systemiske symptomer	<u>Minimum-pasientinformasjon:</u> klinisk undersøkelse, blodgass, Hematokrit (HKT), totalprotein (TP), urin spesifikk vekt (USG), hematologisk og serumbiokjemisk blodanalyse og standard urinanalyse. <u>Væske:</u> Ringer Acetat om ikke annet tilsies. Pasientene SKAL kobles til infusjonssprøyter/sprøytepumper, god perfusjon av nyrer må sikres. Urinproduksjon må observeres og dokumenteres. <u>Smertebehandling:</u> Buprenorfin 0,01-0,02 mg/kg iv/im/sc eller Metadon 0,1-0,4 mg/kg iv/im/sc. Unngå NSAIDs! Evt. vurder Lidokain CRI 1-3 mg/kg/t <u>Antibiotika:</u> kun hvis klinisk indisert og i henhold til dyrkning og resistensbestemmelse. Se ellers anbefalinger for Gruppe C. <u>Eventuelt antiveninbehandling:</u> Vurderes ut ifra helhetsbildet. Disse

	<p>pasientene har ofte et uforutsigbart sykdomsforløp som må monitoreres jevnlig. Mange vil ha god nytte av antiveninbehandling.</p> <p><u>Overvåkning:</u> pasientens allmen- og hydreringsstatus overvåkes.</p> <p>Oppfølging og evt. utvikling av blodgass-parametere, hematologisk og serumbiokjemiske blodprøver, urin, EKG ved arytmier og blodtrykk.</p> <p><u>Videre oppfølging:</u> Ro i 1-2 uker etter bitt. Kontroll hos veterinær 1 og 2 uker etter bitt.</p>
<p>Gruppe C:</p> <p>Kraftig lokale eller tydelige systemiske symptomer</p>	<p><u>Minimum-pasientinformasjon:</u> Samme som for gruppe B</p> <p><u>Væske:</u> Ringer Acetat om ikke annet tilsies spesielt (OBS – selve antivenininfusjonen bør foretas utblandet i NaCl 0,9 %). Behandling tilpasses individuelt. Disse pasientene SKAL kobles til infusjonspumpe/sprøytepumpe! God perfusjon av nyrer må sikres – observer og dokumenter urinproduksjon.</p> <p><u>Antiveninbehandling:</u> Viper venom antiserum. Bør initieres for denne gruppen.</p> <p><u>Smertebehandling:</u> Antiveninet har i seg selv analgetisk effekt – se ellers anbefalinger for Gruppe B.</p> <p><u>Antibiotika:</u> Vurderes utfra klinisk behov. Svært påkjente hunder kan vurderes for profylaktisk behandling. Clindamycin 5-11 mg/kg iv q12h ved fortrinnsvis lokal/dermatologisk indikasjon, Ampicillin 25 mg/kg iv q6-8h ved systemisk indikasjon/profylakse. Ellers i henhold til dyrkning med resistensbestemmelse. Behandling sår/hudforandringer i henhold til behov.</p> <p><u>Overvåkning:</u> Samme som for gruppe B</p> <p><u>Videre oppfølging:</u> Samme som for gruppe B</p>

Formål

Det overordnede målet med oppgaven var å kartlegge nyreskade etter 24 timer og 14 dager hos hunder bitt av huggorm ved hjelp av biomarkørene serum kreatinin, uALP, uGGT og uCRP. Resultatene kan gi informasjon om lokalisasjon av skaden i nefronet, og demonstrere forskjeller mellom hvor gode de undersøkte biomarkørene vil være i denne settingen.

Materiale og metoder

Materiale

Beskrivelse av kasusgruppen

Denne studien inkluderte 34 hunder som var bitt av *Vipera berus* og som ble tatt inn til behandling ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet smådyrklirikken (NMBU), Anicura Oslo Dyresykehus, Jeløya Dyreklirik og Evidensia Oslo Dyresykehus i perioden april til september i 2018. Hundene var av ulike raser, alder og kjønn. For detaljert informasjon om pasientgruppen, se Tabell 4 og 5.

Inklusjonskriteriene for å bli med i studien var at eier hadde sett at hunden ble bitt av huggorm eller at pasienten hadde tydelige kliniske tegn som indikerte huggorbitt, som bittmerker, lokal hevelse på bittsted og systemiske tegn. Kun hunder over 5 kg ble inkludert i studien.

Eksklusjonskriteriene var at hundene hadde eksisterende sykdommer eller at de gikk på langtidsbehandling med medisiner som var av betydning for studien, basert på opptak av anamnese og klinisk undersøkelse. For eksempel ved tidligere mistanke om eller allerede diagnostisert nyresykdom. I tillegg kunne ikke huggorbittet være mer enn 24 timer gammelt eller være av typen tørrbitt hvor det ikke ble overført gift. Dersom hundene ikke viste tegn til hevelse eller systemisk effekt av bittet innen 12 timer ble de ekskludert fra studien.

