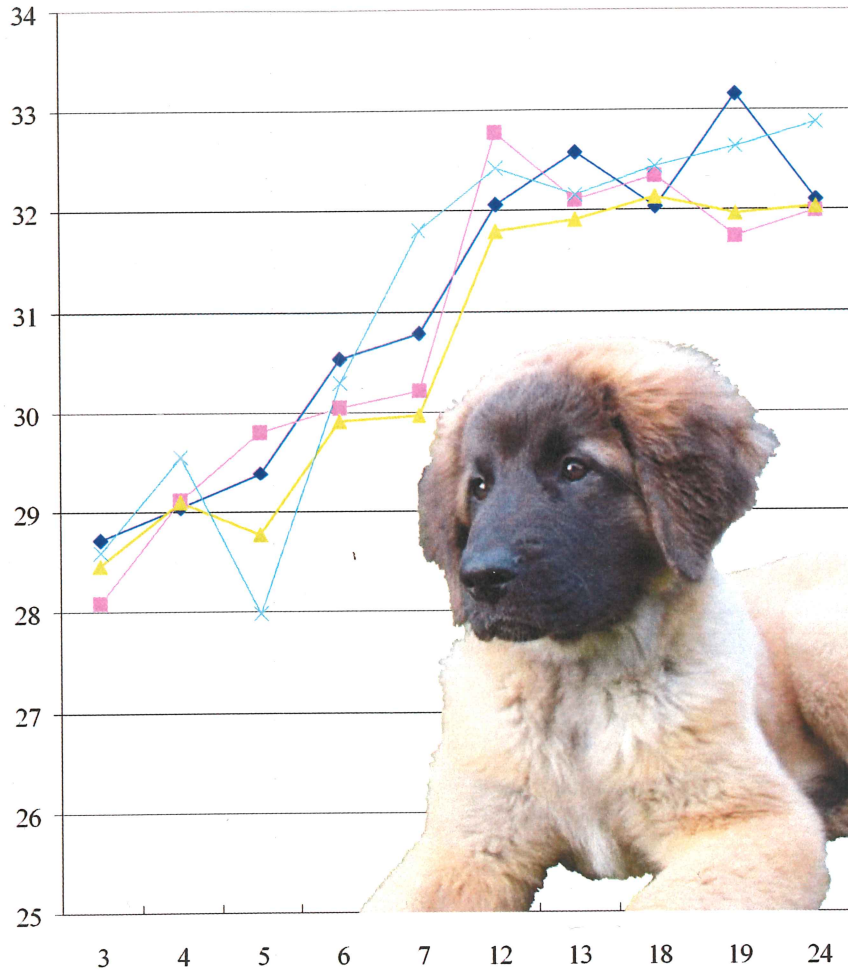


Reidun Heiene

Hilde Andgard, Hildigunnur Georgsdóttir & Margrete Inderberg

KLINISK-KJEMISKE OG HEMATOLOGISKE VERDIER FOR STORE HUNDERASER I VEKST



Fordypningsoppgave ved Institutt for Sports- og familiedyrmedisin, NVH, Vår 2005

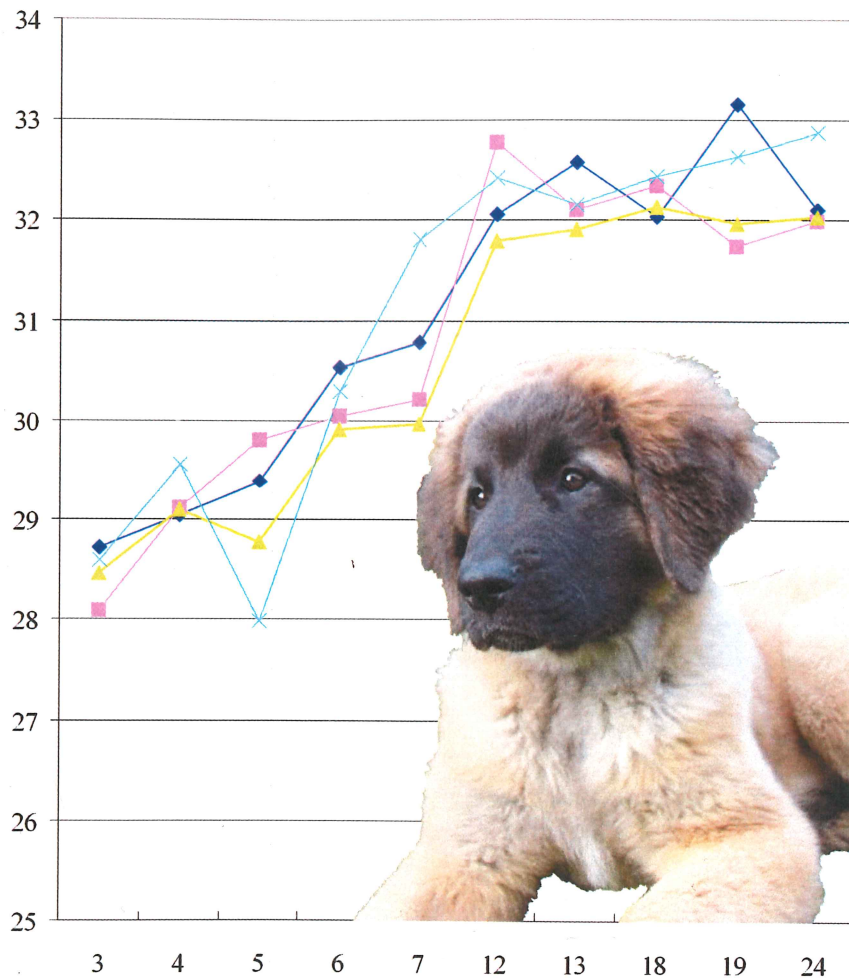
Veiledere: Stein Istre Thoresen & Reidun Heiene



Reidun Heiene

Hilde Andgard, Hildigunnur Georgsdóttir & Margrete Inderberg

KLINISK-KJEMISKE OG HEMATOLOGISKE VERDIER FOR STORE HUNDERASER I VEKST



Fordypningsoppgave ved Institutt for Sports- og familiedyrmedisin, NVH, Vår 2005

Veiledere: Stein Istre Thoresen & Reidun Heiene



Innholdsfortegnelse	Side
INNLEDNING	2
HVA ER REFERANSEVERDIER?	4
HVORDAN ETABLERES REFERANSEVERDIER?	6
MATERIALE OG METODEBESKRIVELSE	8
RESULTATER	11
Resultater serum biokjemi	11
Resultater hematologi	19
DISKUSJON	25
OPPSUMMERING	31
SUMMARY	32
REFERANSER	33

INNLEDNING

Blodprøvetaking og vurdering av ulike analyseresultater opp mot gitte referanseverdier er en viktig del av klinikerens hverdag. Prøvesvarene vil i mange tilfeller gi et viktig bidrag for å danne seg et bilde av dyrets kliniske tilstand (diagnose) og videre utvikling (prognose). En forutsetning er imidlertid at resultatene tolkes riktig. Helt grunnleggende blir det å kunne avgjøre hvorvidt resultatene avviker fra det som forventes hos sammenlignbare friske individer. En avgjørende forutsetning for å vurdere et resultat som patologisk eller ikke, er derfor at det er tilgjengelig opplysninger om tilstanden i en referansepopulasjon for de aktuelle analysene (referanseverdier).

Ulike laboratorier kan operere med ulike referanseverdier, avhengig av populasjonen dataene er samlet inn fra, hvilke kriterier som er lagt til grunn for utvelgelsen og hvordan de innsamlede data er analysert. Ulike analysemetode vil kunne gi svært forskjellige resultater. Det finnes flere måter å estimere referanseverdier på, både manuelt og ved hjelp av ulike dataprogrammer, og det er gjerne størrelsen på de innsamlede data som avgjør hvilken metode som er mest hensiktsmessig. (1)

Pr dags dato finnes en rekke publikasjoner som angir referanseverdier i blod hos voksne hunder, men når det gjelder valper er materialet mindre. Så vidt vi vet, finnes det ingen større studier av referanseverdier hos valper. Det materialet som i dag er tilgjengelig baserer seg hovedsakelig på mindre studier av få dyr ($N \leq 50$) som i tillegg gjerne befinner seg på en forsøkstasjon. De fleste studiene begrenser seg også til rasen Beagle, som benyttes mye som forsøksdyrhund. Harper *et al* (2003) har beregnet referanseverdier for valper i ulike aldre som lever i hjemmemiljø, men også her er antall dyr som er med i studiet lite ($N=78$; 34 beagler og 44 labrador retrievere).

Jorunn Grøndalen samlet i forbindelse med sitt prosjekt (2) inn blodprøver fra i underkant av 600 valper av rasene newfoundlandshund, leonberger, irsk ulvehund og labrador retriever fra de var 3 til 24 måneder gamle, og det er disse prøvene vi har lagt til grunn for å estimere biokjemiske og hematologiske referanseverdier hos valper i alderen 3-6, 7-12 og 13-24 måneder gamle. Hensikten med denne oppgaven er å finne ut hvordan de ulike parametrene endres hos unge valper fram til de er utvokst. Ulike studier angir at forskjellene hovedsakelig skyldes faktorer relatert til vekst og utvikling av immunforsvaret, mens når det gjelder andre verdier har resultatene vært noe sprikende (3, 4, 5, 6, 7).

Formålet med denne studien er også å etablere referanseverdier for unge valper estimert ut fra norske forhold slik at klinikere i Norge har relevante referanseområder å forholde seg til når de skal vurdere verdier i blodet hos unge, ikke utvokste hunder.

HVA ER REFERANSEVERDIER?

