



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

NMBU Veterinærhøgskolen  
Institutt for prekliniske fag og patologi  
Seksjon for biokjemi og fysiologi

Fordypningsoppgave 2022

Smådyrsdifferensiering

## **Langtidsoppfølging av serumkreatinin og mikroalbuminuri hos hunder bitt av huggorm (*Vipera berus*)**

Longitudinal assessment of serum creatinine and microalbuminuria in dogs bitten by the European adder (*Vipera berus*)

Sigrun L. Volden  
Pia S. Wellerop  
Cornelia Örtenwall  
Kull 2016

Veiledere: Karin E. Zimmer, Heidi S. Lund,  
Tove V. Nicolaysen

# Innhold

|  |               |
|--|---------------|
| <b>INNHold</b> .....   | <b>- 3 -</b>  |
| <b>SAMMENDRAG</b> .....  | <b>- 4 -</b>  |
| <b>DEFINISJONER OG FORKORTELSER</b> .....  | <b>- 5 -</b>  |
| <b>INNLEDNING</b> .....  | <b>- 7 -</b>  |
| NYRENE OG DERES FUNKSJON.....  | - 9 -         |
| PATOFYSIOLOGI VED NYRESKADE .....  | - 10 -        |
| <i>AKI til CKD</i> .....   | - 13 -        |
| KLINISKE- OG BIOKJEMISKE AVVIK VED NYRESYKDOM .....  | - 15 -        |
| BIOMARKØRER .....  | - 16 -        |
| <i>Kreatinin og urea</i> .....   | - 18 -        |
| <i>UPC</i> .....   | - 20 -        |
| <i>Mikroalbumin i urin</i> .....   | - 21 -        |
| <i>Alternative biomarkører i urin:</i> .....   | - 23 -        |
| <b>FORMÅL</b> .....  | <b>- 24 -</b> |
| <b>MATERIALE OG METODER</b> .....  | <b>- 25 -</b> |
| MATERIALE .....  | - 25 -        |
| <i>Beskrivelse av gruppene</i> .....   | - 25 -        |
| <i>Kasusgruppen</i> .....  | - 25 -        |
| <i>Kontrollgruppen</i> .....   | - 27 -        |
| METODER.....   | - 28 -        |
| <i>Canine albumin ELISA sett</i> .....   | - 28 -        |
| <i>Måling av kreatinin i serum</i> .....   | - 30 -        |
| <i>Reference change value</i> .....  | - 30 -        |
| <i>UPC</i> .....   | - 30 -        |
| <i>Urinprøver</i> .....  | - 30 -        |
| <b>STATISTISKE METODER</b> .....   | <b>- 31 -</b> |
| <b>RESULTATER</b> .....  | <b>- 32 -</b> |
| URINPRØVER .....   | - 32 -        |
| KONSENTRASJON AV ALBUMIN I URINEN HOS HUNDER BITT AV HUGGORM SAMMENLIGNET MED KONTROLLGRUPPEN - 33 | -             |
| - .....  | -             |
| UTVIKLING I KREATININKONSENTRASJON I SERUM HOS HUNDER BITT AV HUGGORM SAMMENLIGNET MED             | -             |
| KONTROLLGRUPPEN .....  | - 35 -        |
| <b>DISKUSJON</b> .....   | <b>- 37 -</b> |
| MIKROALBUMINURI .....  | - 37 -        |
| UTVIKLING I SERUMKREATININ .....   | - 39 -        |
| BEHANDLINGSREGIMETS INNVIRKNING PÅ NYRESKADE.....  | - 40 -        |
| METODE .....   | - 41 -        |
| <b>KONKLUSJON</b> .....  | <b>- 43 -</b> |
| <b>TAKK TIL BIDRAGSYTERE</b> .....   | <b>- 44 -</b> |
| <b>SUMMARY</b> .....   | <b>- 45 -</b> |
| <b>REFERANSER</b> .....  | <b>- 46 -</b> |

## Sammendrag

**Tittel:** Langtidsoppfølging av serumkreatinin og mikroalbuminuri hos hunder bitt av huggorm (*Vipera berus*).

**Forfattere:** Cornelia Örtenwall, Sigrun L. Volden og Pia S. Wellerop

**Veiledere:** Karin E. Zimmer, Heidi S. Lund og Tove V. Nicolaysen.

I sommerhalvåret blir mange hunder i Norge bitt av huggorm (*Vipera berus*). Huggormens gift har tidligere vist å kunne gi akutt nyreskade. En velkjent teori er at akutt nyreskade kan forårsake kronisk nyresykdom. Målet med studien var derfor å undersøke om det forelå en vedvarende nyreskade hos hunder bitt av huggorm ved hjelp av biomarkørene mikroalbumin i urin og utvikling i serumkreatinin. Denne studien følger åtte hunder bitt av huggorm i Østlandsområdet i en periode på fem måneder. Hundene ble tatt prøve av ved ankomst til klinikk, og deretter ca. 24 timer, 14 dager, 2 måneder og 5 måneder etter bitt.

Målingene ble sammenlignet med en kontrollgruppe som besto av åtte friske hunder.

Resultatene viste en økning i median av mikroalbumin i urinen hos kasusgruppen ca. 24 timer etter bitt ( $p=0,05$ ). Det ble ikke påvist økning i serumkreatinin utover normalt referanseområde eller betydelig stigning mellom prøvetidspunktene. Studien kan støtte opp om tidligere studiers funn at det hos hunder bitt av huggorm foreligger akutt nyreskade etter 24 timer. Basert på normalisering av biomarkørene er det grunn til å tro at den akutte nyreskaden er forbigående og at det ikke foreligger vedvarende nyreskade på hund i tidsperioden 14 dager til fem måneder etter huggorbitt.

## Definisjoner og forkortelser

|          |   |
|----------|---|
| AKI      | «Acute Kidney Injury» - akutt nyreskade                               |
| Azotemi  | Forhøyede verdier av urinpliktige stoffer i blod (kreatinin og urea)  |
| CKD      | «Chronic kidney disease» - kronisk nyresykdom                         |
| ESRD     | «End stage renal disease» - Endestadie nyresvikt                      |
| GFR      | Glomerulær filtrasjonsrate  |
| Hematuri | Blod i urinen   |
| HPF      | «High-power field» - Synsfelt med 40 x forstørrelse                   |
| HMW      | «High molecular weight» - Høymolekylvekt: > 100 kDa                   |
| IMW      | «Intermediate molecular weight» - Intermediær molekylvekt: 40-100 kDa |
| LMW      | «Low molecular weight» - Lavmolekylvekt: < 40 kDa                     |



|       |   |
|-------|---|
| mAlb  | Mikroalbumin  |
| PLN   | «Protein Losing Nephropathy» -<br>Proteintapende nefropati          |
| Pyuri | Økning av hvite blodceller i urinen                                 |
| RBC   | «Red Blood Cell» - Rød blodcelle                                    |
| RCV   | «Reference Change Value»  |
| sCr   | «Serum creatinine» - Serumkreatinin                                 |
| uACR  | «Urine albumine creatinine ratio» - Urin<br>albumin kreatinin ratio |
| uAlb  | Albumin i urinen  |
| uCr   | «Urine creatinine» - Kreatinin i urinen                             |
| UPC   | «Urine protein creatinine ratio» - Urin<br>protein kreatinin ratio  |
| USG   | «Urine specific gravity» - Urin spesifikk vekt                      |

## Innledning

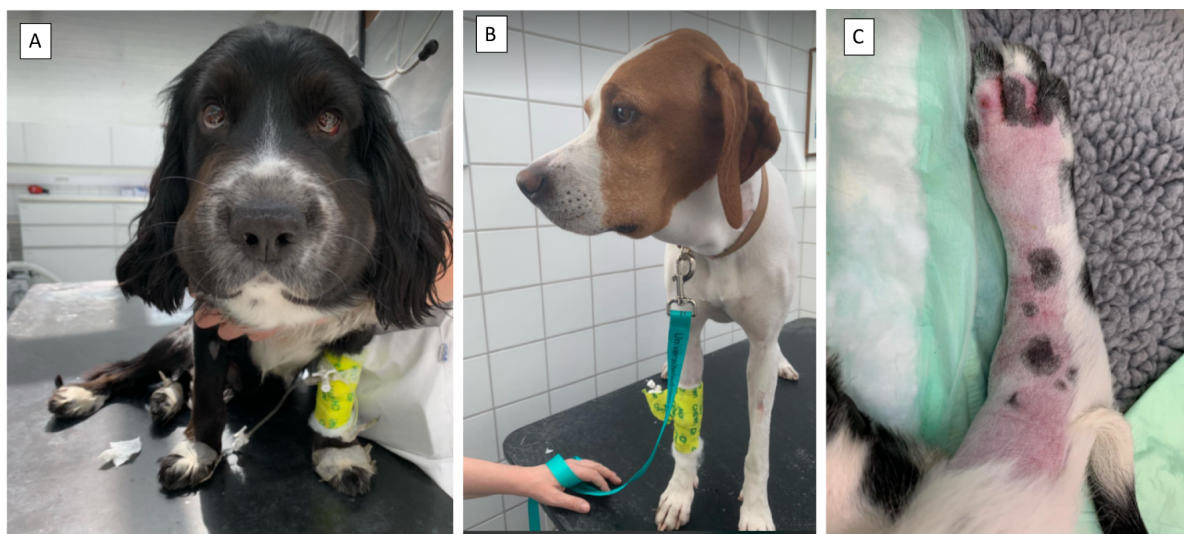
Hvert år blir mange hunder i Skandinavia bitt av huggorm. Det er anslått at det bor ca. 560 000 hunder i Norge og ca. 60% av disse er forsikret. Agria, som selger ca. 33% av disse forsikringene fikk i 2021 inn 334 skademeldinger som angikk huggormbitt (Nisja, 2022). Huggormen, *Vipera berus*, er den eneste giftige slangen i Norden (Lervik et al., 2010). Den kjennetegnes av det karakteristiske mørke sikksakkmønsteret på ryggen og finnes i ulike fargevarianter. Huggormen kommer frem fra steinrøyser og jordhuler på varme dager. Den kan da komme i kontakt med mennesker og dyr både på fjellet og i lavlandet. Om vinteren går de i dvale og sesongen for huggormbitt er derfor april til oktober (SNL, 1997).



**Figur 1:** Huggorm, *Vipera Berus* (Foto: Egil Michaelsen)

Mengden gift varierer fra bitt til bitt hvor noen er uten gift, såkalte tørrbitt (Kolbjørnsen, 2014). Huggormens gift er en kompleks blanding av stoffer med cytotoxiske, proteolytiske og hemolytiske egenskaper som er rettet mot å immobilisere og drepe byttedyr (Brandal & Østrem., 2000). Disse stoffene er anslagsvis 25 ulike enzymatisk aktive proteiner og peptider som kan forårsake ødem, forstyrrelse av hemostasen, og i alvorlige tilfeller hypovolemi og distributivt sjokk som et resultat av systemisk vasodilatasjon og lekkasje av væske fra kapillærene (Karlsøn-Stiber et al., 2006). Dette skjer både gjennom direkte virkninger av giften og indirekte konsekvenser ved frigjøring av en rekke kroppsegne cellulære- og kjemiske mediatorer som initierer inflammasjon (Bocian et al., 2016; Bickler,

2020; Palviainen et al., 2012). Det er observert en variasjon i giftens komposisjon med både geografiske- og sesongbaserte forskjeller, samt at ormens alder har en innvirkning (Brandal & Østrem, 2000). De umiddelbare kliniske symptomene på huggormbitt kan inkludere lokal hevelse i området ved bittet, blålig misfarging av huden, smerte og letargi. Av og til kan man finne bittsår i huden med spor etter huggormens tenner. Videre kan mer generelle symptomer fra andre organsystemer inntre: hypotensjon, takykardi, sjokk, oppkast, diaré, arytmi, takypné og akutt nyreskade (Brandal & Østrem, 2000).



**Figur 2:** *Bilde A og B viser hunder fra studien med tydelig hevelse etter bitt i ansiktet. Bilde C viser kraftig hevelse og blålig misfarging av hud etter bitt i et bakbein. Alle bildene er tatt ved prøvetidspunkt T2, ca. 24 timer etter bitt (Foto: Tove V. Nicolaysen, med skriftlig tillatelse fra eier).*

Akutt nyreskade (AKI) er et begrep som omfatter et bredt spekter av plutselig eller akutt nyreskade, som kan variere fra et subklinisk forløp til en alvorlig nyresvikt (Palm, 2020). Uavhengige studier har vist at huggormbitt har forårsaket akutt nyreskade (Palviainen et al., 2013; Hrovat et al., 2013). Tidlig deteksjon av nedsatt nyrefunksjon er viktig for å kunne iverksette tiltak tidlig nok til å bremse utviklingen (Hrovat et al., 2013). Ved hjelp av biomarkører i urin er det blitt identifisert en mild, kortvarig og ikke-azotemisk akutt nyreskade (AKI) hos hunder bitt av huggorm (Harjen et al., 2021). Systematisk bruk av tradisjonelle biomarkører i klinisk praksis kan gjøre at AKI etter huggormbitt kan tenkes å være underdiagnostisert (Harjen et al., 2021). Ved anvendelse av alternative biomarkører i urin er det sett at en kan detektere nyreskade på et langt tidligere tidspunkt enn ved bruk av de tradisjonelle biomarkørene i serum, kreatinin og urea (Ettinger et al., 2017).