Tabell 4 Fordeling av vekt, alder og kjønn i kasusgruppen og kontrollgruppen

VARIABEL	KASUSGRUPPE	KONTROLLGRUPPE
Vekt	Median: 20,3 kg (range 5,5 – 46,5 kg)	Medianen: 23,2 kg (range 5,2 – 50 kg)
Alder	Median: 3,75 år (range 7 mnd – 18,5 år)	Medianen: 6 år (range 7 mnd – 13 år)
Kjønn	Tisper: 21 stk Hannhund: 13 stk	Tisper: 24 stk Hannhund: 16 stk

Tabell 5 Rasfordelingen i kasusgruppen

HUNDERASE	ANTALL
Akita	1
Australsk kelpie	1
Bichon frisé	1
Blandingsrase	4
Border collie	1
Boston terrier	1
Cavalier king charles spaniel	1
Cocker spaniel	8
Engelsk setter	1
Finsk lapphund	2
Flat coated retriever	1
Gordon setter	1
Kleiner munsterländer	2
Labrador retriever	1
Mallinois	1
Miniatyr schnauzer	1
Nova scotia duck tolling retriever	1
Puddel	1
Samojed	1
Shetland sheepdog	1
Staffordshire bull terrier	1
Toy puddel	1

Innsamling av data

Det ble samlet inn 10 ml skålorin av alle hundene 24 timer (T1) og 14 dager (T2) etter huggorbitt. Før innsamling av urinprøver ble vulva og forhud vasket med rengjøringswipes (CLX Wipes, ICF; Cremona, Italia). Spesifikk vekt og urinstix inngikk i urinanalysen og det ble i tillegg laget et tørr- og et våtpreparat av urinsedimentet. Urinsedimentet ble vurdert både makroskopisk og mikroskopisk. Urinen ble sentrifugert i 10 min ved 450 G og supernatanten ble fryst ved -80 C° i 1 ml beholdere. De fryste urinprøvene ble overlevert til Sentrallaboratoriet ved NMBU i Oslo hvor de ble analysert for innhold av GGT, ALP, CRP og kreatinin. Det ble i tillegg tatt ut blod fra v. jugularis med en butterfly kanyle, og serum ble sendt til Idexx (Idexx Laboratories, Inc., Westbrook, Maine 04092) og analysert for kreatinin.

Kontrollhunder

Kontrollgruppen bestod av 40 hunder av ulike raser, alder og kjønn. Hundene fordelte seg på 24 tisper og 16 hannhunder. De var mellom 7 måneder og 13 år gamle og veide mellom 5,2-50 kg. Gruppen var stratifisert med hensyn på alder og vekt slik at den skulle være så lik populasjonen av hunder i kasusgruppen som mulig. Se Tabell 4 og 6 for detaljert informasjon om rase, alder, vekt og kjønnsfordeling i denne gruppen. For å kunne brukes som kontroll måtte hundene være klinisk friske og ikke ha kjente kroniske sykdommer eller nylig vært inne på klinikk for behandling av sykdom. Hundene i denne gruppen skulle heller ikke være bitt av huggorm tidligere. Dersom hundene gikk på faste medisiner ble de ekskludert fra gruppen.

I perioden januar til april i 2019 ble det samlet inn prøver av alle hundene i kontrollgruppen. Det ble gjort en klinisk undersøkelse og det ble innhentet relevant informasjon om alle pasientene som inkluderte både signalement og en grundig anamnese. På samme måte som for kasusgruppen ble det samlet inn urinprøver av alle hundene. Fra kontrollene ble det kun

samlet urinprøver på et tidspunkt. I tillegg ble det tatt ut blodprøver for å forsikre om at alle hundene var klinisk friske. Blodprøvene ble tatt fra jugularvenen med en butterfly-kanyle og sendt inn til Sentrallaboratoriet for hematologisk og biokjemisk analyse, i tillegg til analyse for CRP. I den biokjemiske analysen av blodprøvene inngikk vurdering av ALT, AST, ALP, CK, AMY, LIP, TP, ALB, GLOB, UREA, Creat, BA, Chol, Gluc, Phos, Ca, Na, K, Na:K og Cl. Dersom hundene hadde avvik på blodprøvene (utenfor laboratoriets referanseområder) ble de ekskludert fra gruppen.

Tabell 6 Rasefordelingen i kontrollgruppen

HUNDERASE	ANTALL
Blandingsrase	5
Bodeguero	1
Border terrier	1
Boxer	1
Briard	1
Cavalier king charles spaniel	2
Cocker spaniel	3
Dansk-svensk gårdshund	1
Dvergpinscher	1
Engelsk setter	2
Etnahund	1
Golden retriever	4
Greyhound	1
Irsk setter	1
Irsk ulvhund	1
Japansk spisshund	1
Kleiner munsterländer	1
Labrador	4
Pointer	3
Puddel	2
Saluki	1
Staffordshire bull terrier	1
Shetland sheepdog	1

Metoder

Urinalyse

Urinkonsentrasjonen av GGT, ALP, CRP og kreatinin ble bestemt ved å bruke analyseinstrumentet Advia®1800. Reagenser fra Siemens Medical Solutions Diagnostics ble brukt til analyser for GGT, ALP og kreatinin. For CRP ble reagens fra Randox benyttet.

Modifisert International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) metode ble brukt for å analysere innholdet av GGT og ALP. Alkalisk fosfatase hydrolyserer et substrat, PNPP som danner p-nitrophenol. Hastigheten for dannelsen av p-nitrophenol måles kolorimetrisk ved 410 nm og er proporsjonal med aktiviteten til alkalisk fosfatase (28). GGT-konsentrasjonen ble målt ved hjelp av et kinetisk assay hvor GGT omdanner et syntetisk substrat. Hastighet produktet dannes i måles fotometrisk (29). For å analysere innholdet av CRP ble det brukt en immunoturbidimetrisk metode. Prøven reagerer med et spesifikt antiserum og det dannes et bunnfall som bestemmes turbidimetrisk ved 340 nm. Ved å lage en standardkurve ut fra absorbansen kan konsentrasjonen i prøven bestemmes (30). Kreatinin ble analysert ved å bruke kinetisk Jaffe-metode. Metoden går ut på at kreatinin reagerer med alkalisk pikrat og det dannes et farget kompleks. Hastigheten på kompleksdannelsen måles ved 505 nm og er proporsjonal med kreatininkonsentrasjonen i prøven (31).