Referanseverdier er de analyseresultater som er funnet ved undersøkelse av individene i en referansepopulasjon. Det er svært avgjørende hvordan individer selekteres til en referansepopulasjon. Individene i referansepopulasjonen må være sammenlignbare med den populasjonen det individet som mistenkes å ha et patologisk avvik kommer fra på alle andre områder enn det mistenkte patologiske avvik. Dette er årsaken til at et patologisk avvik hos en valp bør sammenlignes med andre valper som ikke har et slikt patologisk avvik. En uspesifikk referansepopulasjon (for eksempel "hunder i Norge") vil derfor som oftest innebære et videre referanseområde enn der referansepopulasjonen er snevrere definert (for eksempel "valper i Norge mellom 3 og 7 måneder"). Tilgangen til mer spesifikke referanseområder gjør det derfor mulig å detektere mindre patologiske avvik med tilstrekkelig stor sannsynlighet.

For hver analyse som utføres på individer i en populasjon vil resultatene vise en spredning og en fordeling. Fordelingen kan være normalfordelt, men oftest er den det ikke. Mange analyser vil ha en fordelingskurve med en "hale" ut mot høyere verdier, såkalt høyreskjev kurve.

Referanseområdene er vanligvis satt slik at nedre og øvre grense kutter ut henholdsvis de laveste og høyeste 2.5 % av verdiene. Generelt vil det si området mellom 2.5 og 97.5 percentilen. Ved normalfordelinger svarer dette omtrent til middelverdien pluss/minus to standard avvik. Det er verdt å merke seg at 5 % av referanseindividene på den måten har verdier utenfor referanseområdet.

For noen analyser har laboratoriet bare en øvre grense (f.eks. ASAT, ALAT,). Det betyr enten at nedre grense har liten eller ingen klinisk betydning og/eller at svært lave verdier for enkelte individer på ulike tidspunkter ikke kan beskrives som et patologisk avvik. For andre analyser har laboratoriet bare en nedre grense med tilsvarende begrunnelser. Referanseområdet vil i disse spesialtilfellene omfatte 97.5 % av verdiene i referansepopulasjonen.

HVORDAN ETABLERES REFERANSEVERDIER?

1) Innsamling av data:

- Gyldigheten for hvilket som helst referanseområde avhenger av kriteriene for utvelgelsen av individer, innsamling av data under definerte omstendigheter samt å ta analytiske variasjoner i betraktning når man lager referanseområder.

2) Innsamlede data deles inn i undergrupper:

- For å redusere variasjoner.
- Mindre variasjoner innen undergruppene gir oss smalere referanseområder som er mer sensitive for å detektere patologiske avvik.

3) Identifisere mulige datafeil.

4) Visuell vurdering av fordelingen:

- Sette opp histogram (søylediagram).
- Se etter "slengere". "Slengere" er resultat av få individer i akkurat den undergruppen som har unormalt høye eller lave verdier eller feilkilder ved prøvetaking/analysering.

5) Bestemme metode for å lage referanseverdier:

- Antall verdier man har som utgangspunkt vil være avgjørende for hvilken metode man velger.
- Usikkerheten øker når antall verdier går ned. Dette viser seg i store konfidensintervall.

- For å kunne si med sikkerhet at resultatene er signifikante, bør antall målinger for hver parameter være minst 120. Dette er imidlertid sjelden oppnåelig i veterinærmedisinen.

6) De vanligste metodene er:

→ Intuitiv vurdering

- I den vanlige klinikksituasjonen fungerer referanseverdiene som retningslinjer for en mer eller mindre intuitiv vurdering av hvilken informasjon en verdi gir.
- Ingen regler kan bli gitt for en intuitiv vurdering fordi en slik vurdering må sees i sammenheng med de aktuelle verdiene.

→ Ikke-parametrisk metode

- Hvis man er i tvil om materialet er normalfordelt bør man benytte denne metoden.
- Denne metoden er ikke avhengig av en bestemt type distribusjon og benytter seg ikke av estimerte distribusjonsparametre.

→ Parametrisk metode

- Fordelingen av verdiene må være i nærheten av " Gaussian fordelingen"
- Materialet testes etter bestemte prosedyrer. *Hypotesen går ut på at differansene mellom våre referanser og "Gaussian fordelingen" kun skyldes forandringer.*
- Forutsetningen for å kunne bruke denne metoden er at materialet er normalfordelt (1).

MATERIALE OG METODEBESKRIVELSE

Materialet består av blodprøver fra 586 hunder av rasen newfoundlandshund (N=142), leonberger (N=215), irsk ulvehund (N=86) og labrador retriever (N=143). Blodprøvene ble samlet inn i forbindelse med et prosjekt som pågikk fra 1999 til 2002 og de fleste hundene er født i perioden 1998 - 2001. Hundene levde i et naturlig hjemmemiljø og ble føret uten noen påvirkning fra prosjektledelsen. Prøvene ble samlet inn av veterinærer i praksis rundt om i landet og prøvesvarene representerer dermed dyr fra et stort geografisk område. Alle prøvene ble sendt inn og analysert ved Sentrallaboratoriet ved Norges Veterinærhøgskole i Oslo.

De klinisk kjemiske analysene ble utført i et Technicon AXON System (Bayer Inc., Tarrytown, New York, USA). Følgende analyser ble utført: aspartat aminotransferase (AST), alanin aminotransferase (ALT), alkalisk fosfatase (AP), kreatin kinase (CK), amylase, lipase, total protein, albumin, globulin, urea, kreatinin, gallesyrer, total bilirubin, kolesterol, glukose, uorganisk fosfat, kalsium, natrium, kalium og klorid. Metodene som ble brukt for hver parameter er gjengitt i Tabell 1.

De hematologiske analysene omfatter leukocytter med 5-parts differensialtelling, erytrocytter, hemoglobin, hematokrit, MCV (Mean cell volume), MCHC (Mean cell hemoglobin concentration), RDW (Red cell distribution width) og trombocytter ble utført på Technicon H*1 analysemaskin med multispecies program (Bayer Inc., Tarrytown, New York, USA).

Alle prøvesvar ble lagt inn i Excel, Microsoft Office 2002 og bearbeidet. Ut fra de bearbejete data er det satt opp tabeller og diagram som viser utviklingen av de ulike parametere fra hundene er 3 måneder til 24 måneders alder (tabell 2 og 3). Diagrammene viser spredningen av dataene, mens tabellene viser helheten.

Data fra alle hundene ble delt inn i tre aldersgrupper; 3-6 mnd, 7-12 mnd og 13-24 mnd. Gruppene ble dannet på bakgrunn av at den opprinnelige prosjektoppgaven og oppfordret til prøvetaking ved 3, 4, 6, 12, 18 og 24 måneders alder. Av ulike årsaker ble flere prøver tatt i for- eller etterkant av anbefalt tidspunkt og en inndeling i tre aldersgrupper er hensiktsmessig. I den første gruppen (3-6 mnd) ble hovedtyngden av antall prøver tatt ved tre, fire og seks måneders alder. I gruppe nummer to (7-12 mnd) var de fleste prøve tatt ved 12 måneders alder, mens det i gruppe nummer tre (13-24 mnd) var fleste tatt ved 18 måneders alder. Beregning av referanseverdier er gjort ved hjelp av programmet RefVal (12), basert på parametrisk metode.

Alle referanseverdiene utregnet for hunder i vekst ble sammenlignet med referanseverdier for voksne hunder etablert ved Sentrallaboratoriet ved Norges Veterinærhøgskole i Oslo. Det er disse referanseverdiene Sentrallaboratoriet bruker som standard i sitt diagnostiske arbeid

Tabell 1: Metoder brukt til å bestemme serumbiokjemi hos valper 3-24 mnd.

Parameter	Metode	Referanser
AST ^a	IFCC ^b (without pyridoxal-5-phosphate)	Bergmeyer et al., 1978
ALT ^a	IFCC (without pyridoxal-5-phosphate)	Keiding et al., 1974
AP ^a	SCE ^c (DEA buffer)	Keiding et al., 1974
CK ^a	IFCC (NAC activated)	Szasz et al., 1976
Lipase		
Amylase	CNP-G3 ^b	Winn-Deen et al., 1988
Urea	urease	Tiffany et al. 1972
Kreatinin	alkaline picrate, kinetic	Rossignol et al. 1984
Bilirubin (total)	blanked diazo	Novros et al., 1979
Kolesterol	enzymatic, colorimetric	Allain, 1974
Glukose	hexokinase	Slein et al., 1950
Uorganisk fosfor	phosphomolybdate	Amador and Urban, 1972
Kalsium	cresolphtalein	Gitelman, 1967
Natrium	ion selective electrode	
Kalium	ion selective electrode	
Klorid	ferric thiocyanate	Schoenfeld and Lewellen, 1964

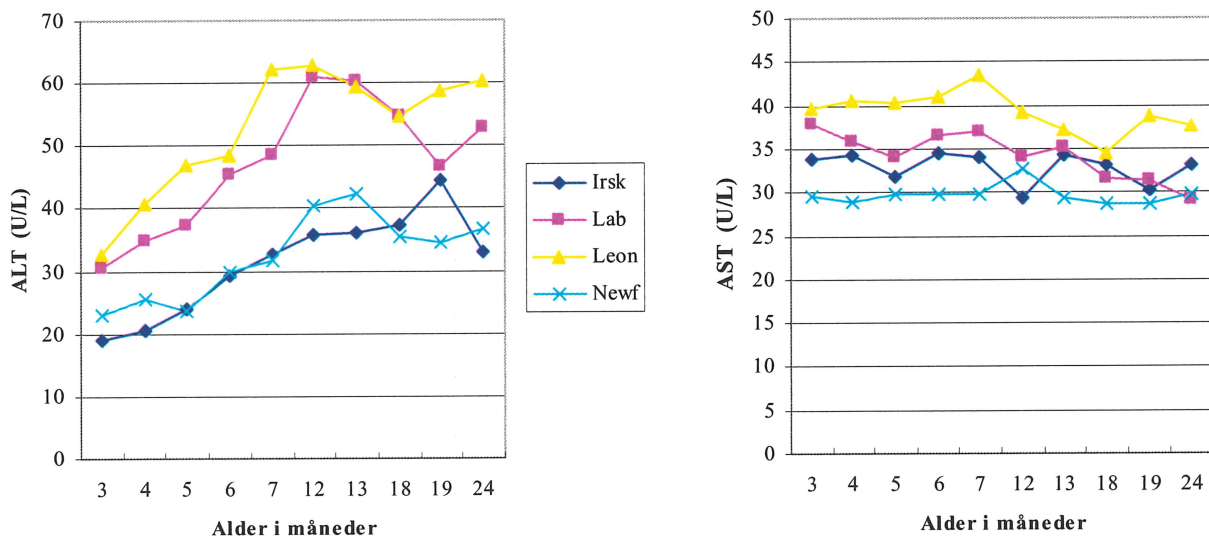
^a AST: aspartat aminotransferase; ALT: alanin aminotransferase; ALP: alkalisk fosfatase; CK: creatin kinase; LDH: laktat dehydrogenase;