Det foreligger flere teorier om at AKI, uavhengig av årsak, kan føre til kronisk nyreskade (Coca et al., 2012; Kaneko et al., 2008; Cowgill et al., 2016; Chevalier, 2016). Den tradisjonelle biomarkøren serum kreatinin (sCr) er vist å ha vesentlige begrensninger og det kan derfor være behov for biomarkører med høyere sensitivitet for tidlig nyreskade. I denne studien er det undersøkt om huggorbitt hos hund gir en vedvarende nyreskade ved hjelp av biomarkørene mikroalbumin i urin og kreatinin i serum. Studien følger åtte hunder bitt av huggorm over tid for å se på endringer av de nevnte biomarkørene i en periode fra like etter huggorbitt til ca. fem måneder etter bittet.

## **Nyrene og deres funksjon**

Nyrene er to livsviktige, bønneformede organer som har som funksjon å regulere kroppsvæskenes kvalitet og kvantitet ved justering av volum, osmolalitet, ionekonsentrasjoner og pH. I tillegg eliminerer nyrene kroppens avfallsstoffer og fremmedstoffer, samt produserer renin, erythropoetin, prostaglandiner, aktiverer vitamin D og bidrar til glukoneogenese. Nyrene er høyvaskulariserte og mottar til en hver tid 20-25% av blodets minuttvolum i hvile.

Nyrenes funksjonelle enhet er nefronet som består av glomerulus og tubuli. Glomeruli er kapillærnøster omsluttet av en kapsel (Bowmans kapsel) lokalisert i nyrebarken. Det er her filtreringen av blodet foregår og det første filtratet, ultrafiltratet dannes. Det vil først passere gjennom det fenestrerte glomerulære endotelet, deretter et nettverk av kollagen i basalmembranen og til slutt mellom podocyttenes utløpere før det ender i Bowmans kapsel. Det er disse tre komponentene som utgjør filtrasjonsbarrieren. Filtratet inneholder vann, ioner, glukose og en liten andel albumin (Zachary et al., 2012). Filtrasjonsbarrieren vil hindre større molekyler å passere, men molekylens ladning vil også ha en innvirkning da filtrasjonsbarrieren er negativt ladet. Positivt ladede molekyler, samt molekyler uten elektrisk ladning vil derfor enklere passere over i Bowmans kapsel (D'Amico & Bazzi 2003; De Loor et al, 2013). Filtratet i et normalt fungerende nyre vil være nærmest proteinfritt, men små mengder proteiner vil filtreres over i Bowmans kapsel for så å reabsorberes i proksimale tubuli ved hjelp av endocytose. De reabsorberte proteinene degraderes i tubulicellene og transporteres tilbake til blodet som aminosyrer (Sjaastad et al., 2016).

Væskevolumet som filtreres over glomerulus per tidsenhet kalles glomerulær filtrasjonsrate (GFR). GFR er et produkt av trykket over Bowman kapsel, det arealet som er tilgjengelig for filtrasjon og permeabiliteten til filtrasjonsbarrieren. Faktorer som påvirker trykket i glomeruluskapillærene er forskjellen i hydrostatisk trykk i Bowmans kapsel og det proteinosmotiske trykket i plasma (Sjaastad et al., 2016).

Fra Bowmans kapsel går ultrafiltratet over i proksimale tubuli, henles slynge, distale tubuli og når til slutt samlerørene. I proksimale tubuli blir cirka 80% av vann, makromolekyler og elektrolytter reabsorbert samtidig som H<sup>+</sup>-ioner og kroppsfremmede stoffer skilles ut. Dette er en energikrevende prosess og oksygenforbruket er stort (Carlson, 2019). Proksimale tubuli strekker seg ned i medulla og blir Henles slynge. Dette partiet danner den osmotiske gradienten i interstitialvæsken blant annet ved hjelp av urea. Henles slynge går over i distale tubuli og urinen samles i samlerørene som fører urinen over i nyrebekkenet. Antidiuretisk hormon (ADH) påvirker distale tubuli og samlerørenes permeabilitet for vann, og dette danner grunnlaget for nyrenes evne til å konsentrere urin (Lote, 2012).

*Arteria renalis* forsyner nyrene med blod. Det foreligger ingen anastomoser mellom karene som forsyner nyrebarken, noe som gjør den sårbar for infarkter. Karene i nyrebarken forgrener seg og gir opphav til de afferente arteriolene som fører blodet inn i Bowmans kapsel. Det rensede blodet forlater kapselen gjennom efferente arterioler som videre forsyner barken og margen med blod og dermed forsyner tubulicellene med oksygen og næringstoffer, samt frakter med seg reabsorbert væske fra tubuli. Blodforsyningen til tubuli er av denne grunn avhengig av blodgjennomstrømning gjennom glomeruli. De kapillære forgreininger som slynger seg rundt Henles slynge ned i medulla kalles *vasa recta*, og spiller en viktig rolle i nyrenes evne til å konsentrere urin (Zachary et al., 2012).

## **Patofysiologi ved nyreskade**

Patofysiologien ved nyreskade er et komplekst samspill av hemodynamiske forhold, tubulær skade og inflammatoriske prosesser som kan resultere i tubulær nekrose (Sutton et al., 2002). Nyreskade kan skyldes iskemiske-, toksiske-, infeksjøs-, neoplastiske- og immunmedierte forhold.

Ved toksineksponering er det ofte de tubulointerstitielle delene av nyrene som rammes (Kumar et al., 2015). Grunnet høy blodgjennomstrømning vil nyrene bli eksponert for større mengder sirkulerende toksiner, i forhold til annet vev (Matovinovic, 2009). Dessuten har vevet potensiale for oppkonsentrering av nefrotoksiner i tubulicellene som et resultat av reabsorpsjon (Price, 2002; Kumar et al., 2015).

Nyrene er særlig sårbare for iskemisk skade. Redusert blodgjennomstrømning i de glomerulære kapillærene påvirker blodforsyningen til de peritubulære kapillærene (Kumar et al., 2015). Nyremargen har i utgangspunktet sparsom blodforsyning, og en reduksjon i blodstrømmen vil dermed kunne gi iskemisk skade (Maxie, 2016). Epitelet i proksimale tubuli er blant de cellene i kroppen som er mest sårbare for hypoksi, grunnet høy mitokondrieaktivitet som krever oksygen til oksidativ fosforylering (Zachary et al., 2012; Chevalier, 2016).

Nyrenes respons på skade avhenger blant annet av hvilken del av nyrene som skades, og klassifiseres tradisjonelt etter om de anses som akutte eller kroniske. Kroniske skader på nyrene kalles «chronic kidney disease» (CKD) og defineres som en vedvarende funksjonell- eller strukturell skade på nyrevevet med varighet over 3 måneder (Bartges, 2012). En AKI kan være reversibel, men en CKD anses som en progressiv og irreversibel tilstand (Grauer, 2005). AKI er oftest et resultat av iskemi, hypoksi av andre årsaker eller toksiske substanser, og rammer som regel de tubulære delene av nefronet. CKD kan ramme alle deler av nefronet (Basile et al., 2012; Grauer, 2005).

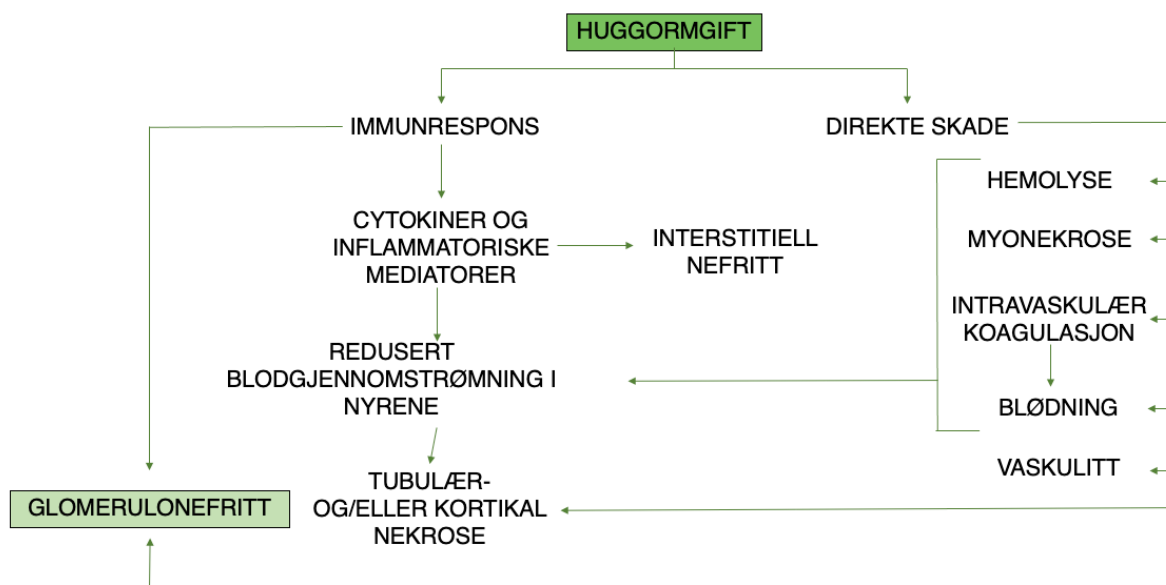
Årsakene til glomerulær skade er ofte immunkomplekser, tromboembolier, bakterielle embolier eller virale infeksjoner. De patofysiologiske mekanismene bak glomerulær skade ved en infeksjons- eller kjemisk årsak er ikke fullstendig forstått og det foreligger ulike teorier som forklarer forandringene. En av teoriene, «the intact nephron hypothesis», er at en glomerulær skade påvirker funksjonen til hele nefronet. Dette, som nevnt over, fordi en glomerulær skade kan påvirke peritubulær blodstrøm og derfor også funksjonen til tubuli. På en annen side vil skade på tubuli kunne føre til økt trykk i glomeruli og dermed forårsake skade (Kumar et al., 2015).

En annen teori forklarer hvordan utviklingen av skaden kan være progressiv. Ved nefrontap vil mekanismer sikre at de gjenværende nefronene tar over filtrasjonen slik at nyrefunksjonen opprettholdes. Dette gir hyperfiltrasjon og hypertensjon med glomerulosklerose som resultat (Zachary et al., 2017; Helal, 2012). Dette forårsaker overbelastning av de gjenværende nefronene og kan føre til videre skade. Den siste teorien er at immunkompleksnedslag i glomeruli fører til nyreskade ved at de trigger inflammasjonsprosesser, herunder rekruttering av immunceller, frislipp av inflammatoriske mediatorer og destruksjon av den glomerulære basalmembranen. Disse skadene kan også gi endring i filtrasjonen og føre til videre skade (Zachary et al., 2012)

Ved tubulær skade kan epitelcellene respondere på ulike måter: degenerasjon, nekrose, apoptose og/eller atrofi. Tubulær nekrose og infiltrasjon av inflammatoriske celler i interstitiet er karakteristiske patologiske forandringer ved AKI (Furuichi et al., 2009). Ved toksisk påvirkning av tubulære strukturer vil det som nevnt kunne bli oppkonsentrering av toksiner, som vil ha en intratubulær effekt og gi direkte skade på epitelcellene. Reparasjonsmekanismene ved toksisk påvirkning og tubulære skader er ofte velfungerende, og nyrene har evne til regenerasjon og gjenopprettelse av funksjon så lenge basalmembranen er intakt (Zachary et al., 2017). Uttalt tubulær skade med tap av basalmembranen vil resultere i nekrose og et permanent tap av hele nefronets funksjon (Zachary et al., 2017). Dette vil erstattes med fibrøst vev som er en karakteristisk forandring ved utvikling av CKD (Furuichi et al., 2009). Kronisk nyreskade kjennetegnes av glomerulosklerose, tubulointerstitiell fibrose og atrofi. Disse forandringene er ikke prosess-spesifikke og er uavhengige av etiologien. Ved CKD er det derfor vanskelig å påvise den underliggende årsaken (Grauer, 2005; Matovinovic, 2009).