Serumanalyse

For analyse av kreatinin i serum ble det brukt samme analyseprinsipp som for analyse av kreatinin i urin (Jaffe-metoden).

Statistiske metoder

Datamaterialet ble analysert ved å bruke JMP Statistical Discovery fra SAS (dataanalyse software for MAC og Windows).

Det ble laget en kreatinin-ratio for urinmarkørene for å forhindre at resultatene skulle påvirkes av konsentrasjonsgraden av urinen. Variablene uALP:kreatinin, uGGT:kreatinin og uCRP:kreatinin og serum kreatinin ble vurdert visuelt i JMP for å undersøke om de var normalfordelte. Histogrammene for de ulike urinmarkørene viste en tydelig høyreforskyvning. I tillegg ble gjennomsnitt og median vurdert mot hverandre. Basert på denne informasjonen kunne vi se at urinmakørene ikke var normalfordelte. For serum kreatinin kunne man se en normalfordeling. Dataene ble forsøkt transformert for å oppnå en normalfordeling ved å transformere verdiene. Dette var kun mulig for CRP:kreatinin ved hjelp av log-transformasjon. Dermed kunne vi bruke parametriske tester for uCRP:kreatinin og serum kreatinin-verdiene, men ikke for ALP og GGT-verdiene. For ALP og GGT brukte vi ikke-parametriske tester.

Det var 21 hunder vi hadde prøver fra både 24 timer (T1) og 14 dager (T2) etter huggorbitt. For å sammenligne konsentrasjonen av markørene og undersøke om det var en forskjell ved disse to tidspunktene ble det utført en wilcoxon signed rank test (uALP:kreatinin og uGGT:kreatinin) og en paired t-test (log₁₀ uCRP:kreatinin og serum kreatinin).

For å sammenligne konsentrasjonen av markørene hos kasusene sammenlignet med konsentrasjonen hos kontrollgruppen ble det brukt en ikke – parametrisk «steel method» (uALP:kreatinin og uGGT:kreatinin) og en parametrisk dunnetts method (log₁₀

uCRP:kreatinin og serum kreatinin) hvor kontrollgruppen ble testet opp mot hver av tidspunktene (T1 og T2). En P-verdi på $P < 0,05$ ble vurdert som signifikant.

Resultater

Konsentrasjon av markørene ALP, GGT og CRP i urinen hos hunder bitt av huggorm sammenlignet med kontrollgruppen

Median og range for variablene er angitt i Tabell 7. uALP:kreatinin ratioen hos hunder bitt av huggorm var signifikant høyere (P-verdi $<0,05$) både 24 timer og 14 dager etter bitt sammenlignet med hundene i kontrollgruppen. Det var høyest signifikans 24 t etter bitt hvor P-verdien var 0.0008, sammenlignet med en P-verdi på 0.03 ved 14 dager etter bitt. Funnene er illustrert i Figur 1.

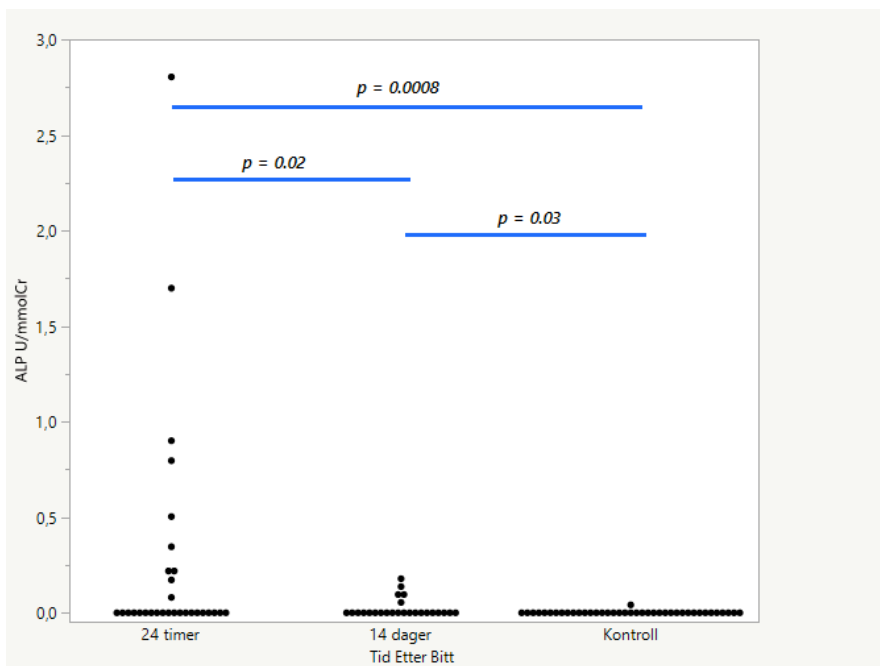
Median for uGGT:kreatinin ratio var 2,8 for hunder bitt av huggorm U/mmolCr (range 0 – 9,68 U/mmolCr) sammenlignet med kontrollhundene som hadde median 1,8 U/mmolCr (range 0,11-17,6 U/mmolCr). For uCRP:kreatinin ratio var medianen 2,6 U/mmolCr (range 0,95 – 6,53) for hunder bitt av huggorm, sammenlignet med kontrollhundene som hadde en median på 2,4 U/mmolCr (range 0,83 – 3,98 U/mmolCr).