^b CNP-G3: 2-chloro-4-nitrophenyl- α -maltotrioside

RESULTATER

Resultater serum biokjemi

Alanine aminotransferase (ALT) aktiviteten er lavest hos valper på 3 måneder og stiger frem til et års alder. For gruppen, 3-6 måneder, ligger de innen referanseområdet for voksne hunder som er utarbeidet ved Sentrallaboratoriet, mens for de to eldre gruppene (7-12 mnd og 13-24 mnd) strekker referanseområdet seg litt høyere enn for voksne hunder; opp til 106 mot 80. For **aspartat aminotransferase (AST)** ligger alle våre grupper noe høyere enn de voksne verdiene, men nivået er hele tiden jevnt.

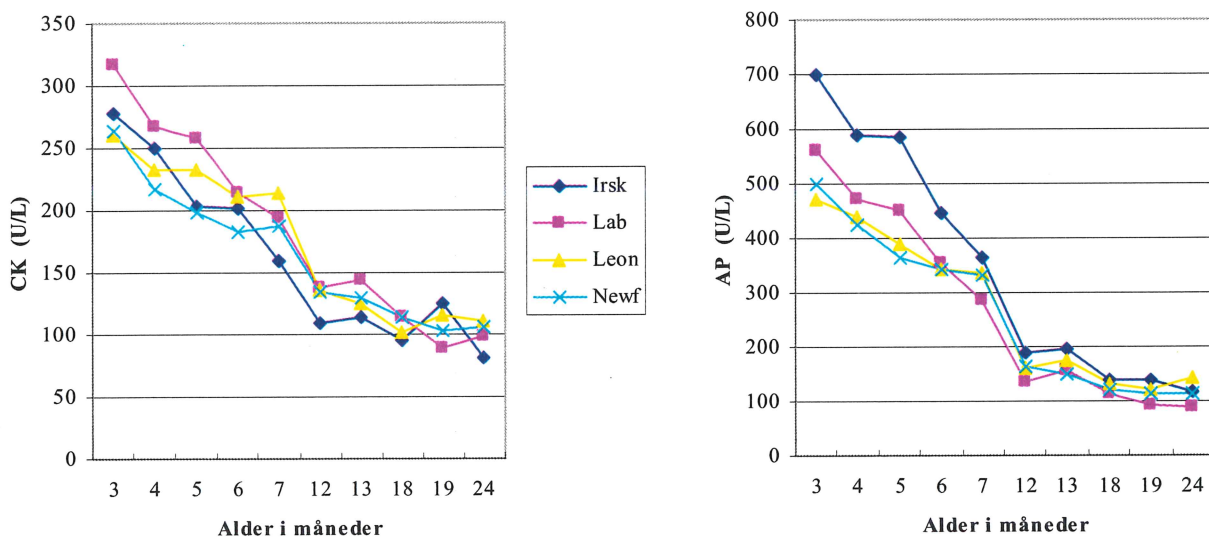


Figur 1: Gjennomsnitt av ALT og AST.

Alkalisk fosfatase (AP) viser store aldersrelaterte forskjeller. Aktiviteten er langt høyere hos unge valper, opp til fire ganger så høyt som hos voksne hunder. Verdiene synker jevnt til hunden er ca

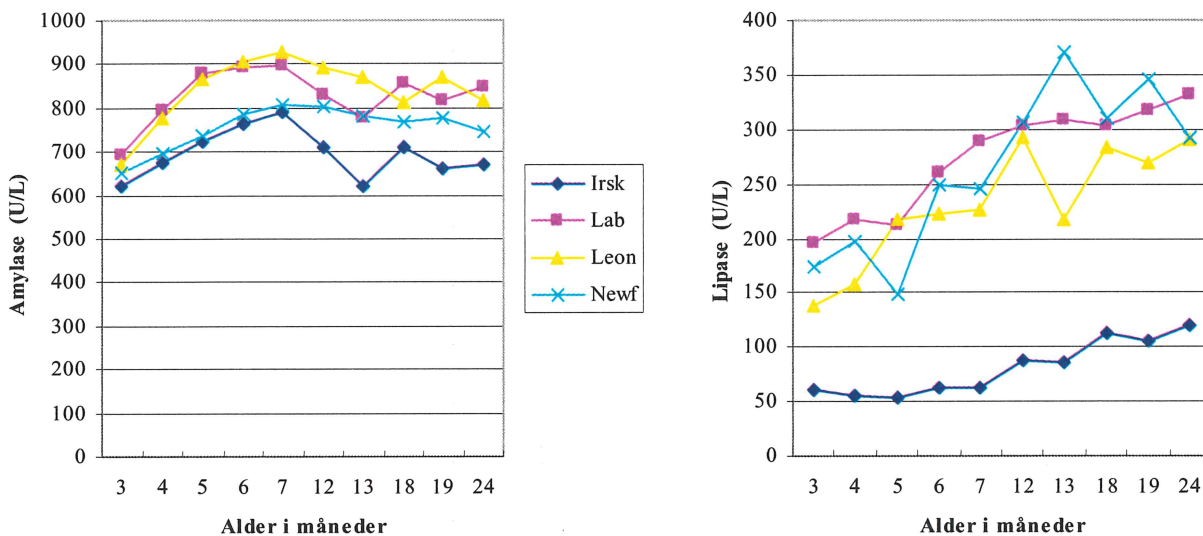
ett år, før de stabiliseres. De er likevel tre ganger høyere enn øvre grense for normalverdien hos voksne hunder utarbeidet av Sentrallaboratoriet. Allerede i løpet av de første seks levemånedene er AP verdiene vesentlig redusert. Forskjellen mellom de to gruppene på 7-12 mnd og 13 og 24 måneder var ikke vesentlig. De irske ulvehundene ligger hele tiden noe høyere i AP verdi enn de øvrige rasene.

Verdiene for kreatin kinase (CK) er også vesentlig høyere hos unge valper enn hos voksne hunder. Men allerede i løpet av de første seks månedene er verdiene nesten halvert, for deretter å ligge stabilt opp mot 280 frem til hunden er 24 måneder.



Figur 2: Gjennomsnitt av CK og AP.

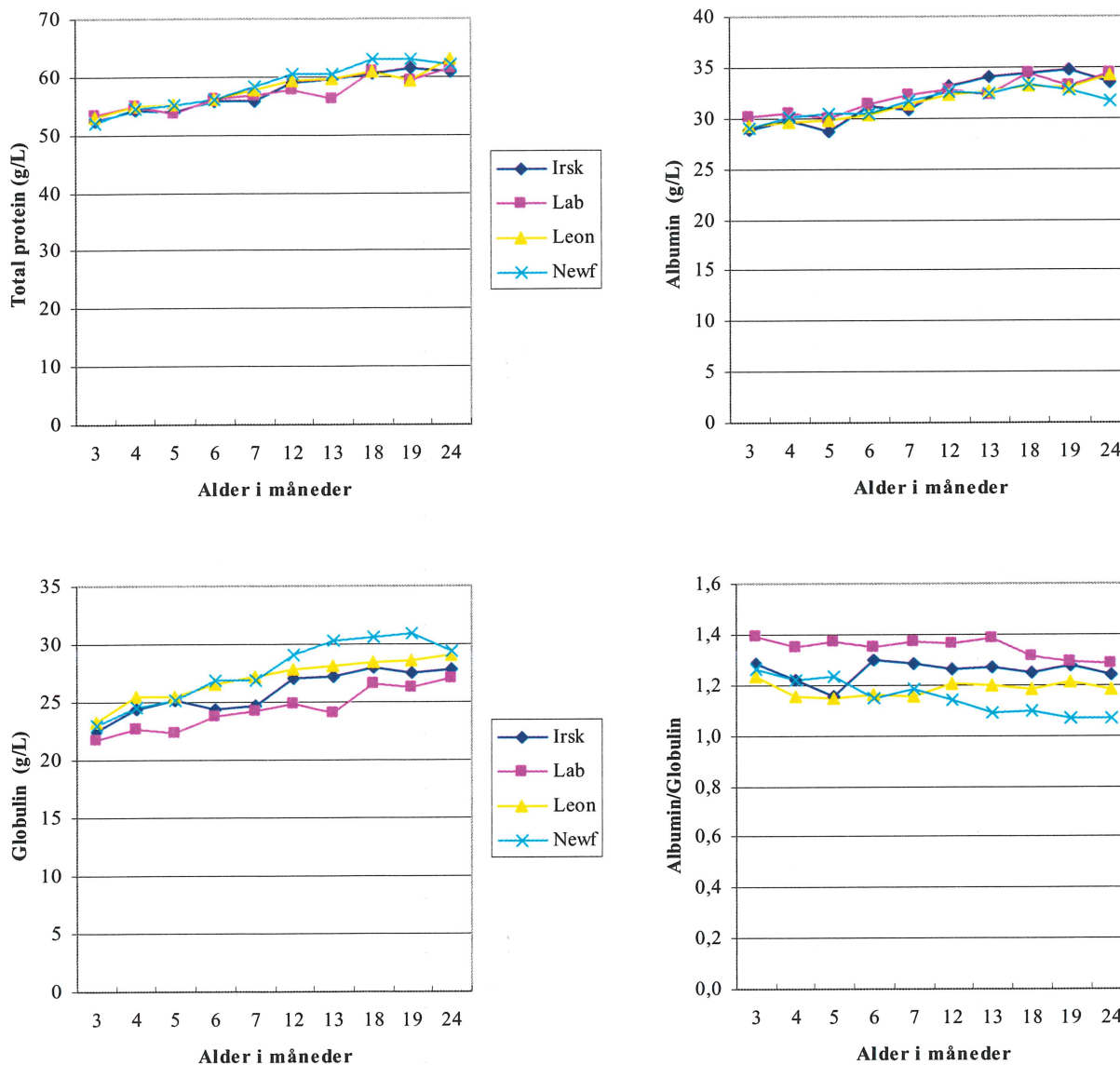
For **amylase** og **lipase** er det ikke vesentlige forskjeller mellom referanseverdiene hos valper og voksne hunder selv om diagrammet viser en stigende tendens for lipase med alderen. For **lipase** må det også nevnes at ulvehunden skiller seg klart fra de øvrige rasene ved å ligge vesentlig lavere i verdi. Denne trenden vedstår helt frem til hundene er 24 måneder.