Ved ormebitt generelt vil hemodynamiske forstyrrelser og immunologiske reaksjoner som igangsetter inflammatoriske responser kunne føre til skade på nyrene. I tillegg vil toksiner som har en direkte nefrotoksisitet kunne bidra (Castro et al., 2004). Det er ikke gjort studier på den direkte effekten huggormgift har på nyrene, men studier av nært beslektede giftige ormer med mange like giftkomponenter viser at giften har en direkte skadelig effekt på basalmembranen i glomeruli og epitelcellene i proksimale tubuli (Willinger et al., 1995; Castro et al., 2004). I tillegg til å ha en direkte nefrotoksisk effekt, vil noen toksiner kunne fremme koagulasjon (Harjen et al., 2022). Det vil da kunne oppstå iskemi grunnet en

trombotisk mikroangiopati, som er obstruksjon grunnet tromber i mikrosirkulasjonen. Dette er blant annet sett ved obduksjon av hund bitt av huggorm, i tillegg til tubulær degenerasjon og nekrose (Kolbjørnsen, 2014). Avfallsprodukter fra rhabdomyolyse og myoglobiner vil kunne gi trombotisk mikroangiopati, i tillegg til å ha en direkte toksisk effekt på nyrene og dermed bidra til ytterligere nyreskade. Dette er en sjeldnere og dårligere forstått komplikasjon ved ormebitt assosiert med AKI (Noutsos, 2020).



**Figur 3:** Figur som viser huggormgiftens direkte- og indirekte skadelige effekt. Basert på informasjon om virkning av gift fra ormebitt generelt og inspirert av lignende figur fra *Snakebite nephrology*, Sitprija 2006 s:445

## AKI til CKD

Det har kommet flere studier de siste årene på både mennesker og dyr som viser en korrelasjon mellom AKI og utvikling av CKD, men patofysiologien rundt dette er fortsatt ikke fullstendig forstått og årsakene antas å være multifaktorielle (Coca et al., 2012; Kaneko et al., 2008; Cowgill et al., 2016; Chevalier, 2016). AKI kjennetegnes typisk av et hurtig inntredende forløp, og har tidligere vært ansett som en helt reversibel tilstand. CKD er en irreversibel tilstand som oftest karakteriseres av et snikende forløp og progresjon over tid (Cowgill et al., 2016). AKI og CKD har tradisjonelt vært sett på som to separate sykdommer, men nyere forskning peker på at sykdommene overlapper i større grad enn tidligere vist og indikerer at AKI med større sannsynlighet kan resultere i permanente



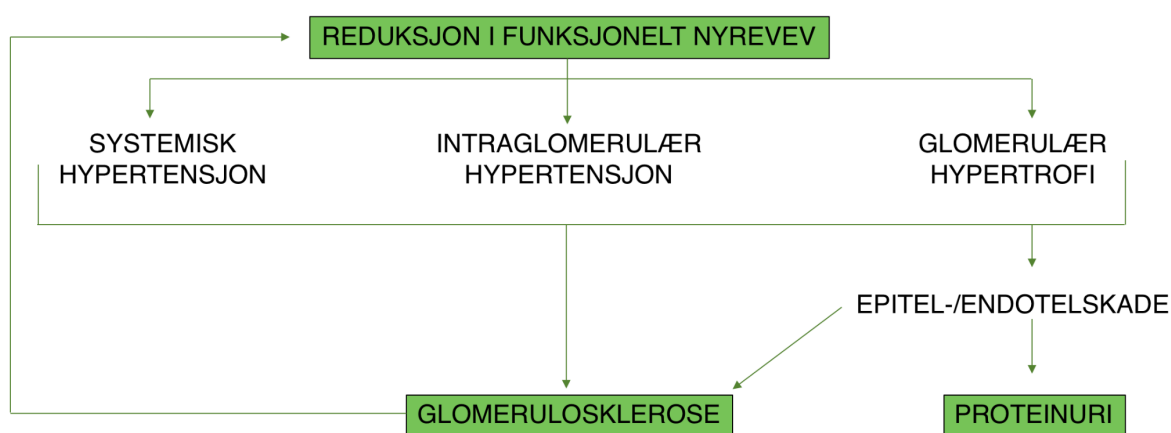
nyreskader (Coca et al., 2012). Skal man forstå hvordan en AKI kan lede til en CKD må man se nærmere på forløpet av AKI, som kan deles inn i fire ulike faser (Ross, 2011):

- 1) Initieringsfasen: Initiering av iskemisk eller nefrotoksisk skade med eller uten kliniske tegn.
- 2) Utviklingsfasen: Videre utvikling av hypoksi og inflammatorisk respons som fremmer videre nyreskade.
- 3) Vedlikeholdsfasen: Vedlikeholdsfasen er en opprydning- og remodelleringsprosess.
- 4) Rehabiliteringsfasen: Cellulær differensiering og funksjon gjenopprettes. Dette kan ta uker til måneder, og vil kunne etterlate kroniske forandringer (Basile et al., 2012; Sutton et al., 2002).

I initieringsfasen vil AKI forårsake cellulært stress. Den cellulære responsen på skade avhenger av hvilke celletyper som affiseres, hvor motstandsdyktig disse cellene er mot hypoksi, samt hvor langvarig og alvorlig skaden cellen utsettes for er (Zachary, J. F., 2012). Denne skaden vil initiere en kaskade av ulike kompliserte prosesser som omfatter flere ulike cellulære mediatorer og molekyler. Feilregulert apoptose, frislipp av inflammasjonsmediatorer, atrofi, aktivering av leukocytter, oksidativt stress og interstitiell fibrose som igjen kan redusere blodforsyningen er noen av de cellulære responsene som oppstår ved skade på nyrene (Matovinovic, 2009).

Disse prosessene vil kunne stimulere til interstitiell inflammasjon, progredierende skade og i mange tilfeller tap av funksjonelle nefroner (Cowgill et al., 2016,). Ved skade på endotel vil det kunne oppstå hypoksi og iskemi. Redusert blodforsyning, glomerulær hypertensjon og interstitiell fibrose er selvforsterkende mekanismer som forårsaker progredierende forandringer, redusert reparasjonskapasitet og progressiv vevsskade (Matovinovic, 2009; Chawla et al., 2014). Skadde tubuliceller som ikke klarer å regenerere eller repareres vil stimulere til proliferasjon av myofibroblaster og fibrose i interstitiet. Dette kan føre til kroniske forandringer (Cowgill et al., 2016,).

De gjenværende nefronene som ikke er skadet, vil tilpasse seg og blir kompensatorisk hypertrofiske. Dette vil bidra til endring i hemodynamikken, herunder økt blodgjennomstrømning, økt filtrasjon og glomerulær hypertensjon (Kumar et al., 2015). I tillegg er det ofte også en systemisk hypertensjon. Disse endringene fører til skade på endotel- og epitelcellene, og medfører økt permeabilitet over den glomerulære basalmembranen. (Kumar et al., 2015). Dette kan forårsake lekkasje av proteiner over i den mesangiale matriksen og proliferasjon av disse cellene. Proliferasjonen resulterer i glomerulosklerose som vil bidra til progressiv skade på gjenværende nefroner (Matovinovic, 2009; Kumar et al., 2015, Hall J.H & Hall M.E).



**Figur 4:** Illustrasjon som viser hvordan flere faktorer bidrar til glomerulosklerose og dermed et progressivt tap av funksjonelle nefroner. Illustrasjonen er reprodusert fra Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Kumar et al. 2015; s 909.

Utfallet av celledskade kan være fullstendig reversibel, og vevet kan oppnå sin opprinnelige struktur og funksjon, eller det kan resultere i irreversible celledskader og celledød (Zachary et al., 2017). Det er når den akutte nyreskaden blir så alvorlig at det fører til irreversible celledskader og progressiv skade at en AKI kan føre til en CKD (Coca et al., 2012; Kaneko et al., 2008, Cowgill et al., 2016; Chevalier, 2016).

## Kliniske- og biokjemiske avvik ved nyresykdom

De kliniske symptomene til pasienter med nyresykdom varierer og avhenger av sykdommens utbredelse og alvorlighetsgrad. Kronisk nyresykdom vil ofte ha et snikende,

progredierende forløp og det første kliniske symptomet er ofte polyuri og polydipsi (PUPD) (Ettinger et al., 2017). På grunn av nyrenes store reservekapasitet vil nyresykdom kunne utarte seg som subklinisk og det er ikke før >75 % av nefronene er skadd at det blir forhøyede verdier av urinpliktige stoffer i blod, azotemi (Grauer, 2005). Uremi er den kliniske manifestasjonen ved opphopningen av urinpliktige stoffer i blodet, og er samlebetegnelsen på symptomene som oppstår ved langt fremskreden CKD eller uttalt AKI. Kliniske symptomer ved uremi kan inkludere vektnedgang og redusert muskelmasse, PUPD, hyporeksi eller anoreksi, oppkast, halitosis, ulcerativ stomatitt og gastroenteritt (Bartges, 2012). Pasienter med CKD vil også, som tidligere nevnt, kunne ha systemisk hypertensjon (Brown, 2016). Biokjemisk vil pasienter med nyresvikt ha renal azotemi. I tillegg kan de ha hypoproteinemi ved proteintapende nefropati (PLN). Pasientene kan også ha elektrolyttforstyrrelser som hyperfosfatemi, hyperkalsemi, hyperkloremi og hypokalemi (Broek, 2022; Kaneko et al., 2008). Nyrenes evne til å konsentrere urin vil være redusert og pasientene har ofte en urin spesifikk vekt (USG) <1.030, isosten- eller hypostenuri. Mange med langt fremskreden nyresykdom har en non-regenerativ anemi på grunn av redusert produksjon av erythropoietin (Bartges, 2012).

## **Biomarkører**

En biomarkør er et stoff eller et molekyl som objektivt kan måles og evalueres som indikator på biologiske- og patologiske prosesser, og som kan benyttes til å se på underliggende medisinske tilstander (Strimbu & Jorge, 2010). Markører for nyreskade kan deles inn i indirekte markører for den glomerulære filtrasjonsraten (GFR) og direkte markører for glomerulær- og tubulær skade (Harjen, 2021). Kreatinin og urea er biomarkørene som tradisjonelt er brukt for deteksjon av nyreskade. Disse brukes som et indirekte mål på GFR, og er dermed et mål for nyrefunksjonen (Hrovat et al., 2013; Bjørneboe, 2019). Mindre uttalt nyreskade vil ikke kunne detekteres av de tradisjonelle markørene da de først vil få en økning ved skade på >75% av nefronene (Braun et al., 2003; Zachary et al., 2012). Som sagt vil de gjenværende tubuli ved nefronskader bli kompensatorisk hypertrofiske for å opprettholde en adekvat nyrefunksjon, og derfor vil ikke nyreskade nødvendigvis gi nedsatt nyrefunksjon (Zachary et al., 2012). På grunn av dette er det behov for markører med høyere sensitivitet for mindre endringer i nyreparenkymet, og biomarkører i urin kan benyttes (Hrovat et al., 2013). Urin skal normalt ha et lavt

proteininnhold på grunn av filtrasjonsbarrieren i glomeruli og tubulære reabsorpsjonsmekanismer (De Loor et al., 2013). Proteinuri er tilstedeværelse av proteiner i urin og kan forårsakes av både glomerulær- og tubulær skade (De Loor et al., 2013). Biomarkører i urin kan derfor brukes som verktøy i diagnostikk og forskning for å vurdere lokalisasjon, utbredelse og progresjon av nyreskade (Price, 2002).

Den restriktive permeabiliteten i glomeruluskapillærene avgjør hvilke molekyler som filtreres over i urinen og hvilke som forblir i sirkulasjonen. Proteiner med molekylvekt under 40 kilodalton (kDa) defineres som lavvektsmolekyler (LMW) (Hokamp & Nabity, 2016). Normalt vil LMW og enkelte større molekyler med positiv ladning fritt passere gjennom filtrasjonsbarrieren for så å reabsorberes i proksimale tubuli (Hrovat et al., 2013). Albumin er et protein som hos hund har molekylvekt 66-69 kDa og kategoriseres som et molekyl med intermediær vekt (IMW). Albumin filtreres over glomeruli og reabsorberes i tubuli, og tilstedeværelse i urin kan indikere både glomerulær- og tubulær skade (D'Amico et al., 2003). Molekyler med størrelse >100 kDa defineres som høyvektsmolekyler (HMW) og vil normalt holdes tilbake i sirkulasjonen uten å filtreres (Hokamp & Nabity, 2016). Skader og endringer i filtrasjonsbarrieren kan føre til lekkasje av HMW og IMW, og dermed proteinuri. LMW og IMW kan indikere tubulær skade grunnet redusert eller opphørt reabsorpsjon i tubuli eller lekkasje av intracellulære proteiner fra ødelagte tubuliceller (D'Amico et al., 2003). Med kunnskap om molekylvekten og ladningen til en biomarkør kan dets tilstedeværelse i urin indikere hvor en eventuell skade i nefronet er lokalisert (Hrovat et al., 2013). Bruk av glomerulære- og tubulære markører sammen med de tradisjonelle biomarkørene kan derfor gi oss mer detaljert informasjon om utbredelse og lokalisasjon av nyreskade (Smets et al., 2010).