For uGGT:kreatinin og uCRP:kreatinin ratio var det ingen signifikant forskjell mellom hunder bitt av huggorm sammenlignet med hunder i kontrollgruppen, hverken 24 t etter bitt eller 14 dager etter. Fordelingen er vist i Figur 2 og 3.

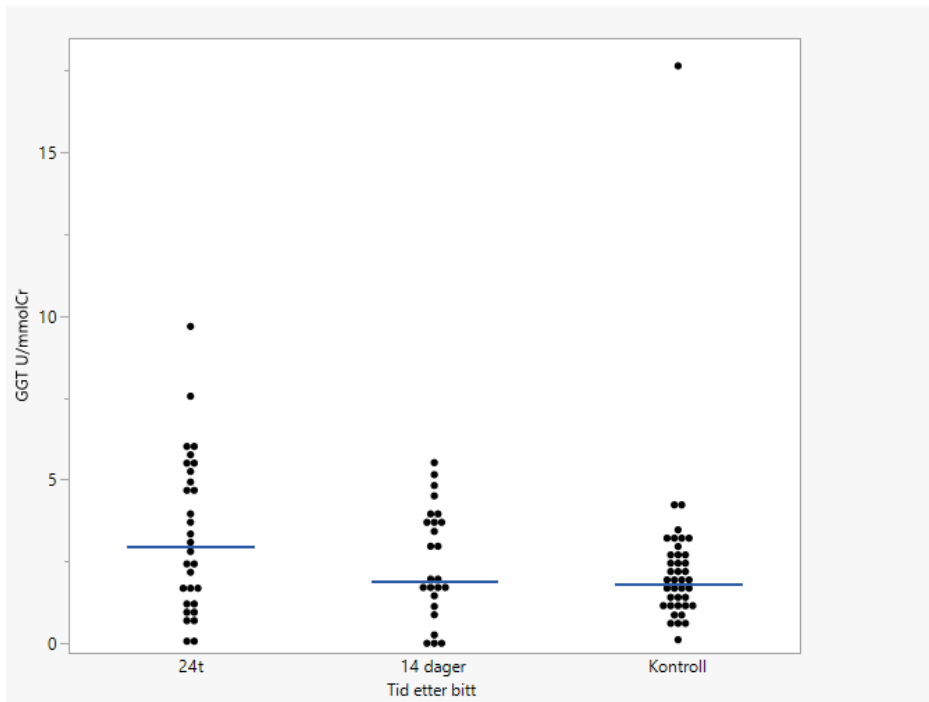
Konsentrasjon av markørene ALP, GGT og CRP 24 timer (T1) vs. 14 dager (T2) etter huggorbitt

Median og range for variablene er angitt i Tabell 7. Det var en signifikant forskjell i ALP:kreatinin ratioen ved de to tidspunktene T1 og T2 hos hunder bitt av huggorm, med en P-verdi = 0.02. Konsentrasjonen var høyest 24 t etter bitt (T1). Fordelingen er illustrert i Figur 1. For uGGT:kreatinin og uCRP:kreatinin ratio var det ingen signifikant forskjell ved de to tidspunktene. Se Figur 2 og 3 for oversikt.

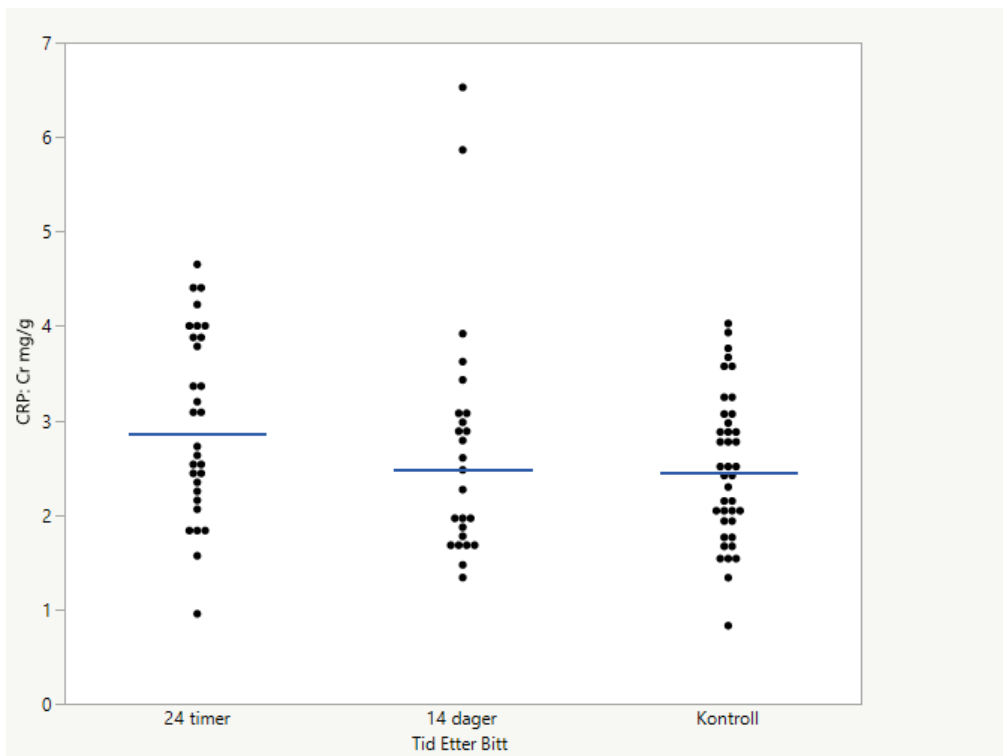
Figur 1 uALP:kreatinin hos hunder bitt av huggorm (24 timer og 14 dager etter bitt) og friske kontrollhunder