Figur 3: Gjennomsnitt av amylase og lipase.

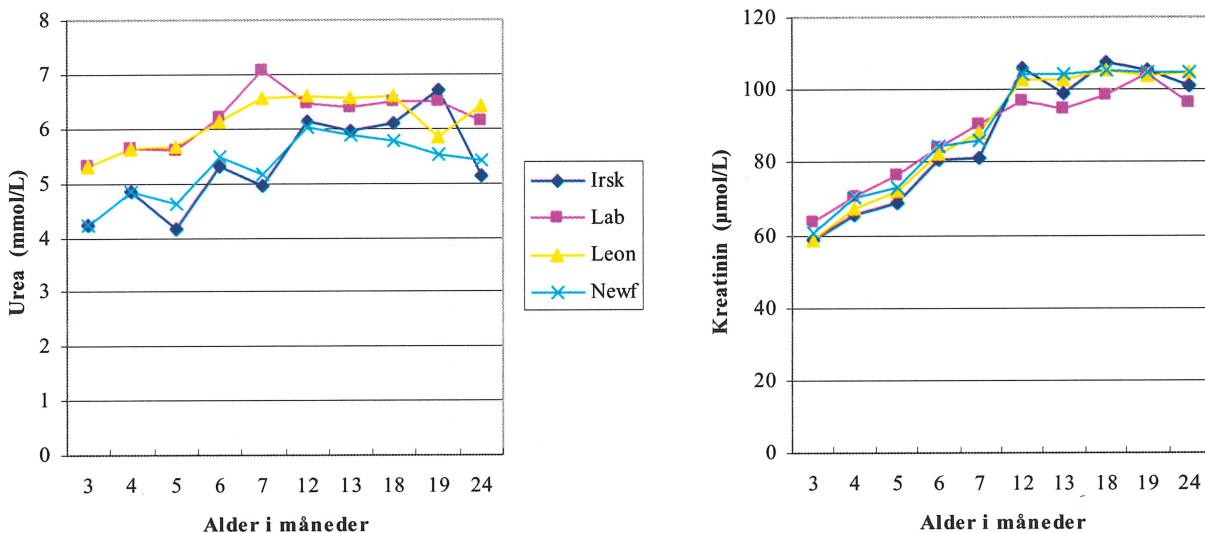
Valper har lavere nivå av **total protein** enn voksne hunder. Nivåene stiger jevnt frem til hundene er ett år gamle, men helt frem til to års alderen er verdiene i vår undersøkelse lavere enn de etablerte referanseverdiene for voksne hunder. Det var ikke vesentlige forskjeller i **albumin** nivå hos unge valper og voksne hunder, selv om referanseverdiene i vår undersøkelse har noe lavere nedre grense enn den etablerte referanseverdien for voksne hunder. **Globulin** fraksjonen er signifikant lavere for unge valper sammenlignet med voksne hunder. Selv om forskjellene er størst mellom den yngste gruppen og de voksne, ligger alle de tre gruppene lavere enn de eksisterende

referanseverdiene. Ved 24 måneder er verdiene ennå ikke kommet opp til voksent nivå, selv om de øker jevnt de to første årene.



Figur 4: Gjennomsnitt av total protein, albumin, globulin og albumin/globulin.

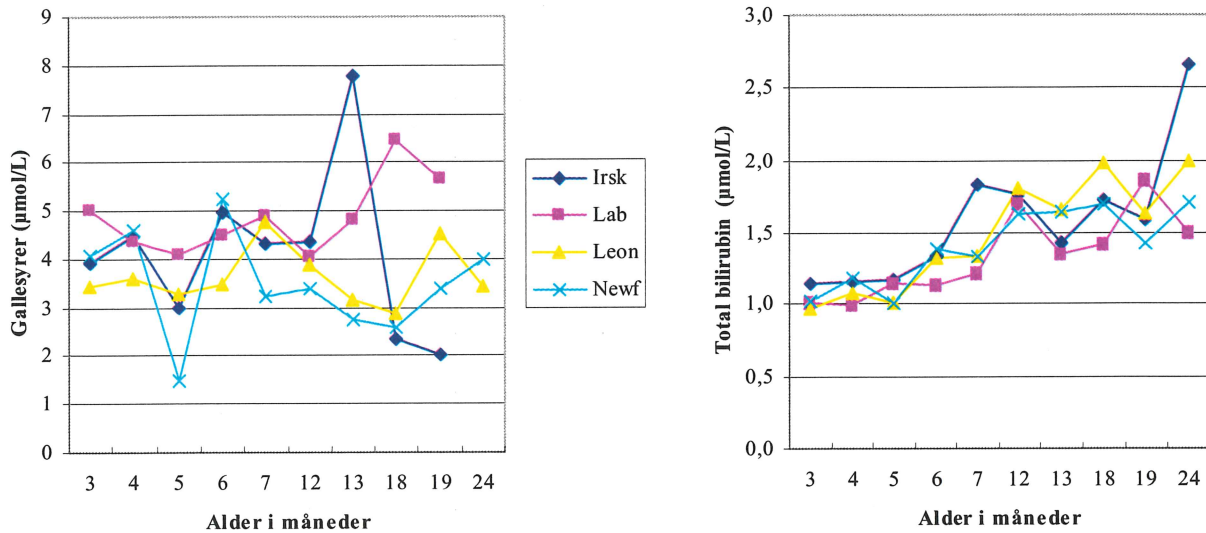
Verdiene for **urea** og **kreatinin** er ikke vesentlig forskjellige fra voksne hunder, men resultatene er noe sprikende. For **urea** ligger de øvre referansegrensene i vår undersøkelse noe høyere, spesielt for gruppa 7-12 måneder. Både i gruppa 3-6 måneder og 13-24 måneder ligger øvre referansegrense lavere enn for den mellomste gruppa, men høyere enn for voksne hunder. For **kreatinin** er nedre referanseverdi i gruppen 3-6 måneder vesentlig lavere enn for de andre gruppene, mens for de to andre gruppene er det øvre referansegrense som er høyere enn den eksisterende referanseverdien for voksne hunder.



Figur 5: Gjennomsnitt av urea og kreatinin.

Nivået av **gallesyrer** varierer veldig i undersøkelsen, men alle grupper har referanseområder som svarer til referanseområdene hos voksne hunder (**figur 6**).

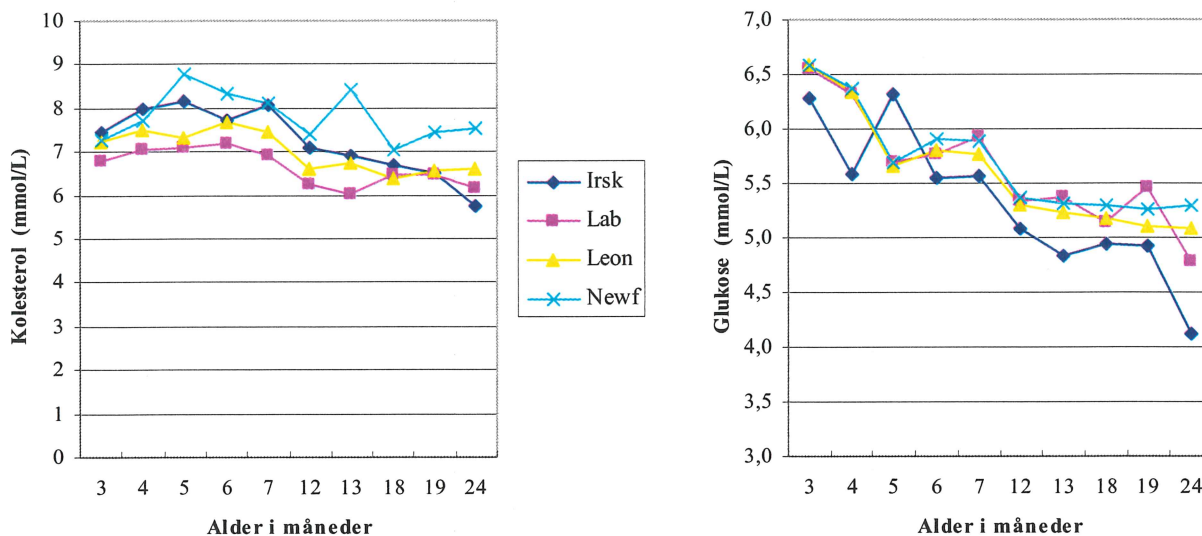
Det er ingen forskjell mellom **bilirubin** nivået hos valpene i undersøkelsen og de etablerte referanseverdiene hos voksne hunder, men diagrammet viser en svakt stigende alderstendens.