Det er enkelte faktorer som er viktig å ta hensyn til ved vurdering av forekomst av biomarkører i urin. Hydreringsstatus vil kunne påvirke konsentrasjonen av urin og dermed konsentrasjonen av biomarkører i urin som øker ved oliguri og reduseres ved polyuri. Hunder som får intravenøs væsketerapi vil kunne ha polyuri, men dette avhenger av om væskebehandlingen overstiger vedlikeholdsbehovet. Konsentrasjonen av biomarkører i urin kan derfor underestimeres hos dyr som får intravenøs væsketerapi. For å ta hensyn til dette er det vanlig å benytte seg av ratioen mellom spesifikke biomarkører i urin og kreatinin. Denne metoden antar at produksjon og utskillelse av kreatinin er konstant og at

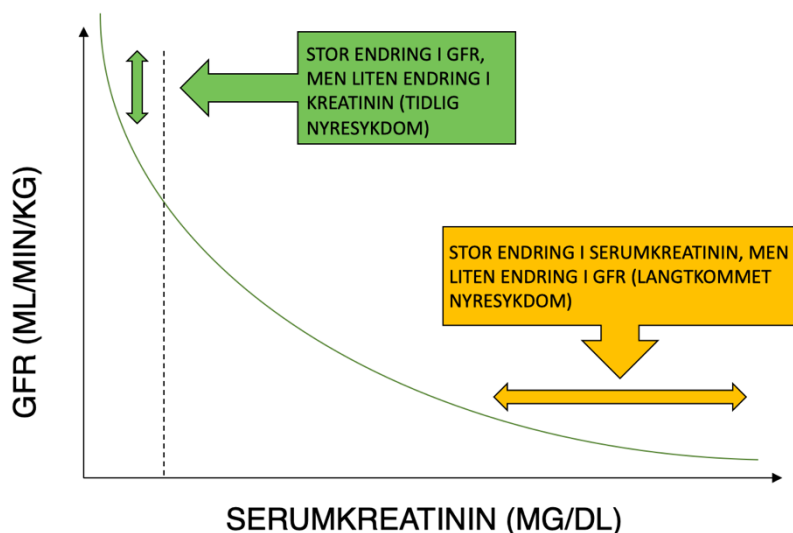
ekskresjonsraten mellom kreatinin og øvrige biomarkører har et lineært forhold. Dette medfører mest sannsynlig ikke fullstendig riktighet da konsentrasjonen av kreatinin blant annet varierer med alder, diett, muskelmasse og skade på tubulært epitel som kan føre til lekkasje av kreatinin tilbake i sirkulasjonen (Waikar et al., 2010).

Ved parallelle målinger av en biomarkør, vil målingene på grunn av biologisk variasjon sjeldent være identiske. Biologisk variasjon deles i interindividuell variasjon, altså variasjon som er mellom individer, og intraindividuell variasjon som er variasjoner hos et enkeltindivid. Årsaker til biologisk variasjon kan være blant annet genetikk, miljø, kjønn og alder (Petrie & Watson, 2013).

## **Kreatinin og urea**

Kreatinin er nedbrytningsprodukt som dannes fra kreatinfosfat fra muskel- og proteinmetabolisme og produseres vanligvis i en konstant rate. Kreatinin elimineres ved glomerulær filtrasjon og det er hos hund ingen signifikant reabsorpsjon eller sekresjon av kreatinin i nyretubuli (Ettinger et al., 2017). På grunn av disse egenskapene er kreatinin den mest brukte biokjemiske markøren i human- og veterinærmedisin som et indirekte mål for GFR. Konsentrasjon av kreatinin i blod øker ved reduksjon i nyrefunksjon og korrelerer med reduksjon i GFR (Braun et al., 2003). Urea er sammen med kreatinin en hyppig benyttet markør for å detektere og monitorere nyreskade, men påvirkes av mange faktorer utenfor nyrene. Det er et lite, vannløselig molekyl som syntetiseres i lever fra bikarbonat og ammonium gjennom ureasyklus (Kaneko et al., 2008). Urea filtreres fritt over glomeruli, men reabsorberes passivt i nyretubuli slik at markøren gir et upålitelig estimat av GFR alene (Ettinger et al., 2017).

Kreatinin og urea er lite sensitive for tidlig nyreskade når GFR ikke reduseres nevneverdig grunnet nyrenes store reservekapasitet (Kaneko et al., 2008; Finco, 1997). Ved reduksjon av funksjonelle nefroner utover 75% vil det bli en økning i konsentrasjon av kreatinin, vanligvis etterfulgt av økning i urea (Braun et al., 2003). Forholdet mellom kreatinin og GFR er eksponentielt. Det vil si at ved tidlige stadier av nyresykdom vil GFR kunne reduseres kraftig uten signifikant økning i serum kreatinin (sCr), men ved uttalt nyreskade vil kun små endringer i GFR føre til større økning i kreatinin (Ettinger et al., 2017).



**Figur 5:** Forholdet mellom serumkreatinin og GFR. Illustrasjonen er reprodusert fra Lefebvre et al., (2015) Relationship between blood creatinine concentration and GFR. Tilgjengelig fra: [http://www.iris-kidney.com/education/creatinine\\_dogs.html](http://www.iris-kidney.com/education/creatinine_dogs.html)

Måling av kreatinin og urea i blod kan være et nyttig diagnostisk verktøy, men biomarkørene har enkelte begrensninger da pre-renale faktorer kan spille en rolle (Grauer, 2005). Urea vil kunne øke ved nyresykdom, men vil også påvirkes av blant annet leverfunksjon, fordøyelse og proteinkatabolisme (Kaneko et al., 2008; Ettinger et al., 2017). Hyperkreatininemi kan oppstå ved markert nedgang i nyrefunksjon, men vil også påvirkes av andre faktorer. Det er stor individuell variasjon i hva som er normal konsentrasjon av kreatinin i serum. Dette vil blant annet påvirkes av muskelmasse da kreatinin er et nedbrytningsprodukt i muskel. Moderat økning i kreatinin kan komme av stor muskelmasse, særlig hos store, atletiske hunderaser som eksempelvis greyhound og trekkhunder. Avmagring og redusert muskelfylde kan gi reduksjon i kreatinin (Lefebvre, 2015). Eksogent kreatinin via absorpsjon fra tarm kan også gi økt konsentrasjon av kreatinin i serum ved inntak av kjøttrike måltider (Kaneko et al., 2008). Dehydrering vil gi en reduksjon i ekstracellulært væskevolum og dehydrering > 5% kan føre til økt konsentrasjon av kreatinin (Lefebvre, 2015). Serum kreatinin (sCr) korrelerer med den totale mengden vann i kroppen og humane studier har vist at væskebehandling derfor gir en fortynning av sCr. Ved væskebehandling av akutt syke pasienter kan den totale mengden vann i kroppen øke med inntil 10%. Alvorlighetsgraden av nyreskade eller -sykdom kan derfor underestimeres når pasienten får intravenøs væsketerapi (Macedo et al., 2010).

Kreatininverdier kan tolkes på ulike måter. Den vanligste metoden som benyttes klinisk er å se på enkeltverdier fra et individ i sammenheng med referanseverdiene gitt av laboratoriet. Dette referanseområdet varierer avhengig av laboratorium og pasientmaterialet de innehar. Om en enkeltprøve er over normalt referanseområde vil ikke dette alene gjøre at vi kan konkludere med at det foreligger nyreskade, men indikere at det er behov for mer diagnostikk for videre vurdering av nyrefunksjon, herunder blant annet USG og urin protein kreatinin-ratio (UPC). En annen mulighet for å tolke nyreskade ved hjelp av kreatinin er å se på flere prøver fra samme pasient og følge trenden over tid. Om prøvetakingen standardiseres kan dette være en god metode for å monitorere nyrefunksjonen over tid, selv innenfor gitte referanseverdier (Lefevbre, 2015). En enkeltmåling av serumkreatinin som er innenfor normalt referanseområde vil ikke legges merke til, men multiple prøver som viser en stigende trend kan indikere utvikling av nyresykdom (Grauer, 2005). En studie viser at selv liten økning i sCr tilsvarer en signifikant reduksjon i GFR hos et individ. En differanse mellom to verdier i sCr, «reference change value» (RCV), er blitt estimert som signifikant dersom det er økning eller reduksjon med 23-27 µmol/L. Gjentatte målinger av sCr kan ved hjelp av dette øke sensitiviteten denne biomarkøren har for tidlig nyresykdom (Hokamp & Nability, 2016).

## **UPC**

UPC er en metode for måling av proteinuri ved hjelp av ratioen mellom forekomsten av proteiner og kreatinin i urin (Ettinger et al., 2017; Idexx, u.å.). En høy UPC-verdi indikerer at det er mer protein enn man forventer i forhold til mengde kreatinin i urinen. UPC er en mer sensitiv og spesifikk metode enn en urinstix-analyse. Kvantitativ måling av proteinuri er nyttig da man vet at høyere nivå av proteiner i urinen sammenfaller med raskere progresjon av CKD (Jacob et al., 2005). UPC kan derfor være en nyttig metode for å kunne si noe om prognose, utvikling og respons på eventuell behandling ved nyresykdom.

UPC gir ikke informasjon om årsaken til om proteinurien er prerenal, renal eller postrenal. Det er derfor viktig å sammenfatte UPC-resultatet med sykdomshistorikken og symptomene dyret viser. En prerenal årsak til proteinuri er unormalt plasmainnhold av proteiner som passerer glomerulære kapillærvegger, som myoglobiner og bence-jones proteiner (Lees et al., 2005). Renal proteinuri er unormal håndtering av plasmaproteiner av nyrene, herunder fysiologiske- og patologiske årsaker. Et funksjonelt opphav til renal proteinuri kan være

pyreksi, mens patologiske årsaker er forårsaket av lesjoner i nyrene. Postrenal proteinuri forårsakes av inflammatoriske tilstander i nedre urinveier som gir lekkasje av serumproteiner grunnet endret karpermeabilitet initiert av inflammatoriske mediatorer (Lees et al., 2005).

Det er ulike tilstander i urinveiene som ikke angår nyrene som kan påvirke resultatet av UPC. Blødning vil kunne påvirke resultatet da blod inneholder serumproteiner som vil kunne gi et falskt positivt utslag. Postrenal proteinuri vil kunne gi en økning i UPC. Derfor bør ikke UPC måles i urin ved påvist hematuri eller urinveisinflammasjon/-infeksjon. Ulike legemidler kan også påvirke UPC, herunder blant annet kortikosteroider (Lees et al., 2005)

For å gjøre en riktig vurdering av hvorvidt proteinuri har en prerenal-, renal eller postrenal årsak må man derfor tolke resultater fra flere analyser i sammenheng. Når det ikke finnes en pre- eller postrenal årsak og det er målt UPC over 0.5 ved tre ulike prøvetidspunkt med to ukers mellomrom, er dette indikasjon på renal proteinuri hos hund (Lees et al., 2005; Lefevbre, 2015). Persisterende proteinuri med UPC-verdi over 2.0 er som regel forårsaket av glomerulær sykdom. Hos hunder med nyresvikt vil det å ha en verdi på 1.0 eller høyere være forenlig med økt sannsynlighet for uremi med høyere morbiditet og mortalitet. (Lees et al., 2005)

## **Mikroalbumin i urin**

Albumin er et vannløselig protein som syntetiseres i leveren og har stor betydning for blant annet det kolloidosmotiske trykket, som gjør at væske holdes tilbake i karene. Slik som tidligere nevnt har albumin en molekylvekt på 66-69 kDa og er negativt ladet, noe som gjør at det normalt vil være lite albumin som filtreres over glomeruli og over i filtratet (De Loor et al., 2013). Tilnærmet alt albumin som kommer over i ultrafiltratet vil ved normal nyrefunksjon reabsorberes i proksimale tubuli (De Loor et al., 2013; Murgier et al., 2009).

Mikroalbuminuri (mAlb) defineres som høyere albuminkonsentrasjon i urin enn hva som anses som normalt (<1 mg/dL) og mindre enn det som kan detekteres ved bruk av konvensjonelle urinstix (>30 mg/dL) når USG er 1.010. Konsentrasjonen av albumin i urin vil påvirkes av USG. Det kan lages en ratio mellom albumin- og kreatininmengden i urin,



eller urinen kan fortynnes til en standardkonsentrasjon slik at konsentrasjonen tas hensyn til (Grauer, 2005).

Forekomsten av mAlb i urinen hos friske hunder er ikke studert, men funn av selv små mengder albumin er ansett som unormalt (Murgier et al., 2009). Det er vist at mAlb er en sensitiv markør for nyreskade, men er lite spesifikk da den også kan øke ved inflammasjon i urinveiene, ekstrem aktivitet og makroskopisk hematuri (Vaden et al., 2004; Gary et al., 2004). Ved sykdom som påvirker glomeruli vil den negative ladningen til basalmembranen reduseres slik at det blir en økt filtrasjon av plasmaproteiner som vanligvis holdes tilbake i sirkulasjonen, samtidig som det blir økt karpermeabilitet (Sjaastad et al., 2016). Unormal ekskresjon av albumin kan også forekomme ved tubulær skade eller når reabsorpsjonskapasiteten i tubuli er mettet (Grauer, 2011). Glomerulær- og tubulær skade kan dermed forårsake eller bidra til mikroalbuminuri, og det er vist at mAlb kan være en god indikator for tidlig glomerulær skade eller -sykdom hos hund (Lees et al, 2005; Pressler, 2013; De Loor et al., 2013). Det finnes per i dag ingen god måte å differensiere mellom om detektert mikroalbuminuri skyldes glomerulær- eller tubulær skade (Lees et al., 2005).