Figur 2 uGGT:kreatinin hos hunder bitt av huggorm (24 timer og 14 dager etter bitt) og friske kontrollhunder



Figur 3 uCRP:kreatinin hos hunder bitt av huggorm (24 timer og 14 dager etter bitt) og friske kontrollhunder



Tabell 7 Biomarkørens konsentrasjon hos hunder bitt av huggorm og kontrollgruppen

	ALP U/mmol/kreatinin	GGT U/mmo/kreatinin	CRP:kreatinin mg/g
24 timer etter bitt	Median 0 (range 0 – 2,8)	Median 2,9 (range 0 – 96)	Median 2,85 (range 0,95 – 4,65)
14 dager etter bitt	Median 0 (range 0-0,16)	Median 1,9 (range 0-5,5)	Median 2,4 (range 1,33-6,5)
Kontroll	Median 0 (range 0-0,04)	Median 1,8 (range 0,1-17,6)	Median 2,4 (range 0,8-3,98)

Serum kreatinin hos hunder bitt av huggorm

Ingen av hundene bitt av huggorm hadde serum kreatinin over øvre referanseverdi 132,6 $\mu\text{mol/l}$ på blodprøver 24 t etter bitt (T1) eller 14 dager etter bitt (T2). For kasusgruppen var gjennomsnittet serum kreatinin 66.3 $\mu\text{mol/l}$ (standardavvik +/-11.5, range 44.2-88.4 $\mu\text{mol/l}$) 24 timer etter bitt. Etter 14 dager var gjennomsnittsverdien i den samme gruppen 83.9 $\mu\text{mol/l}$ (standardavvik +/- 19.5, range 53.0-123.7 $\mu\text{mol/l}$).

De samme prøvene ble også foretatt hos gruppen kontrollhunder (mean 89.3 $\mu\text{mol/l}$ standardavvik +/- 0.23, range 44.2-150.28 $\mu\text{mol/l}$). Av disse var det en hund med serum kreatinin på 150.3 $\mu\text{mol/l}$, alle de andre hadde verdier innenfor referanseintervallet. Serum kreatinin var signifikant lavere 24 timer etter bitt sammenlignet med både 14 dager etter bitt ($p < 0.0001$) og kontrollgruppen ($p = 0.0002$).

Diskusjon

Vi har sammenlignet mengden av biomarkørene ALP, GGT og CRP i urinen fra hunder bitt av huggorm ved gitte tidspunkter opp mot en kontrollgruppe bestående av et utvalg friske hunder. Funn av forhøyede konsentrasjoner av GGT og ALP i urinen er angitt å være et tegn på tubulær nyreskade og forhøyede konsentrasjoner av CRP vil kunne påvises ved en glomerulær skade. Før prøveuttak ble alle hundene på forhånd rengjort med våtservietter i ytre kjønnsorganer. Dette ble gjort for å redusere risikoen for kontaminering av prøven. Urinen ble sentrifugert for å fjerne celler og debris som kunne tenkes å interferere med analysene vi gjorde.

ALP-konsentrasjonen viser etter våre studier en signifikant forskjell mellom hunder bitt av huggorm sammenlignet med kontrollhundene. Den forhøyede ALP-verdi i urinen hos disse hundene kan være indikasjon på at det har skjedd en skade i epitelceller i proksimale tubuli og at dette er årsaken til de økte verdiene. Dette er et interessant funn sett i sammenheng med serum kreatinin målt hos de samme hundene. Det var ingen forøkte verdier over referanseverdien av serum kreatinin hos hunder bitt av huggorm. Dette kan støtte opp under vår teori om at bruk av biomarkører i urin kan være nyttig for å oppdage mildere nyreskader enn de tradisjonelle metodene (e.g serum kreatinin), som først vil medføre økning over referanse intervallet ved 75% funksjonstap i nyrene. Vi ser også av våre resultater at ALP fortsatt er forøket etter 14 dager i kasusgruppen sammenlignet med kontrollgruppen. Dette forteller oss at selv etter 14 dager er skaden i nyrene fortsatt tilstede i stor nok grad til at vi finner markøren i urinen. Det er derimot en nedgang sammenlignet med prøvene tatt etter 24 timer, noe som peker på at kan ha skjedd en forbedring av skaden. Sammenhengen mellom økte verdier av ALP og nyreskade velger vi likevel å tolke med forsiktighet på grunn av at utvalget i studien var liten.