Figur 6: Gjennomsnitt av galesyrer og total bilirubin.

Kolesterol nivået ligger også innen referanseområdet for voksne hunder (3,4-10 mmol/L). Det er ikke vesentlige forskjeller mellom de ulike aldersgruppene i undersøkelsen, selv om nivået er noe synkende frem mot ett års alder (**figur 7**).

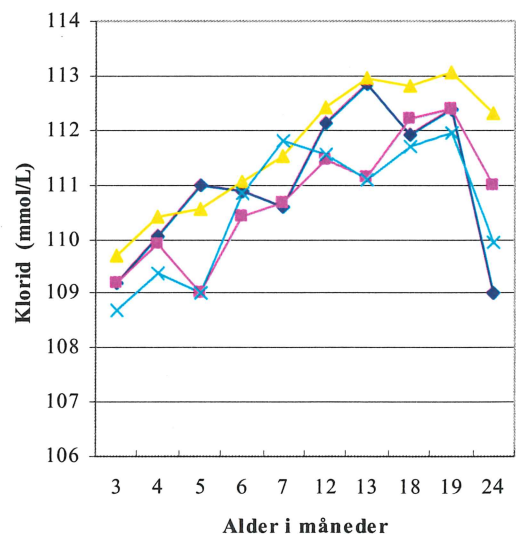
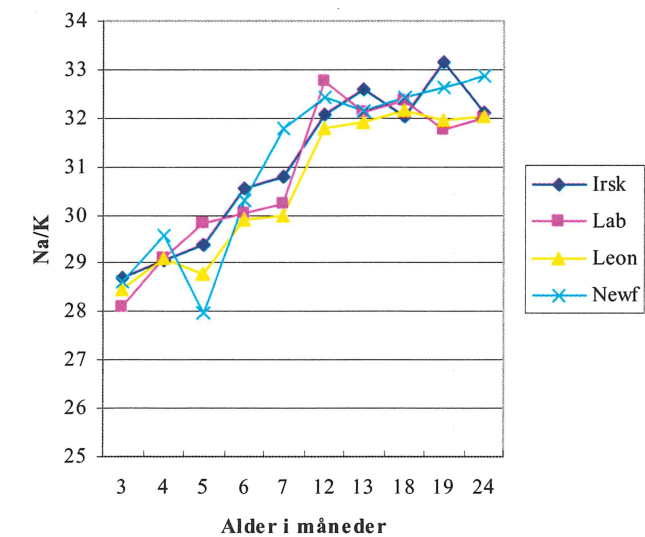
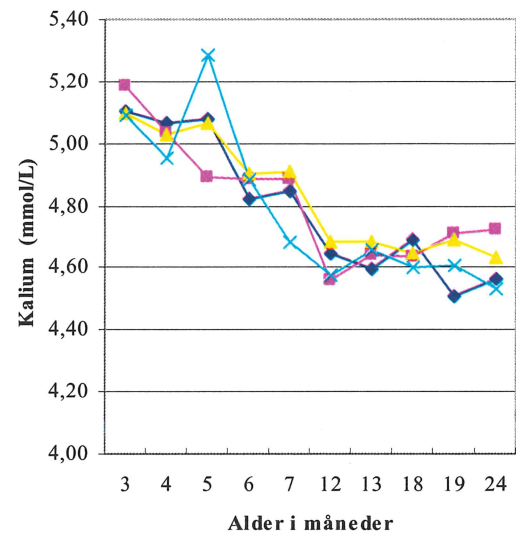
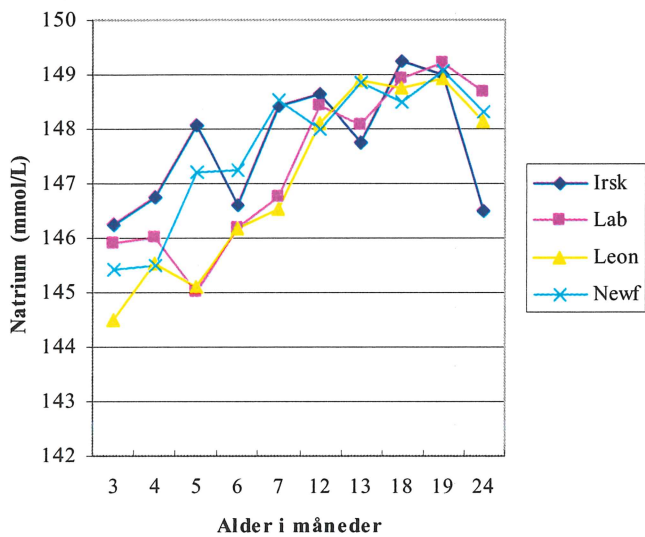
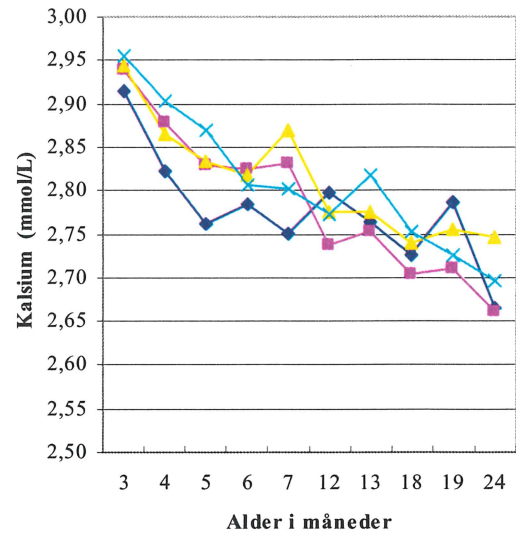
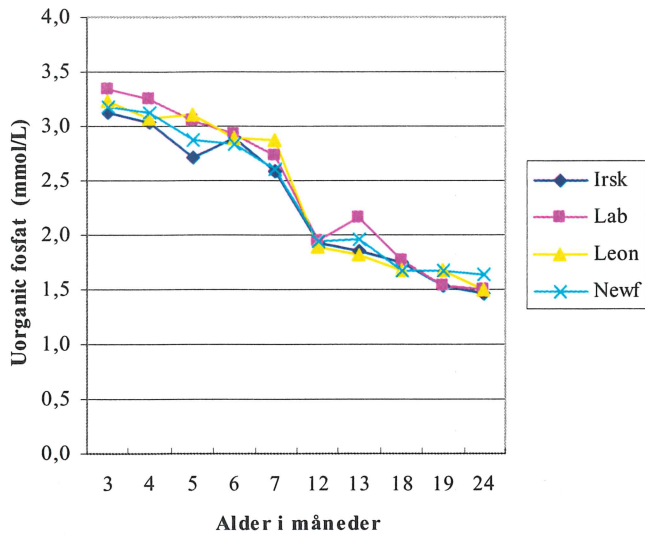
Glukose nivået er høyere hos unge valper og synker ned mot et års alder, men er hele tiden innen referanseområdet for voksne hunder (**figur 7**).



Figur 7: Gjennomsnitt av kolesterol og glukose.

Uorganisk fosfor er høyere hos valper i gruppen 3-6 måneder, men allerede ved seks måneders alder har nivået stabilisert seg på de voksne verdiene (**figur 8**).

For de ulike ionene ser man aldersrelaterte forskjeller spesielt for **kalsium**, men også for **kalium** og **klorid**. **Natrium** nivået er helt stabilt fra 3 måneders alder. **Kalsium**- og **kalium** nivået synker svakt det første leveåret, mens **klorid** nivået viser en stigende tendens. Alle verdiene er imidlertid innen de voksne referanseområdene for alle aldersgruppene (**figur 8**).