Funn av mAlb i urinen kan, som de tradisjonelle markørene, påvirkes av andre sykdommer. Mikroalbuminuri kan forekomme ved systemiske skader og sykdommer som forårsaker massiv cytokinfrigjøring. De inflammatoriske mediatorene vil påvirke det glomerulære endotelet, gi økt kapillær permeabilitet og føre til lekkasje av plasmaproteiner (De Loor et al., 2013). Hos hunder kan albumin i urin (uAlb) også assosieres med ikke-infeksiøs sykdom, metabolske tilstander og kardiovaskulære lidelser (Grauer, 2011). Det er også vist at intensivpasienter har en høyere forekomst av uAlb uavhengig av sykdomstilstand (Pressler et al., 2001; Whittemore et al., 2003). Konsentrasjonen av uAlb vil kunne øke når blod ses makroskopisk, men det vil vanligvis ikke være en signifikant økning (>1 mg/L) før urinen er uttalt hematurisk (>250 RBC/HPF). Det er ikke observert en sammenheng mellom forekomst av et økt antall hvite blodceller i urinen (pyuri) og økt mAlb-konsentrasjon, men albuminuri forekommer hyppigere hos hunder med samtidig hematuri og pyuri (Vaden et al., 2004). Deteksjon av mikroalbuminuri ved kun én enkelt måling er ikke diagnostisk for nyreskade, men økning i mengden uAlb over tid vil med større sannsynlighet kunne indikere pågående nyresykdom eller -skade (Lees et al., 2005).

Det finnes ulike metoder for å måle kvantiteten av uAlb med varierende sensitivitet og spesifisitet. Blant disse er semikvantitative urinstix, urinprotein elektroforese, immunoturbidometrisk analyse og ELISA. I studier hvor metoder for måling av uAlb sammenlignes benyttes ELISA for verifisering av resultater grunnet sin høye sensitivitet (Murgier et al., 2009).

### **Alternative biomarkører i urin:**

Det er de siste årene forsket mye på alternative markører for å påvise nyresykdom i tillegg til de som allerede er nevnt. Cystatin C og Symmetric dimethylarginine (SDMA) kan være alternative markører for GFR, og studier har vist at disse korrelerer godt med GFR og kan gi en økning ved tidlig nyresykdom. Når tubulicellene skades vil enzymer som vanligvis finnes i børstesømmen eller cytoplasma frigjøres slik at de kan måles i urin. Eksempler på dette er Gamma-glutamyltransferase (GGT), N-acetyl-beta-D-glykosaminidase (NAG) og alkalisk fosfatase (ALP). Disse biomarkørene i urin har vist en økning ved tidlig nyresykdom og indikerer tubulær- eller interstitiell skade. Alternativer til måling av enzymer i urinen er proteiner som uttrykkes på tubuliceller, blant annet nøytrofil gelatinase-assosiert lipocalin (NGAL), som kan gi informasjon om direkte tubulær skade. I tillegg til dette kan inflammatoriske markører som interleukin-8 (IL-8) i urin indikere at det foregår en inflammatorisk prosess i nyrevevet og kan indikere nyreskade (Ettinger et al., 2017; Yerramilli, 2014).

## **Formål**

Målet med oppgaven er å undersøke om huggorbitt hos hund gir en vedvarende nyreskade ved hjelp av biomarkørene mikroalbumin i urin og serumkreatinin. Studien følger åtte hunder bitt av huggorm over tid for å se på endringer av de nevnte biomarkørene over en periode på 5 måneder.

## Materiale og metoder

### Materiale

#### Beskrivelse av gruppene

Denne studien inkluderte åtte hunder bitt av huggorm (kasusgruppen) som ble behandlet ved NMBU Dyresykehuset Smådyr og Anicura Jeløy Dyresykehus i perioden fra 19.04.20 til 14.07.20. Studien inkluderer også åtte hunder rekruttert som kontroller (kontrollgruppen). Gruppen er forsøkt stratifisert slik at alder, vekt, rase og kjønn i så stor grad som mulig skal samsvare med kasusgruppen. Oversikt over fordeling av rasefordeling finnes i tabell 1 og kjønn, alder og vekt i tabell 2.

Tabell 1: Rasefordeling for gruppene.

| RASER KASUSGRUPPE             | N=8 | RASER KONTROLLGRUPPE   | N=8 |
|-------------------------------|-----|------------------------|-----|
| Golden retriever              | 1   | Finsk lapphund         | 1   |
| Pointer                       | 1   | Vorsteh (strihåret)    | 1   |
| Dachshund korthåret/strihåret | 2   | Storpuddel             | 1   |
| Working cocker spaniel        | 1   | Working cocker spaniel | 1   |
| Labrador retriever            | 1   | Labrador retriever     | 2   |
| Schapendoes                   | 1   | Kleiner münsterländer  | 1   |
| Stabyhoun                     | 1   | Engelsk setter         | 1   |

Tabell 2: Fordeling vekt, alder og kjønn for gruppene.

| VARIABEL   | KASUSGRUPPE                        | KONTROLLGRUPPE                     |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|
| VEKT (KG)  | Median: 14,9<br>(range: 10,4-37,4) | Median: 22,25<br>(range 11,5-25,0) |
| ALDER (ÅR) | Median: 4<br>(range: 0,25-5)       | Median: 4<br>(range: 2-7)          |
| KJØNN      | Tisper: 4<br>Hannhunder: 4         | Tisper: 5<br>Hannhunder: 3         |

### Kasusgruppen

#### Inklusjonskriterier

Inklusjonskriterier for kasusgruppen var at eier hadde sett hunden bli bitt av *V. berus* og at den hadde tydelige kliniske tegn. Dersom eier ikke hadde sett hunden bli bitt kunne hunden inkluderes i studien om det var tydelige tegn på forgiftning som følge av huggorbitt som

bittsår, kraftig lokal hevelse, og/eller systemisk påkjenning forenlig med huggorbitt. Eier måtte også signere et samtykkeskjema.

### **Eksklusjonskriterier**

Pasienter ble ekskludert fra studien dersom de hadde en sykdomshistorie av betydning, eller det ble mistenkt annen sykdom ved klinisk undersøkelse. Pasienter ble også ekskludert dersom de stod på systemisk medisinering med enkelte unntak, dersom de hadde blitt utsatt for tørre bitt (manglende hevelse og systemiske tegn 24 timer etter bitt) eller dersom det hadde gått mer enn 24 timer siden bittet.

### **Behandling**

Alle hundene i kasusgruppen ble hospitalisert ved NMBU Dyresykehuset Smådyr eller Anicura Jeløy Dyresykehus, og median hospitaliseringstid var 2 dager (variasjonsbredde 2-4). Alle ble behandlet med krystalloider intravenøst (Ringer acetat) ved hospitalisering, med en median væskeinfusjonshastighet på 4 ml/kg/time (variasjonsbredde 4-6). En av åtte hunder fikk antivenin. Analgesi inkluderte metadon (Metadon, Norges apotek) 0.1-0.2 mg/kg q 3-4 (n=4), buprenorfin (Vetergesic vet, Ceva Santé Animale, Frankrike) 0.01-0.02 mg/kg q 6-8 (n=3) eller begge deler i løpet av behandlingsperioden (n=1). En av åtte hunder fikk antibiotikabehandling (ampicillin 25 mg/kg q 8). Tre av åtte hunder fikk kvalmestillende (maropitant 1 mg/kg q 24) på grunn av symptomer på kvalme og oppkast. En av åtte hunder fikk Zoolac (etter anvisning på pakken). Ingen av hundene i kasusgruppen fikk NSAIDs eller kortikosteroider i hospitaliseringsperioden.

### **Datainnsamling**

Det ble tatt prøver av kasusgruppen ved opptil fem tidspunkter:

- Ved ankomst (T1),
- 24 timer etter bitt +/-2 t (T2),
- Ca. 14 dager etter bitt (T3),
- Ca. 2 måneder etter bitt (T4)
- Ca. 5 måneder etter bitt (T5).

For å sikre standardisert prøveuttak ble det utarbeidet en protokoll for studien, med tilhørende forhåndspakkede sett med prøvetakingsutstyr. Ved T2 ble det tatt ut to serumglass med koagulasjonsaktivator ved hjelp av vacutainer og kanyler av passende størrelse, fra beste tilgjengelig vene (v. jugularis, v. cephalica, v. saphena). Serumglass måtte stå på benken i 30 min før de ble sentrifugert på 2000 G i 10 minutter. Prøvene ble merket og lagt i ultrafryser på -80°C. Urinen ble samlet opp i rent plastbekken og så overført til tre ulike rør ved hjelp av glasspipette: et for umiddelbar analyse (standard urinanalyse som inkluderte USG, urinstix- og sedimentanalyse) og to ble oppbevart ved -80°C for analyse av UPC og mikroalbumin. Grunnen til at prøvene ble fryst i to alikvoter var for å unngå degradering av proteiner ved unødvendig tining og frysing. Det ble ikke gjort dyrkning av urinen.

## **Kontrollgruppen**

Inklusjonskriterier for kontrollgruppen var at eier måtte samtykke til bruk av hunden til studien skriftlig og hunden måtte ha serum biokjemisk analyse og urinanalyse (inkludert UPC) uten avvik av betydning. Eksklusjonskriterier for gruppen var sykdom av betydning basert på anamnese og generell klinisk undersøkelse, tidligere huggorbitt eller bruk av systemisk medisinering med enkelte unntak. Det tatt ut prøver av kontrollgruppen ved to ulike tidspunkter:

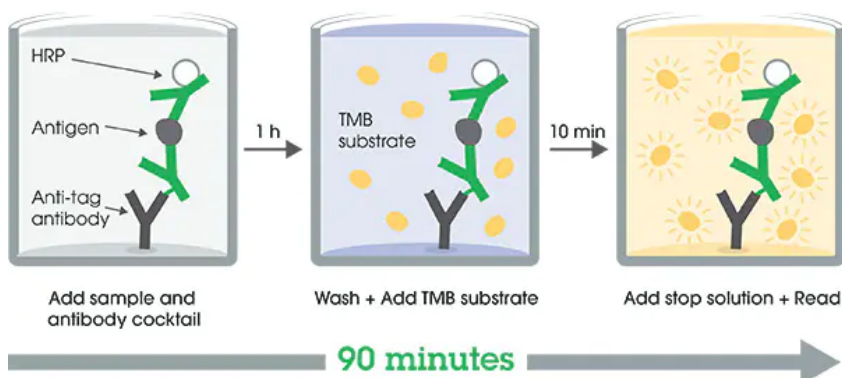
- Høsten 2020 (K1)
- 4-6 måneder etter første prøveuttak (K2).

Prøvematerialet fra kontrollgruppen inkluderer serumanalyse med biokjemi og CRP, samt urinprøve med urinspesifikk vekt, urinstix og sedivue. Det ble ikke foretatt dyrkning av urinen. Prøveuttaket for kontrollgruppen ble foretatt på en standardisert måte slik som beskrevet for kasusgruppen.

## Metoder

### Canine albumin ELISA sett

For å undersøke mengden albumin i urinen til hundene i studien ble det benyttet et kommersielt tilgjengelig sett basert på ELISA, produsert av Abcam (Cambridge, Storbritannia). Metoden som benyttes i dette settet er en kvantitativ kolorimetrisk direkte sandwich ELISA og kan benyttes til å måle albumin i serum, urin og i cellekulturer. Det består av en mikroplate med 96 brønner som er forhåndsbehandlet med et antistoff. Dette antistoffet skal binde antigenet slik som illustrert i figur 6, som i denne studien er albumin i urin. Deretter tilsettes det et nytt enzym-bundet antistoff som skal binde til et annet epitop på antigenet. Deretter tilsettes et substrat (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) spesifikt for enzymet pepperrotssperoksidase (horseradish peroxidase, HRP) som gir en fargeforandring ved positiv reaksjon.