En annen interessant observasjon når det gjelder serum kreatinin-konsentrasjonen hos hundene bitt av huggorm, var at selv om verdiene ligger under referanseverdi så hadde verdien steget etter 14 dager sammenlignet med prøvene tatt etter 24 timer. Årsaken til at det var lavere ved 24 timer var trolig at hundene har fått væskebehandling som en del av behandlingen. Det har de derimot ikke gjort når prøvene ble tatt etter 14 dager, og verdiene er da høyere og mer lik verdiene som kontrollhundene hadde, som heller ikke hadde fått noen væskebehandling.

Av hundene i kontrollgruppen var det én av hundene med verdier over referanseintervallene for serum kreatinin. Denne hunden var svært muskuløs og urinen hadde en spesifikk vekt > 1.030. Dette betyr at urinen var godt konsentrert, og vi konkluderer med at det her var snakk om en prerenal azotemi. På bakgrunn av dette ville vi ikke ekskludere hunden fra studien og beholdt den i kontrollgruppen. En annen hund i kontrollgruppen ble ekskludert fra studien fordi den fikk en langvarig behandling med «non steroidal anti-inflammatory drugs» (NSAIDs) (Onsior, robenacoxib) grunnet stivhet i kroppen. Bakgrunnen for at vi tok denne hunden ut av studien er at NSAIDs har en potensiell risiko for nyretoksisitet ved at de hemmer utskillelse av prostaglandiner. Lokalt produserte prostaglandiner er viktig for å opprettholde sirkulasjonen i glomerulus.

Biomarkørene GGT og CRP viste ingen signifikant økt konsentrasjon i urinen hos hunder bitt av huggorm sammenlignet med kontrollgruppen bestående av friske hunder i denne studien. Det kan være flere årsaker til at dette var resultatet av vår studie. En mulig årsak er selvfølgelig at det faktisk ikke er en sammenheng mellom økte konsentrasjoner av disse markørene og påvirkningen huggormgiften har på nyrene hos hund. En annen mulig

forklaring er at populasjonen vår er for liten for å kunne konkludere. Vi har ikke verdier ved T1 (24 t etter bitt) og T2 (14 d etter bitt) for alle hunder i studien, slik at utvalget blir mindre. Til sammenligning finnes det andre studier som har undersøkt denne sammenhengen, hvor resultatene viser en signifikant forskjell i konsentrasjonen av også disse biomarkørene i de to ulike gruppene av hunder. Et eksempel er Palvainen, 2013 (1) som fant en signifikant økt konsentrasjon av ALP og GGT i urin fra hunder bitt av huggorm og konkluderte med at giften har skadelige effekt på nyrene. I den studien, som i vår studie, brukes en kreatinin ratio for å veie opp for ulik urinkonsentrasjon. Men, det som skiller den klart fra vår studie er at Palvainen har tatt prøvene fra sine hunder på vilkårlige tidspunkter etter bitt. Dette i motsetning til det vi har gjort, hvor vi har standardiserte tidspunkt for prøvetaking, henholdsvis 24 t og 14 dager etter bitt. Dette kan tenkes å ha noe å si for resultatene og kan være årsaken til at vi ikke ser den samme økningen av GGT, slik som vi gjør for ALP.

En annen studie av Hrovat (16) fant signifikant forøkte verdier av albumin, immunoglobulin G, C-reaktivt protein og retinol bindende protein (uAlb, uCRP, uIgG og uRBP) i urinen hos hunder etter slangebitt sammenlignet med en kontrollgruppe. Denne studien benyttet flere andre biomarkører enn vi har brukt i vår studie, foruten CRP som var den samme. Likevel var resultatet for CRP avvikende fra det vi fant hos våre hunder bitt av huggorm. Disse hundene viste en signifikant forhøyet CRP-konsentrasjon i urinen 24 timer etter bitt, sammenlignet med hunder i kontrollgruppen. Ved ankomst til klinikk var ikke CRP forhøyet hos de samme hundene. Dette er en interessant forskjell fra våre resultater. Sammenlignet med vår studie hadde denne studien en populasjon på totalt 19 hunder med slangebitt, og en kontrollgruppe bestående av 10 klinisk friske hunder. De to gruppene av hunder samsvarer godt i raser, alder, kjønn og vekt. Dette gjorde også de to gruppene av hunder i vår studie, og kan derfor ikke forklare forskjellen i resultatene. I denne studien ble derimot urinprøvene tatt via cystocentese

hos flertallet av hunder, eller via steril kateterisering. I vår studie ble urinprøvene tatt via skålurin. Den mest sannsynlige årsaken til forskjeller i resultatene våre fra denne studien, er nok allikevel at hundene i Hrovat-studien er bitt av andre slanger enn våre hunder. Det er dermed tenkelig at slangene som har bitt hundene i denne studien, har ulike bestanddeler i giften som kan gi andre utslag enn hva vi har sett etter bitt fra huggormen.

I vår studie var det en signifikant høyere konsentrasjon av ALP ved tidspunkt T1 sammenlignet med T2 hos hunder bitt av huggorm. Det var altså en høyere konsentrasjon 24 timer etter bitt sammenlignet med 14 dager etter bitt. For GGT og CRP ser vi ikke den samme forskjellen ved de to tidspunktene. Disse resultatene må tolkes med forsiktighet, da vi kun hadde parede data for 21 hunder. Vi hadde ikke prøver ved både T1 og T2 for alle 34 hundene i studien. Dette kan ha noe å si for resultatene. Det ville helt klart vært interessant dersom vi i vår studie kunne målt og sammenlignet flere markører enn de vi hadde.