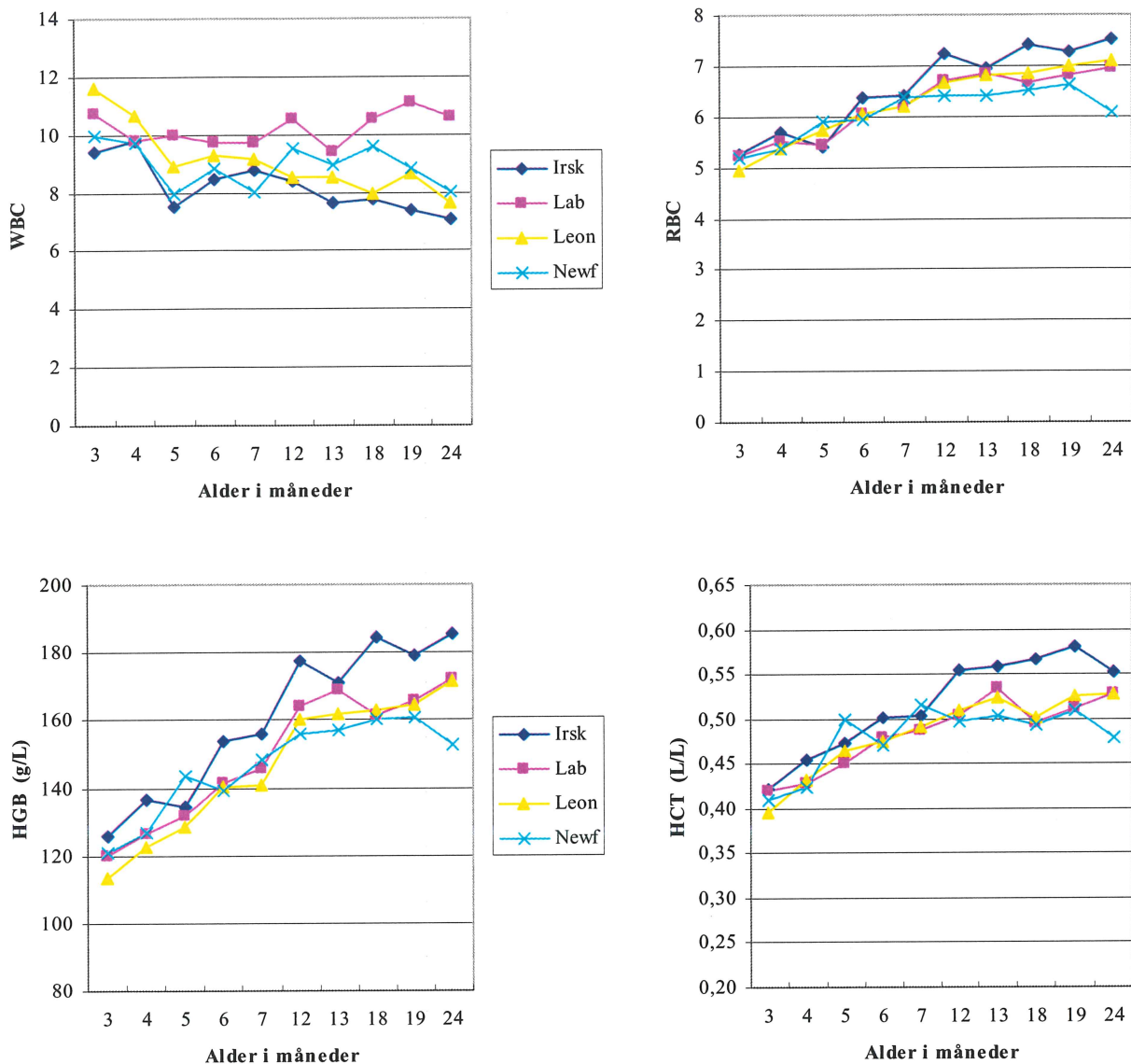


Figur 8: Gjennomsnitt av P, Ca, Na, K, Na/K og Cl.

Resultater hematologi

Det er liten forskjell i antall **leukocytter** for de ulike aldersgruppene. En svak reduksjon kan sees gjennom hele perioden hos leonberger og irsk ulvehund, mens labrador og newfoundlandshund ligger stabilt fra tre måneders alder. Alle rasene ligger likevel godt innen referanseverdiene for voksne hunder. Vi ser også en liten forskjell i antall **leukocytter** mellom rasene; verdiene er like ved tre måneders alder, men når hundene er blitt 24 måneder ligger labrador noe høyere enn de øvrige rasene. Irsk ulvehund har lavest verdi; $7,5 \times 10^9$ i gjennomsnitt ved 24 måneders alder, mot $10,5 \times 10^9$ hos labrador (**figur 9**).

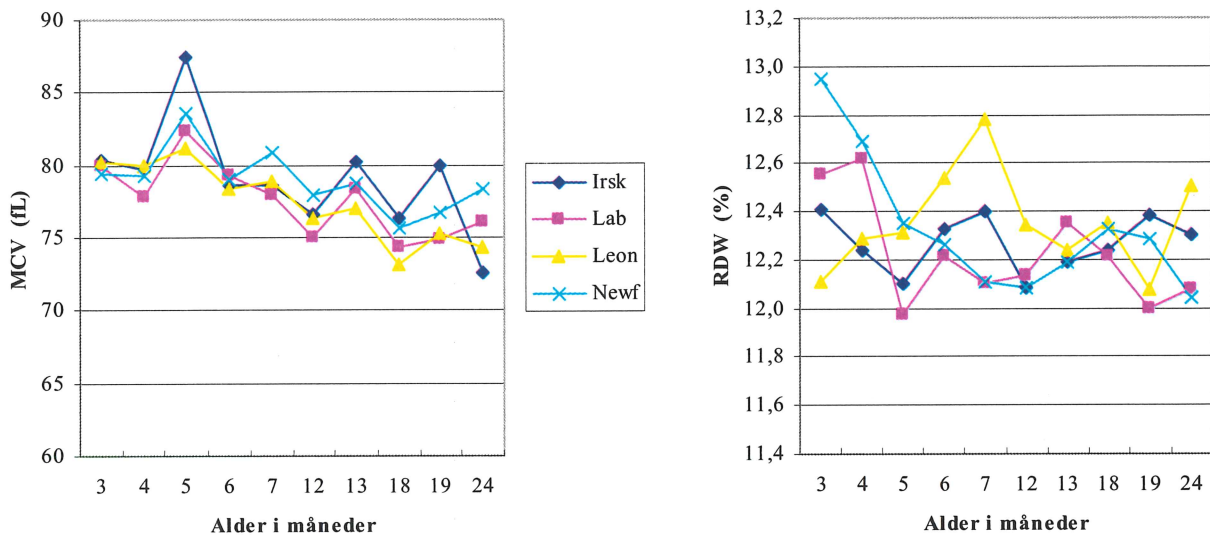
Hos alle rasene øker antallet **erythrocytter**, **hemoglobin** konsentrasjon og **hematokrit** gjennom det første leveåret. Ved ett års alder flater nivåene ut og stabiliserer seg. **Hemoglobin** konsentrasjonen er vesentlig lavere for valper i alderen 3-6 måneder sammenlignet med de øvrige aldersgruppene. Antall **erythrocytter** er også lavere for den yngste gruppen, men her er ikke forskjellene så store. For **hematokrit** ligger øvre referansegrense for gruppene 7-12 måneder og 13-24 måneder høyere enn de øvre referansegrensene etablert av Sentrallaboratoriet for voksne hunder (**figur 9**).



Figur 9: Gjennomsnitt av WBC, RBC, HGB og HCT.

Det ser ut til å være en tydelig effekt av alder på MCV, med en gradvis reduksjon etter hvert som hunden blir eldre. Spesielt den yngste gruppen skiller seg ut, og ligger vesentlig høyere enn referanseområdet for voksne hunder. Det er også forskjell mellom rasene, da verdiene hos labrador og leonberger synker betraktelig raskere enn hos irsk ulvehund og newfoundlandshund. Samme

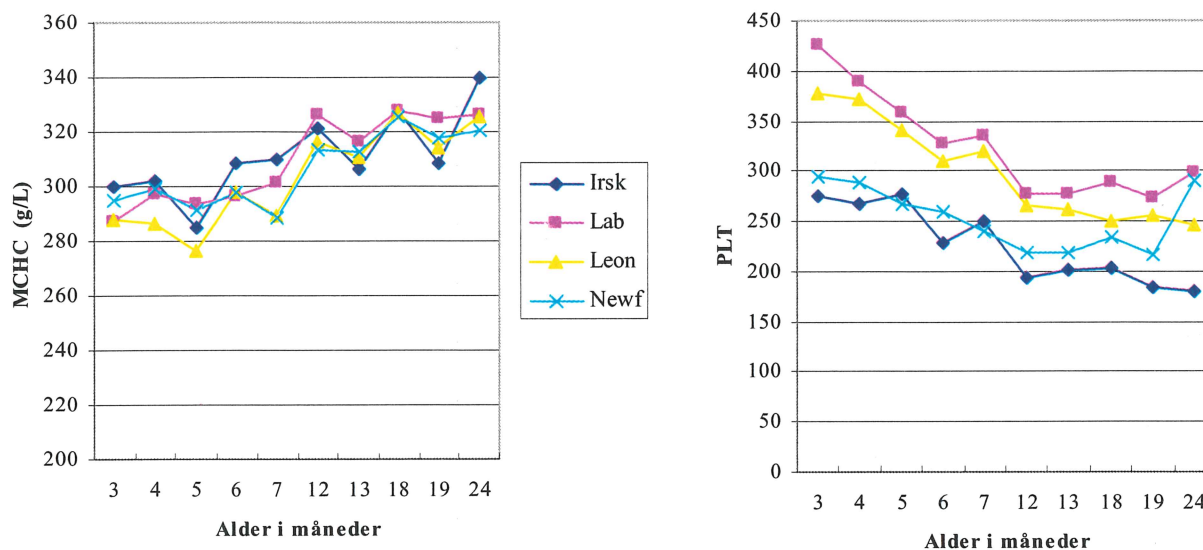
alders effekt observeres for **RDW**. Her skiller imidlertid leonberger seg ut ved å være stabil gjennom hele perioden, mens verdiene synker frem til ett års alder hos de øvrige rasene. Referanseverdiene for samtlige grupper er likevel godt innen referanseområdet for voksne hunder.



Figur 10: Gjennomsnitt av MCV og RDW.

MCHC viser en økende tendens det første leveåret, for så å flate noe ut. Vi ser likevel at våre referanseverdier har lavere nedre grense for alle tre aldersgruppene sammenlignet med referanseverdiene for voksne hunder (**figur 11**).

Antallet **trombocytter** viser en synkende tendens det første leveåret. Nivået stabiliseres deretter på et lavt nivå i forhold til de eksisterende referanseverdier for voksne hunder. Nedre referansegrense i vårt materiale er lavere enn de etablerte referansegrensene for samtlige grupper, og lavest for hunder fra 7 måneder og eldre. Av figuren ser vi også at irsk ulvehund og newfoundlandshund ligger lavere i antall trombocytter enn de to øvrige rasene gjennom hele perioden (**figur 11**).



Figur 11: Gjennomsnitt av MCHC og PLT.