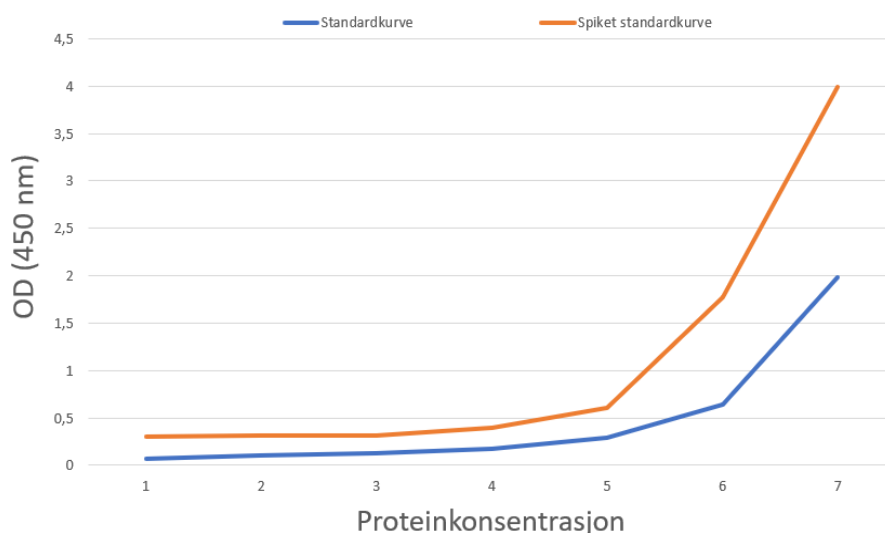


**Figur 6:** Canine Albumin ELISA Kit (ab277078): SimpleStep ELISA Protocol Diagram. Tilgjengelig fra: <https://www.abcam.com/canine-albumin-elisa-kit-ab277078.html#lb>. Gjengitt med tillatelse. (lest 29.04.2022)

Etter inkubering tilsettes en stoppreagens som hindrer enzymet i å produsere ytterligere blå farge. Optical density (OD) er et mål på en løsningsabsorbans når en gitt mengde lys (her 450 nm) sendes gjennom prøven. Prinsippet kalles kolorimetri der lysmengde absorbert korrelerer med konsentrasjonen av løsningen.

Før bruk av settet med prøver til studien, ble det benyttet et testsett for å finne egnede fortynninger, samt øve på prosedyren. Leverandøren anga at prøvene bør fortynnes minimum 1:4000. Det ble benyttet prøvemateriale fra tre ulike hunder med antatt ulik konsentrasjon av albumin i urin, herunder én med antatt lavgradig nyresykdom, én under behandling med intravenøs væske og én klinisk frisk hund. Bakgrunnen for at dette ble gjort

var å finne en fortytning som i størst mulig grad inkluderer alt prøvematerialet. I settet medfølger en løsning med kjent albuminkonsentrasjon slik at man kan utvikle en standardkurve som beskriver relasjonen mellom absorbanse og konsentrasjonen av mikroalbumin i urinen. Konsentrasjonen av mikroalbumin i prøvematerialet er ukjent og man kan derfor benytte standardkurven og absorbanse for å kvantifisere innholdet i prøven. For å vurdere kvaliteten og nøyaktigheten til ELISA-settet ble det laget et duplikat av standardkurven der det ble tilsatt en gitt mengde prøvemateriale for å se om kurven ble parallell med standardkurven, såkalt «spiking». Resultatet av denne undersøkelsen viser at prøvematerialet som tilsettes ikke interfererer med innholdet i settet og styrker derfor settets pålitelighet slik som illustrert i figur 7.



**Figur 7:** Illustrasjon av «spiket» standardkurve.

For å kunne beregne konsentrasjonen albumin i prøvene ved hjelp av OD, ble det laget en kurve med OD på y-aksen og proteinkonsentrasjon på x-aksen. Et dataprogram ble benyttet til å ta frem en ligning som beskrev sammenhengen mellom OD og proteinkonsentrasjonen. Konsentrasjonen i prøven ble videre justert med tanke på fortytning. Verdiene som havnet utenfor standardkurven ble fortynnet ytterligere.

Det ble totalt kjørt fem ELISA-sett, inkludert testsettet. Settene ble kjørt slik som beskrevet i leverandørens protokoll og prøvematerialet ble behandlet på en standardisert måte.

Urinprøvene ble tint, vendt og sentrifugert i 10 min på 2000G i romtemperatur. Det eneste avviket til prøvematerialet var at H5 sin T2-prøve hadde noe debris sammenliknet med de andre prøvene. Ved pipettering ble det forsøkt å unngå debriset, men dette ble allikevel



notert som et avvik. Det ble i utgangspunktet laget en standardkurve for hvert sett. Standardkurven fra sett to hadde det mest tilfredsstillende resultatet og ble derfor benyttet for videre prosessering av data. Hver urinprøve ble analysert to ganger og et gjennomsnitt av disse ble brukt for beregning av albuminkonsentrasjon.

### **Måling av kreatinin i serum**

Serumet ble sendt inn til Sentrallaboratoriet for analyse. Jaffés metode ble benyttet for måling av kreatinin i serum. Dette er en kolorimetrisk metode som benytter reaksjon mellom kreatinin og alkalisk pikrat i et alkalisk miljø. Det blir dannet en farget komponent som brukes til å måle mengden kreatinin i prøven. Graden av fargeforandringen er direkte proporsjonal med konsentrasjonen av kreatinin (Ettinger et al., 2017).

### **Reference change value**

Basert på målingene av kreatinin i serum som nevnt over ble RCV kalkulert mellom to påfølgende prøvetidspunkt.

### **UPC**

Det er ulike metoder for å måle totalprotein og kreatinin i urin. I dette studiet er kreatinin i urin målt ved hjelp av Jaffés metode slik som beskrevet ovenfor. Totalprotein kvantifiseres ved å måle endring i absorpsjon når pyrogallol-rød molybdate-kompleks bindes til protonerte basiske aminogrupper i sur pH.

### **Urinprøver**

For urinstix-analyse er det benyttet IDEXX UA strips (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) og IDEXX Vetlab UA analyser (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA). USG er målt med et refraktometer (URC-Ne; Atago, Tokyo, Japan). Til analyse av sediment er IDEXX SediVue dx (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) benyttet.

## **Statistiske metoder**

Studien er en longitudinell kohortstudie med fem målinger av kasusgruppen. Statistiske analyser ble gjort ved å bruke Jamovi ([www.jamovi.org](http://www.jamovi.org)) og Excel (Microsoft 365).

Det ble benyttet en ratio mellom urin-Albumin og urin-Kreatinin (uACR), for at analysen av urinens albumininnhold skulle bli uavhengig av urinens konsentrasjon og dermed få sammenlignbare verdier. Urinkreatininverdien ble hentet fra UPC-analysen. Prøvene tatt ved hvert tidspunkt, samt kontrollene ble fremstilt grafisk med boksdiagram for å undersøke om materialet var normalfordelt. Dette ble undersøkt videre ved at gjennomsnitt og median ble sammenlignet.

Ved signifikanstesting ble prøvetidspunkt 2, T2 for kasusgruppen sammenlignet med prøvetidspunkt 1 for kontrollgruppen, K1. Det ble utført en Mann Whitney-test. Dette er en ikke-parametrisk test som gjør at man kan sammenligne to grupper som ikke har normalfordelte verdier. Forskjellen vurderes som signifikant dersom  $p < 0.05$ , og nullhypotesen kan forkastes.

Datamaterialet ble videre analysert med deskriptiv statistikk. Kruskal-Wallis test ble benyttet for å vurdere utviklingen av de ulike parameterne blant kasushundene. Dette er en ikke-parametrisk test som benyttes for å sammenligne to, eller flere grupper. En signifikant Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ) indikerer at det er minst en av gruppene som skiller seg fra de andre, men ingenting om hvilken gruppe det er som skiller seg ut.

## Resultater

### Urinprøver

Som beskrevet tidligere ble det tatt ut urinprøver av kasus- og kontrollgruppen for umiddelbar analyse med USG, urinstick-analyse og sedivue. Tabell 3 illustrerer resultatet av analysene.

**Tabell 3:** Tabell over resultat av 29 prøver fra åtte individer fra kasusgruppen og 16 prøver fra åtte individer fra kontrollgruppen. USG er målt med refraktometer. Protein, blod og pH er analysert ved hjelp av urinstix og urinens farge er subjektivt vurdert.

|  | KASUS   | KONTROLL  |
|--|---|---|
| <b>MEDIAN USG VED INTRAVENØS VÆSKETERAPI</b> | 1.011 (Range: 1.007-1.033)  |   |
| <b>MEDIAN ØVRIG</b>                          | 1.043 (Range: 1.022-1.053)  | 1.045 (Range 1.012-1.060)   |
| <b>GJENNOMSNITTLIG PH</b>                    | 7,2   | 6   |
| <b>FARGE</b>                                 | Strågul 5 av 29<br>Lys gul 17 av 29<br>Mørk gul 7 av 29<br><br>Ingen hadde makroskopisk hematuri.   | Strågul 3 av 16<br>Lys gul 7 av 16<br>Mørk gul 6 av 16<br><br>Ingen hadde makroskopisk hematuri.                                |
| <b>PROTEIN</b>                               | 1 av 29 hadde spor av protein<br>1 av 29 hadde 30 mg/dl protein   | 1 av 16 hadde spor av proteiner   |
| <b>BLOD</b>                                  | 8 av 29 prøver hadde mikroskopisk hematuri, derav:<br>- 4 av 8 var 10 ery/uL<br>- 1 av 8 var 25 ery/uL<br>- 2 av 8 var 50 ery/uL<br>- 1 av 8 var 250 ery/uL | 4 av 16 hunder hadde mikroskopisk hematuri, derav<br>- 1 av 4 var 10 ery/uL<br>- 2 av 4 var 25 ery/uL<br>- 1 av 4 var 50 ery/uL |

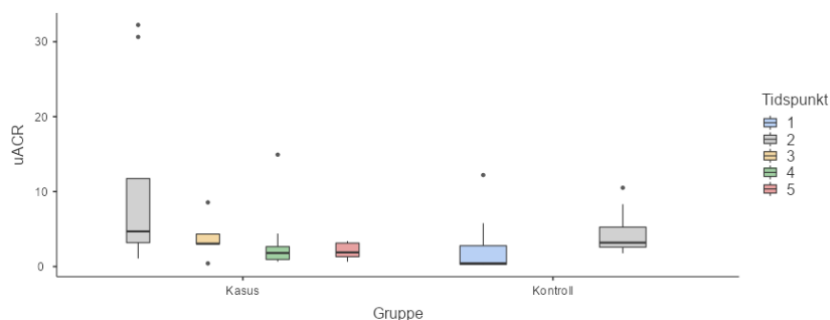
Det ble totalt samlet inn 29 urinprøver fra kasushundene, fordelt på fire tidspunkter. Det var kun mulig å få prøvemateriale fra et kasus ved ankomst til klinikken (T1), men denne verdien ble ekskludert fra prøvematerialet da en enkeltverdi alene ikke kan brukes som sammenligningsgrunnlag. Det er derfor ikke oppført verdier for prøvetidspunkt T1 for kasusgruppen. Videre mangler det prøveresultater fra tre i kasusgruppen ved prøvetidspunkt T3. Tabell 4 gir en oversikt over det innsamlede datamaterialet, sortert etter gruppetilhørighet.

**Tabell 4:** Innsamlet datamateriale fra Hund 1-16, sortert etter gruppetilhørighet. Tidspunktene 1-5 for kasusene representerer urin- og blodprøver innsamlet ved ankomst (1), ca. 24t etter bitt (2), ca. 14 dager etter bitt (3), ca. 2 måneder etter bitt (4) og ca. 5 måneder etter bitt (5). Tidspunkt 1-2 for kontrollene representerer prøvematerialet innsamlet høsten 2020 (1) og 4-5 måneder etter første prøveuttak (2).

| KASUS/KONTROLL | PRØVETIDSPUNKT |    |   |   |   |          |
|----------------|----------------|----|---|---|---|----------|
| HUND 1-16      | 1              | 2  | 3 | 4 | 5 | TOTALSUM |
| KASUS          |                | 8  | 5 | 8 | 8 | 29       |
| 1              |                | 1  |   | 1 | 1 | 3        |
| 2              |                | 1  | 1 | 1 | 1 | 4        |
| 3              |                | 1  |   | 1 | 1 | 3        |
| 4              |                | 1  | 1 | 1 | 1 | 4        |
| 5              |                | 1  | 1 | 1 | 1 | 4        |
| 6              |                | 1  |   | 1 | 1 | 3        |
| 7              |                | 1  | 1 | 1 | 1 | 4        |
| 8              |                | 1  | 1 | 1 | 1 | 4        |
| KONTROLL       | 8              | 8  |   |   |   | 16       |
| 9              | 1              | 1  |   |   |   | 2        |
| 10             | 1              | 1  |   |   |   | 2        |
| 11             | 1              | 1  |   |   |   | 2        |
| 12             | 1              | 1  |   |   |   | 2        |
| 13             | 1              | 1  |   |   |   | 2        |
| 14             | 1              | 1  |   |   |   | 2        |
| 15             | 1              | 1  |   |   |   | 2        |
| 16             | 1              | 1  |   |   |   | 2        |
| TOTALSUM       | 8              | 16 | 5 | 8 | 8 | 45       |

## Konsentrasjon av albumin i urinen hos hunder bitt av huggorm sammenlignet med kontrollgruppen

Figur 8 viser et boksdiaagram som illustrerer uACR fordelt på tidspunkt for de respektive gruppene. Dette viser at enkelte verdier for kasusgruppen T2 skiller seg fra resterende data ved det tidspunktet, samt at det generelt er mer spredning av i datamaterialet her enn ved øvrige prøvetakingstidspunkt. Variasjonsbredde ved T2 for kasusene var 31.2 mens tilsvarende hos kontrollene var 12.0 og 8.73. I tillegg til dette er medianen høyere ved prøvetidspunkt T2 sammenlignet med resterende data. Dette illustreres i tabell 5 med en oversikt over median og variasjonsbredde hos kasus- og kontrollgruppen.