Vi ser i resultatene våre at én av hundene i kontrollgruppen avviker fra de andre i GGT-konsentrasjonen. Denne hunden var en Golden Retriever intakt hannhund på 6 år. Han hadde ingen avvik ved klinisk undersøkelse, ingen kjent sykdomshistorie og heller ingen avvik på blodprøver. Urinprøven hans viste et bilde med forhøyede antall nøytrofile. Denne pyurien hadde ingen klinisk betydning. Det ble diskutert om han skulle tas ut av studien eller ikke, men vi vurderte dette som tilfeldige funn hos en klinisk frisk hund. En mulig årsak til pyurien kan ha vært så enkelt som at denne har fått en dårlig vask før urinprøvetaking, som dermed slår ut som en pyuri på resultatene. Litteratursøk gav ingen resultater på om pyuri kan påvirke eller forårsake en forhøyet konsentrasjon av GGT og derfor vet vi ikke om det økte antallet nøytrofile granulocytter potensielt kunne interferere med analysen og føre til økt GGT. Det ble også dobbeltsjekket ved Sentrallaboratoriet at ikke det var en analysefeil som ga dette

svaret. Prøvene ble derfor analysert på nytt, men med samme resultat. På bakgrunn av dette, klinisk undersøkelse og øvrige blodprøver ble han beholdt i kontrollgruppen. Andre hunder ble derimot ekskludert fra kontrollgruppen på bakgrunn av at de ikke oppfylte inklusjonskriteriene, eller på grunn av noen av våre eksklusjonskriterier. På grunn av at blodprøvesvarene ikke var tilgjengelig med en gang, måtte de ekskluderes på et senere tidspunkt. Denne ekskluderingen av noen få hunder førte til at kontrollgruppen fikk en høyere snittalder sammenlignet med kasusgruppen vår til tross for at kontrollgruppen opprinnelig var stratifisert. Median for kasusgruppen var 3 år og 9 måneder, imens den var 6 år for kontrollgruppen. Denne forskjellen ville vi sannsynligvis ikke fått dersom hundene med avvikende blodprøver hadde blitt ekskludert fortløpende istedenfor i etterkant. Etter hundene var ekskludert ble det ikke tid til å finne nye erstatninger som passet med tanke på alder og vekt. Dette var ikke mulig både på grunn av tid og fordi vi kun hadde søkt og fått godkjent bruk av 40 hunder i oppgaven.

Som en avsluttende kommentar vil vi si at det ville vært en fordel om vår studie inneholdt flere kasus og at vi hadde alle verdier for alle tidspunkter hos alle hundene.

Konklusjon

Våre undersøkelser viste en signifikant forskjell i uALP:kreatinin ratio i urin hos hunder bitt av huggorm sammenlignet med kontrollgruppen vår. Undersøkelsene viste også at konsentrasjonen var høyere etter 24 timer sammenlignet med prøvene tatt etter 14 dager. Ut i fra det vi vet om tilstedeværelsen av ALP i urinen hos friske individer kan vi med stor sannsynlighet konkludere med at det har skjedd en skade på nyrene, nærmere bestemt en epitelskade i nefronets proksimale tubuli. ALP ser ut til å kunne være en god markør for å oppdage milde nyreskader hos hunder bitt av huggorm. De samme resultatene har vi ikke for CRP eller GGT. Her kunne vi ikke bevise en signifikant forskjell i uCRP:kreatinin og uGGT:kreatinin ratio mellom hunder bitt av huggorm og friske kontrollhunder.

Takk til bidragsytere

Tusen takk til våre fantastisk hjelpsomme veiledere for alle gode råd og oppfølging underveis i skriveprosessen. Vi vil også takke Sentrallaboratoriet for hjelp med analyser av prøvemateriell, en spesiell takk til Stein Istre Thoresen for svar på alle spørsmål rundt dette. En stor takk til alle hundeeiere og deres hunder som har bidratt med materiale til studien. Til slutt rettes en stor takk til venner og familie for tålmodighet, støtte og oppmuntrende ord underveis.

Summary

Title: Kidney Injury in Dogs bitten by The European Adder – Urinary Biomarkers

Authors: Lise Myhre og Rikke Eveline Sundhagen

Supervisor: Hannah Harjén, Department of Companion Animal Clinical Sciences and Runa Rørtveit, Department of Preclinical Sciences and Pathology.

The European Adder (*Vipera berus*) is the only poisonous snake in Scandinavia. In Norway, most dogs are bitten by the adder during the period April – October. Adder venom contains various components that might have a toxic effect on the kidneys.

The purpose of this assignment was to describe kidney injury in dogs 24 hours and 14 days after being bitten by the European Adder using the biomarkers uALP, uGGT and uCRP. The presence of these biomarkers in urine might indicate a kidney injury. Urine samples from 34 dogs bitten by the European Adder in the eastern part of Norway were collected and compared to a group of 40 clinically healthy dogs. Samples from both groups was analysed for the presence of ALP, GGT and CRP.

The results showed a significantly higher uALP:creatinine ratio in dogs bitten by the European Adder compared to dogs in the control group. This might indicate an injury to the epithelial cells of the proximal tubules, which could lead to leakage of these enzymes into the urine. Analyses showed a higher uALP:creatinine ratio 24 hours after bite, compared to samples taken 14 days after bite. There was no significant difference in urine CRP:creatinine or GGT:creatinine ratios in dogs bitten by European Adder compared to dogs in the control group.