De ulike fraksjonene av **leukocytter**; **nøytrofile granulocytter**, **lymfocytter**, **monocytter**, **eosinofile granulocytter** og **basofile granulocytter** ligger med unntak av de **nøytrofile granulocytterne** innenfor referanseområdene for voksne hunder. **Nøytrofile granulocytter** ligger noe lavere hos alle de tre aldersgruppene, men nivået er jevnt gjennom hele perioden.

Referanseområdene for de ulike analysene og aldersgruppene er presentert i tabell 2 og 3.

Tabell 2: Referanseverdier - serum biokjemi

Parameter Enhet	3-6 måneder	Antall	7-12 måneder	Antall	13-24 måneder	Antall	Voksne referanser
AST U/L	21 - 57	1531	19 - 55	435	19 - 58	553	0 - 40
ALT U/L	12 - 69	1515	23 - 106	437	21 - 106	547	0 - 80
AP U/L	229 - 804	1522	83 - 279	434	52 - 295	541	0 - 90
CK U/L	103 - 476	1509	56 - 284	432	40 - 269	541	0 - 200
Amylase U/L	454 - 1170	1515	490 - 1193	434	449 - 1209	552	0 - 1050
Lipase U/L	20 - 386	1315	36 - 592	360	40 - 657	542	0 - 700
Lipase (-Ulv) U/L	24 - 401	1095	49 - 617	305	44 - 680	481	0 - 700
Total protein g/L	47 - 64	1520	50 - 68	437	51 - 71	554	60 - 80
Albumin g/L	26 - 35	1533	28 - 38	438	28 - 39	552	30 - 37
Globulin g/L	19 - 31	1521	21 - 34	437	22 - 37	554	30 - 43
Alb/Glob	0,9 - 1,6	1521	0,9 - 1,7	437	0,8 - 1,6	553	0,7 - 1,3
Urea mmol/L	2,7 - 8,7	1522	3,7 - 10,2	438	3,4 - 9,4	553	3,5 - 7,2
Kreatinin µmol/L	44 - 103	1522	75 - 131	439	75 - 130	552	65 - 110
Gallesyrer µmol/L	0 - 10	1206	0 - 8	224	0 - 9	135	0 - 10
Total bilirubin µmol/L	0 - 3	1521	0 - 3	437	0 - 3	544	0 - 7
Kolesterol mmol/L	5,0 - 10,0	1516	4,2 - 9,7	435	4,2 - 9,6	554	3,4 - 10
Glukose mmol/L	4,1 - 7,8	1481	3,1 - 6,8	428	2,9 - 6,7	534	3,6 - 6,6
Uorg. fosfat mmol/L	2,5 - 3,7	1511	1,4 - 2,6	435	1,2 - 2,5	553	1,3 - 2,9
Kalsium mmol/L	2,6 - 3,1	1525	2,5 - 3,0	438	2,5 - 3,0	552	2,2 - 2,9
Natrium mmol/L	141 - 152	1517	143 - 154	437	144 - 155	554	140 - 154
Kalium mmol/L	4,3 - 5,8	1511	4,0 - 5,3	442	4,0 - 5,4	560	3,7 - 5,8
Na/K	25,2- 34,1	1511	28,0 - 36,7	437	27,7- 36,9	553	>27
Klorid mmol/L	105 - 116	1516	107 - 118	436	106 - 118	554	99 - 115

Tabell 3: Referanseverdier - hematologi.

Parameter Enhet	3-6 måneder	Antall	7-12 måneder	Antall	13-24 måneder	Antall	Voksne referanser
WBC x10 ⁹ /L	6,0 - 14,8	914	5,7 - 12,5	248	5,2 - 13,6	377	6,0 - 18,0
RBC x10 ¹² /L	4,6 - 6,8	916	5,6 - 7,9	251	5,5 - 8,2	383	5,1 - 8,5
HGB g/L	105 - 160	916	134 - 191	250	135 - 198	384	120 - 180
HCT L/L	0,34- 0,56	919	0,41- 0,63	250	0,41 - 0,64	384	0,35- 0,55
MCV fL	97 - 91	920	67 - 88	251	66 - 86	384	62 - 76
MCHC g/L	255 - 342	916	276 - 358	251	283 - 361	384	320 - 360
RDW %	11 - 14	907	11 - 13	248	11 - 14	384	11 - 16
PLT x10 ⁹ /L	163 - 492	909	129 - 360	233	133 - 374	345	200 - 500
#Neut x10 ⁹ /L	2,6 - 8,1	904	2,9 - 7,7	245	2,8 - 9,0	375	3,6 - 13,0
#Lymf x10 ⁹ /L	1,9 - 6,0	914	1,5 - 4,4	249	1,2 - 4,0	383	1,8 - 5,8
#Mono x10 ⁹ /L	0,1 - 1,2	908	0,2 - 0,9	243	0,1 - 0,9	377	0 - 1,6
#Eos x10 ⁹ /L	0 - 1,2	914	0 - 1,2	243	0 - 1,2	377	0 - 1,8
#Baso x10 ⁹ /L	0 - 0,1	909	0 - 0,1	246	0 - 0,1	379	0 - 0,4
#LUC x10 ⁹ /L	0 - 0,1	917	0 - 0,1	248	0 - 0,1	383	0 - 1,5

DISKUSJON

I denne studien har vi funnet klinisk signifikante aldersrelaterte variasjoner for biokjemiske og hematologiske parametere hos fire store hunderaser. Til forskjell fra de fleste tidligere publiserte studier ble alle hundene oppfostret i hjemlige miljøer uten noen form for påvirkning fra prosjektledelsen.

De vesentligste forskjellene sammenlignet med referanseområdene for voksne hunder finner vi for **alkalisk fosfatase (AP), kreatinin kinase (CK), lipase, total protein, albumin, globulin, kreatinin, uorganisk fosfor og kalsium.**

AP er signifikant høyere for hunder under et år, i dette forsøket nesten fire ganger høyere hos valper på 3 måneder enn øvre referansegrense hos voksne hunder. Dette skyldes sannsynligvis økt osteoblastaktivitet som grunnlag for skjelettvekst. Nivået synker ettersom hunden blir eldre og epifysene lukker seg (13). Dette resultatet stemmer vel overens med tidligere publiserte data. Irsk ulvehund ligger noe høyere i verdi enn de andre rasene, noe som kan gjenspeile rasens størrelse og relativt sen vekst.

CK er nesten dobbelt så høye hos en valp på tre måneder sammenlignet med en voksen hund, men synker gjennom valpens første leveår. Nivået stabiliserer seg rundt et års alder. Det kan være en mulig forklaring at økningen har en sammenheng med utvikling av økt muskelmasse.

For **lipase** ligger alle raser innen referanseverdiene for voksne hunder fra de er tre måneder gamle, men verdiene hos irsk ulvehund er vesentlig lavere enn hos de andre rasene gjennom hele perioden

(3 mnd-24 mnd). Dette særtrekket for irsk ulvehund er ikke umiddelbart lett å sette i en vekstrelatert sammenheng

Total protein ligger noe lavere hos valper på tre måneder sammenlignet med voksne hunder, men stiger sakte opp mot ett års alder hvor verdiene stabiliseres. Økningen i **total protein** har sannsynligvis sammenheng med økning av immunoglobuliner etter hvert som valpens immunsystem modnes. Dette støttes av at **globulin** fraksjonen øker jevnt fra tre måneders alder. Dette er også vist i flere tidligere studier (3,4,5). En svak økning av **albumin** kan observeres det første leveåret, men verdiene ligger innen referanseområdet hos voksne hunder. Leveren er godt utviklet ved fødsel og det er angitt at **albumin** nivået hos valper i løpet av de åtte første leveukene når samme verdi som hos voksne (6).

Valpen har lave verdier av **kreatinin** ved fødsel og når voksne verdier først ved fem – seks måneders alder. Nivået fortsetter å stige frem til 12 måneder før det stabiliseres. **Kreatinin** stammer fra muskelnedbryting og frigis i en konstant mengde (2%) fra frisk muskulatur (14). Det er derfor en sannsynlig forklaring at **kreatinin** vil øke så lenge hunden er i vekst, som følge av at muskelmassen øker. **Kreatinin** stabiliserer seg i et referanseområde med øvre og nedre grense over de gitte verdiene vi har for voksne hunder ved ca ett års alder. Dette skyldes trolig at vi i dette studiet kun har med store hunderaser. Det er i tidligere studier påvist høyere **kreatinin** nivå hos store, muskuløse raser (17). Det høye nivået hos voksne hunder er trolig mer rasebetinget enn alders/vekstbetinget.

Kolesterol nivået hos valper ligger innen referanseområdet for voksne hunder. Kroppens **kolesterol** kilder er både gjennom syntetisering i leveren og via maten (15) og man får høye verdier etter fettrike måltider. Det er store mengder **kolesterol** i melk og de fleste valper fôres også med protein- og fettrike valpefôr. Vi ser at **kolesterol** nivået avtar noe og stabiliseres omkring et års alder, dvs i den alderen de fleste hunder går over fra valpefôr til vedlikeholds fôr.

Uorganisk fosfor ligger høyt hos valper opp til 10 måneders alder. De høye konsentrasjonene reflekterer sannsynligvis beinvekst, remodellering og økt absorpsjon over nyrene pga effekten av veksthormon.. **Uorganisk fosfor** finnes også spesielt i kjøtt- og melkeprodukter og dietten har dermed også betydning for innholdet av **uorganisk fosfor** i plasma.

Kalsium verdiene viser en synkende tendens frem til femten måneders alder, men ligger hele tiden innen referanseområdet for voksne hunder. **Kalsium** konsentrasjonen i plasma stammer enten fra dietten eller fra remodellering av beinvev og reguleres av parathyroideahormon, calcitonin og vitamin D (16). Veksthormon vil også føre til økt retensjon av **kalsium** i kroppen. Valpefôr inneholder gjerne økte mengder kalsium, som vil bidra til økt mengde **kalsium** i plasma.