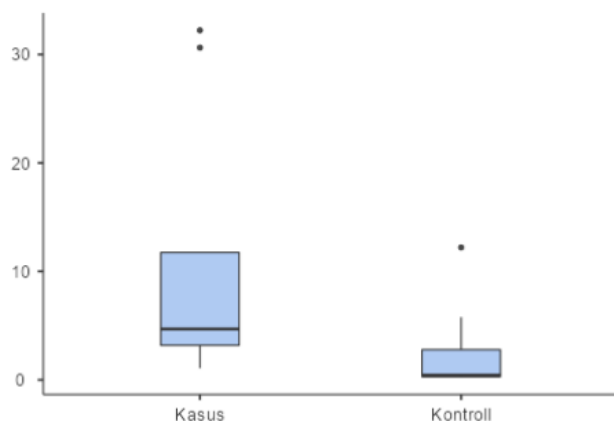
**Figur 8:** Boksdiagram som illustrerer uACR for kasus- og kontrollgruppene.

For å se om det er signifikant forskjell mellom kasusgruppen (T2) og kontrollgruppen (K1) ble en Mann-Whitney test utført. Ved Mann-Whitney test mellom prøvetidspunkt T2 for kasusgruppen og prøvetidspunkt K1 for kontrollgruppen ble p-verdien beregnet til 0.05 som illustrert i tabell 9.

**Tabell 5:** Gjennomsnitt, median og variasjonsbredden til kasus- og kontrollgruppene. Tidspunktene 1-5 slik som beskrevet for tabell 4.

| uACR                              | 1                    | 2                   | 3                   | 4                   | 5                   |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>GJENNOMSNI TT KASUS</b>        |                      | 10,6                | 3,88                | 3,43                | 2,09                |
| <b>GJENNOMSNI TT KONTROLL</b>     | 2,68                 | 4,55                |                     |                     |                     |
| <b>MEDIAN KASUS</b>               |                      | 4,69                | 3,05                | 1,81                | 1,89                |
| <b>MEDIAN KONTROLL</b>            | 0,431                | 3,19                |                     |                     |                     |
| <b>VARIASJONSBREDD E KASUS</b>    |                      | 31,2<br>(1,07-32,2) | 8,14<br>(0,42-8,56) | 14,3<br>(0,66-14,9) | 2,75<br>(0,65-3,39) |
| <b>VARIASJONSBREDD E KONTROLL</b> | 12,0<br>(0,248-12,2) | 8,73<br>(1,77-10,5) |                     |                     |                     |

Figur 9 illustrerer at medianen for uACR hos kasusgruppen er høyere enn hos kontrollgruppen, samt at det foreligger en større spredning.



**Figur 9:** Boksdiagram som illustrerer sammenligning av uACR ved prøvetidspunkt T2 for kasus og K1 for kontroll.

## Utvikling i kreatininkonsentrasjon i serum hos hunder bitt av huggorm sammenlignet med kontrollgruppen

Det var ingen av hundene som hadde en konsentrasjon av kreatinin i serum som overgikk den øvre grensen i referanseintervallet (110  $\mu\text{mol/L}$ , Sentrallaboratoriet). Gjennomsnitt og median for kasusgruppen illustreres i tabell 6 og for kontrollgruppen i tabell 7.

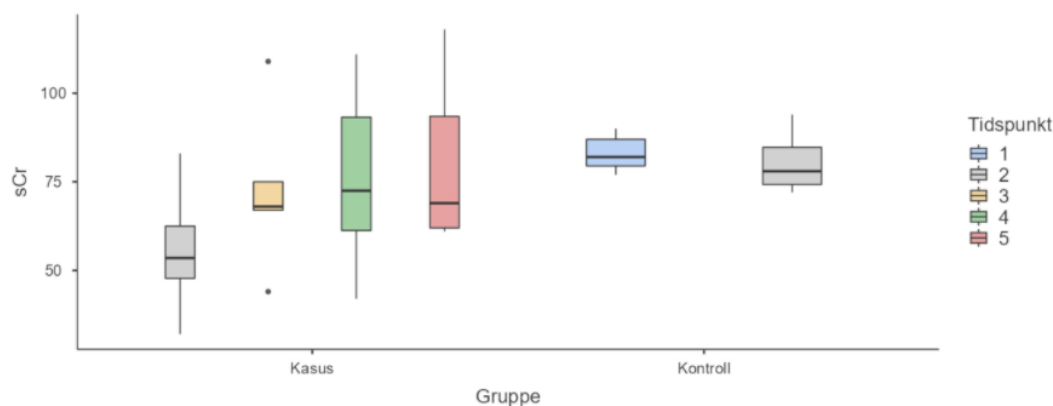
Tabell 6: Tabell som illustrerer sCr hos kasusgruppen oppgitt i  $\mu\text{mol/l}$ .

| KASUS                | 2      | 3    | 4     | 5      |
|----------------------|--------|------|-------|--------|
| <b>HUND 1-8</b>      |        |      |       |        |
| 1                    | 61     | 75   | 92    | 87     |
| 2                    | 55     | 67   | 67    | 62     |
| 3                    | 38     |      | 42    | 61     |
| 4                    | 52     | 75   | 78    | 74     |
| 5                    | 67     |      | 97    | 118    |
| 6                    | 83     | 109  | 111   | 113    |
| 7                    | 32     | 44   | 56    | 64     |
| 8                    | 51     | 68   | 63    | 62     |
| <b>GJENNOMSNIITT</b> | 54,875 | 73   | 75,75 | 80,125 |
| <b>MEDIAN</b>        | 53,5   | 71,5 | 72,5  | 69     |

Tabell 7: Tabell som illustrerer sCr hos kontrollgruppen oppgitt i  $\mu\text{mol/l}$ .

| KONTROLL             | 1      | 2  |
|----------------------|--------|----|
| <b>HUND 1-8</b>      |        |    |
| 1                    | 90     | 94 |
| 2                    | 80     | 87 |
| 3                    | 86     | 78 |
| 4                    | 80     | 72 |
| 5                    | 78     | 72 |
| 6                    | 84     | 84 |
| 7                    | 77     | 75 |
| 8                    | 90     | 78 |
| <b>GJENNOMSNIITT</b> | 83,125 | 80 |
| <b>MEDIAN</b>        | 82     | 78 |

Figur 10 viser boksdiagram for utvikling av sCr-konsentrasjon hos kasusgruppen og denne illustrerer stor spredning for verdiene ved T4 og T5.



**Figur 10:** Boksdiagram som illustrerer konsentrasjonen kreatinin i serum hos kasus- og kontrollgruppen ved de ulike tidspunktene.

Tabell 8 viser differansen i sCr mellom prøvetidspunktene, også kjent som «reference change value». En økning 23-27  $\mu\text{mol/L}$  indikerer stigning i sCr. Det er tre verdier (23, 26 og 30) som befinner seg i dette intervallet eller høyere.

**Tabell 8:** Tabell som illustrerer RCV for utvikling i sCr hos hundene i kasusgruppen. \* angir verdiene for differansen mellom prøvetidspunkt T2 og T4 da T3 mangler for de aktuelle hundene.

| HUND | T2-T3 | T3-T4 | T4-T5 |
|------|-------|-------|-------|
| 1    | 17    | -5    | -1    |
| 2    | 14    | 17    | -5    |
| 3    |       | 4*    | 19    |
| 4    | 26    | 2     | 2     |
| 5    |       | 30*   | 21    |
| 6    | 12    | 0     | -5    |
| 7    | 12    | 12    | 8     |
| 8    | 23    | 3     | -4    |

For å se på utvikling av kreatinin for kasusgruppen ble det gjennomført en ikke-parametrisk Anova-test (Kruskal Wallis), som resulterte i en p-verdi på 0.093 som illustreres i tabell 9.

**Tabell 9:** Resultatet av signifikanstesting med Kruskal wallis test for sCr og Mann-Whitney test for uACR.

| VERDI       | TEST                   | P-VERDI |
|-------------|------------------------|---------|
| sCR (KASUS) | Anova (Kruskal Wallis) | 0.093   |
| uACR        | Mann-Whitney           | 0.05    |

## **Diskusjon**

I denne studien ble det funnet forøket median for uACR ( $p=0,05$ ) 24 timer hos hunder bitt av huggorm sammenliknet med friske kontrollhunder. Det ble ikke påvist forskjeller i sCr eller langtids effekter av huggorbitt på nyrene.

## **Mikroalbuminuri**

Resultatene for uACR viser både høyere median og høyere gjennomsnitt for prøvetidspunkt T2 for kasusgruppen sammenliknet med prøvetidspunkt K1 for kontrollene. Medianen for prøvetidspunkt T2 skiller seg også ut som høyere enn de øvrige prøvetidspunktene for kasusgruppen (T3-T5). Ved prøvetidspunkt T2 er det to verdier som utmerker seg som ekstremverdier illustrert i boksdiagram i figur 9. Prøvetidspunkt T2 ble benyttet til sammenlikning med kontrollgruppen. Grunnen til dette er at det er da det er størst sannsynlighet for at det foreligger akutt nyreskade. (Harjen et al., 2021). Tidspunktet var og det som utmerket seg mest i figur 7. Nullhypotesen i denne studien er at det ikke er forskjell mellom kasus- og kontrollgruppen. Sammenlikning av prøvetidspunkt T2 og prøvetidspunkt K1 gir en  $p=0,05$ . Dette er helt på grensen til hva som er konvensjonell verdi for å forkaste nullhypotesen ( $p<0,05$ ). Det er viktig å tolke resultatene med forsiktighet med tanke på at studiepopulasjonen er liten, og de to ekstremverdiene får dermed en større innvirkning på resultatet.

Mikroalbumin i urin er ansett som en sensitiv biomarkør for glomerulær og tubulær skade hos hund, men med lavere spesifisitet (De Loor et al., 2013). Samlet sett kan resultatene for uACR ved prøvetidspunkt T2 gi en indikasjon på at det foreligger nyreskade cirka 24 timer etter huggorbitt da medianen for dette tidspunktet er høyere enn øvrige kontrolltidspunkt for kasusgruppen, og fordi p-verdien er helt på grensen til hva som normalt legges til grunn for å forkaste en nullhypotese. Det foreligger også to ekstremverdier på prøvetidspunkt T2 som vil kunne indikere at disse individene har en større grad av nyreskade enn øvrige individer i kasusgruppen på dette tidspunktet. Det er i en tidligere studie identifisert kortvarig og ikke-azotemisk akutt nyreskade hos hunder bitt av huggorm ved hjelp av enzymatiske biomarkører i urin, herunder blant annet GGT, NGAL og IL-8 (Harjen et al., 2021). Disse biomarkørene har ikke blitt benyttet i denne studien, men det er viktig å bemerke seg at resultatet og tidspunktet for økning av biomarkører sammenfaller. Det finnes



per i dag ingen konkluderende studier som undersøker forekomsten av uAlb hos hunder bitt av *Vipera berus*, men det er vist at hunder bitt av slangearter med gift som har cytotoksiske egenskaper får en signifikant økning i uAlb (Hrovat et al., 2013). Boksdiagrammet i figur 8 illustrerer at uACR-konsentrasjonen har sunket fra prøvetidspunkt T2 til T3, og at de øvrige tidspunktene (T3-T5) ikke skiller seg fra kontrollgruppen. Dette kan indikere at en eventuell nyreskade som foreligger cirka 24 timer etter huggorbitt er forbigående og at en langsiktig nyreskade ikke kan påvises i denne studien.

Konsentrasjonen av uAlb vil kunne påvirkes av blant annet systemiske inflammatoriske tilstander med stor cytokinfrigjøring, hematuri og pyuri (Vaden et al., 2004; De Loor et al., 2013). Ved huggorbitt vil det i tidlig fase frigjøres store mengder inflammatoriske mediatorer som kan tenkes å påvirke uAlb-konsentrasjonen grunnet økt kapillær permeabilitet (Bickler, 2020). T2 er det tidspunktet det er forventet at det forekommer en systemisk inflammasjon (Bickler, 2020). Det er grunnet dette vanskelig å avgjøre om økningen som ses i uAlb-konsentrasjon skyldes at det foreligger en faktisk nyreskade på dette tidspunktet eller om dette er resultat av en systemisk inflammasjonsprosess.