Referanser

1. Palviainen M, Raekallio M, Vainionpää M, Lahtinen H, Vainio O. Evaluation of renal impairment in dogs after envenomation by the common European adder (*Vipera berus berus*). *The Veterinary Journal*. 2013;198(3):723-4.
2. Aschehoug og Gyldendals store norske leksikon. 7 : Helm-Is 1997 [Available from: <https://www.nb.no/items/230f7492de87cc594cac7f4d52eafdf9?searchText=huggorm> [leksikon](#)].
3. LE K. Huggormsbett hos hund och katt. *Sven Vet Tidn* 1989.
4. Bocian A, Urbanik M, Hus K, Łyskowski A, Petrilla V, Andrejčáková Z, et al. Proteome and peptidome of *Vipera berus berus* venom. *Molecules*. 2016;21(10):1398.
5. Palviainen M, Raekallio M, Vainionpää M, Kosonen S, Vainio O. Proteomic profiling of dog urine after European adder (*Vipera berus berus*) envenomation by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Toxicon*. 2012;60(7):1228-34.
6. Brandal K, Østrem F. Huggormbitt hos hund i Norge. En retrospektiv studie over huggormbitt hos hund i Norge. Oslo: Norges veterinærhøgskole; 2000.
7. Sutton N, Bates N, Campbell A. Canine adder bites in the UK: a retrospective study of cases reported to the Veterinary Poisons Information Service. *Veterinary Record*. 2011;169(23):607-.
8. Vestberg AR, Tidholm A, Ljungvall I. Twenty-four-hour ambulatory electrocardiography characterization of heart rhythm in *Vipera berus*-envenomed dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2017;59(1):28.
9. Brandal K, Østrem F. Hoggormbitt hos hund i norge: en retrospektiv studie over hoggormbitt hos hund i norge. 2000.

10. Couto RWNaCG. Small Animal Internal Medicine. 3rd edition ed: Mosby; 2003. 1362 p. 650, 579-580
11. Dennis J. Chew DSPD. Interpretation of Canine and Feline Urineanalysis1981.
12. Lervik JB, Lilliehöök I, Frenthin JH. Clinical and biochemical changes in 53 Swedish dogs bitten by the European adder-*Vipera berus*. Acta Veterinaria Scandinavica. 2010;52(1):26.
13. Sitprija V. Snakebite nephropathy. Nephrology. 2006;11(5):442-8.
14. Os I. Glomerulær filtrasjon 2019 [Available from: https://sml.snl.no/glomerul%C3%A6r_filtrasjon].
15. Case LP, Daristotle L, Hayek MG, Raasch MF. Canine and Feline Nutrition-E-Book: A Resource for Companion Animal Professionals: Elsevier Health Sciences; 2010.
16. Hrovat A, Schoeman JP, de Laat B, Meyer E, Smets P, Goddard A, et al. Evaluation of snake envenomation-induced renal dysfunction in dogs using early urinary biomarkers of nephrotoxicity. The Veterinary Journal. 2013;198(1):239-44.
17. D'amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. Kidney international. 2003;63(3):809-25.
18. Hokamp JA, Nabity MB. Renal biomarkers in domestic species. Veterinary clinical pathology. 2016;45(1):28-56.
19. De Loor J, Daminet S, Smets P, Maddens B, Meyer E. Urinary biomarkers for acute kidney injury in dogs. Journal of veterinary internal medicine. 2013;27(5):998-1010.
20. Ristic EVaJ. BSAVA Manual og Canine and Feline Clinical Pathology: British Small Animal Veterinary Association; 2016. 614 p. 194, 227-228
21. Harley L, Langston C. Proteinuria in dogs and cats. The Canadian veterinary journal. 2012;53(6):631.

22. Segev G. Differentiation between Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease (2018) Koret School of Veterinary Medicine: Hebrew University of Jerusalem, Israel; 2018 [Available from: http://www.iris-kidney.com/education/differentiation_acute_kidney_injury_chronic_kidney_disease.html.
23. Cowgil L. Grading of Acute Kidney Injury (2016): University of California; 2016 [Available from: http://www.iris-kidney.com/pdf/4_idc-revised-grading-of-acute-kidney-injury.pdf.
24. Lippi I, Perondi F, Meucci V, Bruno B, Gazzano V, Guidi G. Clinical utility of urine kidney injury molecule-1 (KIM-1) and gamma-glutamyl transferase (GGT) in the diagnosis of canine acute kidney injury. *Veterinary research communications*. 2018;42(2):95-100.
25. Clemons FA. Urinary enzyme evaluation of nephrotoxicity in the dog. *Toxicologic pathology*. 1998;26(1):29-32.
26. Kovarikova S. Urinary biomarkers of renal function in dogs and cats: a review. *Veterinarni Medicina*. 2015;60(11).
27. Lund HS, Kristiansen V. Protokoll for behandling av huggorbitt. 2017.
28. NW T. Progress in the Development of a recommended method for alkaline phosphatase activity measurement. 1980.
29. Shaw LM, Strømme JH, Loudon JL, Theodosen L. IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. Part 4 IFCC Method for Gamma-Glutamyltransferase. *J Clin Chem Biochem*. 1983;21:633-46.
30. M. K-H, A.L. J, A.T. K. Evaluation of commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Veterinary Clinical Pathology*. 2003;32:81-7.
31. Jaffe M. Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine Reaction des Kreatinins. *Zeitschrift Für Physiologische Chemie* 1886;10:391-400.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no