Vi kunne av resultatene ikke se vesentlige avvik for **ALT**, **AST** og **urea** hos valper i forhold til voksne hunder, men siden både lever og nyre er så godt som ferdig utviklet ved fødsel (6) er disse resultatene ikke overraskende. Riktig nok ligger øvre grense for **AST** noe over referanseområdet for voksne hunder, men dette kan sannsynligvis tilskrives vekst og modning av skjelett og reflekterer ikke leverens funksjon. Øvre referansegrense for **urea** er også noe høy i forhold til hos

voksne hunder, noe som kan forklares med et relativt høyt protein innhold i fôret til valper. Resultatene er også i samsvar med tidligere undersøkelser (6).

Det er mindre variasjoner mellom valp og voksen når det gjelder de hematologiske verdiene sammenlignet med serum biokjemi.

Verdiene for **leukocytter** viser små variasjoner mellom de ulike rasene og de ulike alderstrinnene. Tabell 3 viser at nedre grense for **nøytrofile granulocytter** i vårt materiale ligger litt lavt sammenlignet med referanseområdet for voksne. Hos unge hunder vil verdiene kunne forandre seg gjennom dagen ettersom aktivitetsnivået influerer på **leukocytene**. Høyt aktivitetsnivå ("stress") gir høyere verdier.

Andre studier (8,9,10,11) viser at unge valper har høyere antall hvite blodceller enn voksne fram til ca 8 ukers alder. Deretter stabiliserer verdiene seg innenfor referanseområdet hos voksne hunder, noe som stemmer overens med resultatene i vår studie.

Det er en vesentlig økning i antall **erytrocytter**, **hemoglobin** konsentrasjon og **hematokrit** gjennom valpens første leveår. Lave verdier i denne perioden kan være av klinisk betydning, men det er viktig å være klar over at lave verdier kan være normalt hos unge valper. I vår studie ligger alle valper over nedre referanseverdi for disse tre parametrene allerede fra tre måneders alder, men øker jevnt til 24 måneders alder.

MCHC øker jevnt det første leveåret og stabiliserer seg deretter innenfor referanseområdet for voksne hunder. Dette er i samsvar med at antall **erytrocytter**, **hemoglobin** konsentrasjonen og **hematokrit** øker under samme tidsrom.

Nyfødte valper har store, relativt umodne **erytrocytter**. Dette fører til at verdiene for **MCV** og **RDW** er høyere fram til 12 måneder enn det man ser hos voksne hunder. Leonberger skiller seg fra de andre tre rasene når det gjelder **MCV**, og ligger relativt stabilt gjennom hele perioden. Dette er det ingen innlysende forklaring på, men kan være et særtrekk for rasen. Andre publiserte resultater viser at for **MCV** kommer valper ned på nivået for voksne etter ca fire uker (9), men i vår studie flater ikke kurven ut før etter 6-12 måneder. Det forhold at mange av prøvene i denne undersøkelsen er innsendte prøver og at det derfor har gått noe tid fra uttak til analyse kan forklare en noe høy **MCV**.

I vår undersøkelse har vi funnet at referanseverdiene vi har beregnet for den eldste gruppen av hunder i vekst (13-24 måneder) for flere parametere er forskjellig fra de referanseverdiene Sentrallaboratoriet har beregnet for voksne hunder. Dette gjelder parametrene alkalisk fosfatase, totalprotein, globulin, hemoglobin, hematokrit, **MCV**, **MCHC** og nøytrofile granulocytter. For de fleste av disse parameterne beror forskjellene på at 24 måneder gamle hunder (og spesielt av store raser) enda er unge og til en viss grad fortsatt vokser. Men for hemoglobin og hematokrit er disse resultatene noe overraskende, siden verdiene for disse parametrene stiger med økende alder og faktisk ligger over Sentrallaboratoriets referanseområde.

Vi har for hele settet av serumenzymmer ikke funnet et referanseområde som går ned til 0, mens Sentrallaboratoriets referanseverdier konsekvent gjør det. Årsaken til dette er at Sentrallaboratoriet vil gjøre det enklere for klinikerer for de serumenzymmer der lave verdier ikke har noen klinisk relevans. Vi har ikke tatt slike hensyn.

At våre referanseverdier ikke alltid stemmer overens med de referansene Sentrallaboratoriet opererer med kan skyldes at parametrene fortsetter å forandre seg med hundens alder slik at forskjellen beror på at hunder på 24 måneder er unge hunder, mens Sentrallaboratoriet dekker hele populasjonen. Det kan også skyldes at ulike parametere varierer mellom små og store hunderaser, slik at resultatene våre ville vært mer i samsvar om vi hadde hatt et bredere raseutvalg. Eller det kan være at Sentrallaboratoriets referanseverdier bør vurderes på nytt.

OPPSUMMERING

Vi har i dette studiet utarbeidet hematologiske og biokjemiske referanseverdier for valper av rasene labrador retriever, leonberger, newfoundlandshund og irsk ulvehund i vekst. Tallene bygger på blodprøver tatt fra i underkant av 600 valper i alderen 3-24 måneder, oppvokst hos private personer. Resultatene viser at det for flere parametere er store aldersrelaterte forskjeller og også enkelte rasevariasjoner. De mest signifikante forskjellene finner vi for parametrene alkalisk fosfatase, kreatinin kinase, total protein, globulin og kreatinin, samt for erytrocytter, hemoglobin og hematokrit. Forskjellene er størst det første leveåret, og verdiene stabiliseres gjerne rundt 12 måneders alder, noe som reflekterer vekst og modning hos valpene.

Nøkkelord: valper, hematologi, serum biokjemi, referanseverdier, vekst.

SUMMARY

We have prepared haematological and serum biochemistry parameters for young growing puppies. The samples were collected from almost 600 puppies of four different breeds: labrador retriever, leonberger, newfoundland and irish wolfhound. The puppies' age at the time of sample collection ranged from 3 to 24 month of age. All puppies were raised in private homes without influence from the project management. The results show several significant effects of age and also significant interaction between age and breed in some blood parameters. The most significant differences in serum biochemistry were found for alkaline phosphatase, creatinine kinase, total protein, globulin and plasma creatinine. For haematological parameters the most significant differences were found in erythrocytes, haemoglobin and HCT. Changes were most evident during the first year of life, reflecting growth and maturation of the puppies.

Keywords: puppies, haematology, serum biochemistry, reference values, growth.

REFERANSER

1. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), (1983/5), The Theory of Reference Values, V., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem* Vol 21, 1983, pp 749-760.
2. Jorun Grøndalen (1999); Fôring, veksthastighet og skjelettsykdom, *Norsk Veterinærtidsskrift* 2000, 112, 11 pp 762-763.
3. E. Jean Harper, Rachel M. Hackett, Joy Wilkinson, Paul R. Heaton (2003). Age-related variations in hematologic test results in Beagles and Labrador Retrievers. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223; pp1436-1442.
4. S. Comazzi, C. Peralisi, W. Bertazzolo (2004); Haematological and biochemical abnormalities in canine blood: frequency and associations in 1022 samples; *Journal of small animal Practice* 2004, 45, pp 343-349.
5. S.T Wolford, R.A. Schroer, F.X. Gohs, P.P. Gallo, H.B Falk, A.R. Dente; Effect of Age on Serum Chemistry Profile, Electrophoresis and Thyroid Hormones in Beagle Dogs Two Weeks to One Year of Age; *Veterinary Clinical Pathology*, Vol 17, No 2, pp 35-42.
6. J.D. Hoskins; The liver and pancreas. In *Veterinary Pediatrics, dogs and cats from birth to six months*. 2nd ed., W.B Saunders company 1995, pp 190-193
7. M.L.Chandler (1992): Pediatric normal blood values. In: G. Hosgood, J. Hoskins; *Small Animal Pediatric Medicine and Surgery*, Oxford: Butterworth - Heinemann 1998, p7.
8. M.S. Bulgin, S.L Munn, W. Gee; Hematologic changes to 4 and one-half years of age in clinically normal Beagles. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 157; pp1064-1070.
9. F.L Earl, B.E. Melveger, R.L Wilson;The hemogram and bone marrow profile of normal neonatal and weanling Beagle dogs. *Lab Anim Sci* 1973; 25; pp 690-695.

10. G.O. Erwing, O.W. Schalm, R.S Smit; Hematologic values of normal Basenji dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1972; 161; pp 1661-1664.
11. J.H. Meinkoth, K.D. Clinkbeard; Normal hematology of the dog. In: B.F. Feldman, J.G. Zinkl, N.C. Jain, eds. *Schalm`s veterinary haematology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; pp 1057-1063.
12. H. E. Solberg,; RefVal. Technical Report, February 1983. Department of Clinical Chemistry, Rikshospitalet, N-Oslo 1, Norway, 1983.
13. B.M.Bush,; Enzymes. In *Interpretation of Laboratory Results for Small Animal Clinicians*. Blackwell Science 1991; kap. 6, pp 318-324.
14. B.M.Bush,; Nutrients and metabolites. In *Interpretation of Laboratory Results for Small Animal Clinicians*. Blackwell Science 1991; kap. 5, p 235.
15. B.M.Bush,; Nutrients and metabolites. In *Interpretation of Laboratory Results for Small Animal Clinicians*. Blackwell Science 1991; kap. 5, pp 272-277.
16. Ø.V. Sjaastad, K. Hove, O. Sand; Regulation of Calcium and Phosphate Metabolism. In *Physiology of Domestic Animals* 1st ed. Scandinavian Veterinary Press 2003, pp 245-251
17. W.E. Van Den Brom, W. J. Biewenga; Assessment of glomerular filtration rate in normal dogs: analysis of the ⁵¹Cr-EDTA clearance and its relation to several endogenous parameters of glomerular filtration. *Research in Veterinary Science* 1981, 30, pp 152-157.