Molekylvekt og ladning til en biomarkør i urin kan indikere hvor en skade i nefronet er lokalisert (Hrovat et al., 2013). Albumin er et intermediærvektet molekyl og det er dermed ikke mulig å skille om mikroalbuminuri forårsakes av glomerulær- eller tubulær skade (Lees et al., 2005). I denne studien er det ikke benyttet andre biomarkører som kunne bidratt til å lokalisere nyreskade. Det er dog tidligere vist at hunder bitt av huggorm får tubulær skade ved hjelp av et panel av biomarkører (Harjen et al., 2021).

Det er vist i studier at samtidig pyuri og hematuri kan gi økning i uAlb-konsentrasjonen (Vaden et al., 2004). En av hundene i kasusgruppen har samtidig lavgradig pyuri og hematuri ved prøvetidspunktene T3 og T4. Denne hunden har den høyeste verdien uACR blant kasushundene ved prøvetidspunkt T3, men ved dette tidspunktet foreligger det kun prøvemateriale fra 5 av hundene. Ved en vurdering over tid av denne hundens prøveresultater ses en markant reduksjon av uACR-verdi fra prøvetidspunkt T2 til T3, og ved prøvetidspunkt T4 ligger denne hundens verdi nært median og utmerker seg ikke nevneverdig. Det er derfor vanskelig å vurdere om samtidig pyuri og hematuri har hatt en

betydelig påvirkning på resultatet. Resultatet fra denne hunden anses ikke som ekstremverdier og har på bakgrunn av dette ikke blitt ekskludert fra studien. Urinstix-analysen for kontrollene viser at 4 av 8 hunder ved prøvetidspunkt K2 har mikroskopisk hematuri av varierende grad, men ingen av prøvene hadde makroskopisk hematuri. Det er tidligere vist i studier at mikroskopisk hematuri uten pyuri alene ikke vil gi økning i uACR, men det kan heller ikke utelukkes at dette kan ha hatt en innvirkning (Vaden et al., 2004).

Ved sammenligning av kasusgruppen med kontrollgruppen avhenger resultatet av hvilke av prøvetidspunktene som benyttes for kontrollgruppen, K1 eller K2, da det ses en økning i uACR fra prøvetidspunkt K1 til K2. Medianen for prøvetidspunkt K2 ligger høyere enn medianen for prøvetidspunkt T3, T4 og T5 for kasusgruppen. Dette kan tolkes dithen at det ikke er en betydelig forskjell mellom prøvetidspunkt T3-T5 for kasusene sammenlignet med prøvetidspunkt K2 for kontrollgruppen. Imidlertid er medianen ved prøvetidspunkt K1 den laveste observert, sammenlignet med alle tidspunkt for kasusgruppen. Blant kontrollene er det i tillegg to hunder som utmerker seg på prøvetidspunkt K2 med høyere uACR-verdier. Når studiepopulasjonen er liten er det vanskelig å konkludere med om det faktisk foreligger forskjeller mellom kasus- og kontrollgruppen, og i hvilken grad biologisk variasjon påvirker resultatet.

## **Utvikling i serumkreatinin**

Resultater for målinger av sCr-konsentrasjonen hos kasusgruppen viste at ingen hunder i studien hadde sCr-verdi utover laboratoriets referanseverdier. Figur 10 illustrerer en svakt økende trend i median fra prøvetidspunkt T2 til T4, men også stor spredning i prøvematerialet for kasusgruppen. Ved testing om det er signifikant forskjell i sCr-konsentrasjon ved de ulike prøvetidspunktene ble dette avkreftet ( $p=0.093$ ). Det bør dog poengteres at den store spredningen ved prøvetidspunkt ved T4 og T5 og de små gruppestørrelse gjør det vanskelig å vurdere om det foreligger reelle forskjeller i sCr-verdier.

Ved enkeltmålinger av kreatinin i serum fra et individ sett i sammenheng med referanseverdier kan lavgradig nyreskade overses, men ved bruk av gjentatte målinger kan

utviklingen evalueres over tid (Lefevbre, 2015). Når medianverdiene for kasusgruppen studeres kan det fremstå som at det foreligger en positiv trend mellom prøvetidspunkt T2-T4. Serum kreatinin er vist å korrelere med den totale mengden vann i kroppen og vil derfor kunne underestimeres hos pasienter som får, eller nylig har fått, intravenøs væskebehandling (Macedo et al., 2010). Konsentrasjonen av sCr ved prøvetidspunkt T2 er antakeligvis kunstig lav grunnet pågående væsketerapi. Det mangler prøvemateriale for T1, som er prøvetidspunktet like etter bitt og før væsketerapi, på samtlige hunder i kasusgruppen. Uten denne verdien er det vanskelig å vurdere om det foreligger en reell økende trend. Dersom en tidligere blodprøve hadde blitt analysert av disse hundene i forbindelse med for eksempel en helsesjekk hadde det vært aktuelt å bruke dette som en basalverdi. Dette var dessverre ikke tilgjengelig.

I en studie som er gjort av 53 hunder bitt av huggorm i Sverige påvises en synkende trend i sCr-konsentrasjon fra ankomsttidspunkt til cirka 24 timer med væskebehandling (Lervik et al., 2010). Dette bidrar til å styrke antakelsen om at sCr-konsentrasjonen blir kunstig lav etter væskebehandling. Resultatene for uACR samsvarer med tidligere studier som har vist en ikke-azotemisk AKI etter huggorbitt, og kreatinin som biomarkør vil ikke få en økning utover gitt referanseområde før et nefrontap >75% foreligger (Braun et al., 2003; Zachary et al., 2012). På tross av dette kan RCV avdekke om det foreligger en differanse utover hva som forventes av biologisk variasjon mellom målinger (Hokamp & Nabity, 2016). Konsentrasjon av sCr hos et individ kan påvirkes av individuelle faktorer, herunder blant annet hold, muskelmasse og diett (Lefevbre, 2015). Tabell 8 viser at tre verdier som overgår RCV, men disse verdiene er dog målt fra prøvetidspunkt T2 som kjent er kunstig lav grunnet intravenøs væsketerapi, og kan derfor ikke vektlegges betydelig. Det observeres ingen endringer fra prøvetidspunkt T3 og påfølgende prøvetidspunkt som overgår RCV.

## **Behandlingsregimets innvirkning på nyreskade**

Primærbehandlingen av AKI innebærer behandling av den underliggende årsaken til nyreskade, samt væskebehandling. Adekvat væskebehandling i akutfasen er viktig for å forhindre hypovolemi og sikre tilstrekkelig blodsirkulasjon til nyrene for god oksygenleveranse til vevet og opprettholdelse av GFR (Langston & Gordon, 2021). Alle hundene i studiepopulasjonen har vært pasienter ved klinikker på Østlandet som har

mulighet for døgnoppstalling og alle i kasusgruppen har fått intravenøs væsketerapi over cirka 48 timer. En nyere studie anslår at væskebehandling etter huggorbitt bør foregå over minst 36 timer (Harjen, 2021). Langt ifra alle klinikker i Norge har mulighet å tilby oppstillingsfasiliteter på nattestid, og langvarig væskebehandling er dermed ikke mulig. Det er heller ikke alle eiere som har økonomi til, eller ønske om, å gjennomføre et så omfattende behandlingsforløp.

Som tidligere nevnt kan det hos kasusgruppen se ut som det foreligger en grad av nyreskade cirka 24 timer etter bitt. Konsentrasjonen av uACR synker og nyrefunksjonen ser ut til å normaliseres ved kontrollene 14 dager til 5 måneder etter bitt. Det kan tenkes at utfallet av studien hadde vært annerledes dersom hundene hadde gjennomgått et annerledes behandlingsregime. Uten behandling kan det tenkes at nyreskaden hadde blitt mer omfattende, og langtidsprognosen mer usikker. Dette reduserer muligheten for å ekstrapolere resultatene for å gjelde alle hunder bitt av huggorm i Norge, men våre resultater kan gi en indikasjon på viktigheten av riktig behandling i akuttfasen.

## **Metode**

For å minimere effekten av biologisk variasjon på resultatet er kontrollgruppen forsøkt stratifisert med tanke på alder, kjønn og rase i henhold til kasusgruppen. I tillegg er det benyttet inklusjons- og eksklusjonskriterier. Det vil på tross av dette alltid foreligge en inter- og intraindividuell variasjon som ikke kan kontrolleres. Utvalgsstørrelsen i studiet er begrenset til åtte individer i henholdsvis kasus- og kontrollgruppen og hver enkelt måling vil derfor spille en større rolle i det samlede resultatet. En større studiepopulasjon hadde gjort det sikrere å ekstrapolere resultatene.

Det mangler prøvemateriale fra 3 av 8 hunder ved prøvetidspunkt T3 for kasusgruppen som gjør at det gjenværende prøvematerialet er lite. Grunnen til dette var at en av hundene avleverte for lite urin til analyse, mens de to andre ikke møtte til denne kontrollen. I tillegg til dette var det kun mulig å få prøvemateriale fra én av hundene i kasusgruppen ved prøvetidspunkt T1. Som nevnt tidligere ble dette materialet ekskludert fra studien, grunnet mangel på verdier til sammenligning. Det er i stor grad praktiske hensyn som ligger bak mangel på prøvemateriale ved T1; de fleste hunder blir bitt av huggorm ute på tur og har

dermed nylig urinert. I tillegg hadde flere av hundene dårlig allmenntilstand ved ankomst og forsøk på prøvetaking da ville ha forstyrret behandlende veterinærs arbeid, samt vært uetisk overfor det akutt syke dyret. Det kan også tenkes at urinproduksjonen minker grunnet en distributiv hypovolemi (Karlson-Stiber et al., 2006).

I denne studien ble det benyttet en indirekte ELISA-analyse for undersøkelse av uAlb-forekomsten. Denne analysen har en sensitivitet på 37.706 pg/mL. Metoden ble brukt på grunn av den høye sensitiviteten sammenlignet med andre tilgjengelige ELISA-sett, samt muligheten for å gjennomføre prosedyren selv på laboratoriet. Ved å utføre «spiking» av standardkurven har vi vurdert påliteligheten til ELISA-settet for å kvalitetssikre at prøvematerialet ikke interfererer med innholdet i settet. I studier vil det kunne forekomme tekniske feil, det vil si forskjeller i de observerte målingene og dens faktiske verdi. Dette kan skyldes variasjoner i instrumentmålinger og/eller menneskelige feil (Petrie & Watson, 2013). For å minimere disse feilene ble det gjennomført en testprosedyre, i tillegg til at alle urinprøvene er kjørt som duplikater og gjennomsnittsverdien av disse er benyttet.

Det er noen faktorer som vanskeliggjør ekstrapolering av resultatene i vår studie utover studiepopulasjonen. En større studiepopulasjon hadde bidratt til et mer solid datagrunnlag, hvor enkeltindividers resultater påvirker det samlede resultatet mindre. Det var dog av praktiske hensyn utfordrende å rekruttere aktuelle pasienter til langtidsoppfølging. Videre, er det ikke tatt høyde for geografiske forskjeller for hunder i Norge da utvalget til studiepopulasjonen er lokalisert til et avgrenset geografisk område. Det er trolig slik at klinikkens standard påvirker behandlingsregime, som igjen kan tenkes påvirke nyreskade og langtidsprognose. Det er likevel nærliggende å tro at funnene i studien er nyttige, og i sammenheng med andre forskningsfunn kan bidra til økt kunnskap om nyreskade etter huggorbitt. Det hadde også vært interessant å se på om mindre hunder, med en større giftdose i relasjon til kroppsvekt, hadde bidratt til andre resultater

## **Konklusjon**

Hos hunder bitt av huggorm ble det påvist forhøyet uACR ca. 24 timer etter bitt da den høyeste medianen for uACR forelå. På tross av en klar forskjell i median var det kun på grensen ( $p=0.05$ ) til å ikke være signifikant forskjell mellom gruppene ved dette tidspunktet. Det observeres ingen betydelig forskjell i median for uACR hos kasusgruppen fra ca. 2 uker til 5 måneder etter bitt, eller ved sammenligning med kontrollgruppen.

Ved vurdering av konsentrasjon av kreatinin i serum ble det ikke observert betydelig økning mellom prøvetidspunktene i kasusgruppen. Ingen enkeltmålinger over laboratoriets referanseområde ble observert. Det ses heller ingen signifikant forskjell mellom prøvetidspunktene utover det som forventes av biologisk variasjon for de ulike individene i sCr.

Denne studien kan støtte opp under tidligere funn i studier som viser at det foreligger en mild, ikke-azotemisk nyreskade ca. 24 timer etter bitt. Ved prøvetidspunktene 14 dager etter bitt, 2 og 5 måneder har uACR normalisert seg og disse hundenes resultater utmerker seg ikke fra kontrollgruppens. Basert på normalisering av uACR og fravær av betydelige endringer i sCr er det grunn til å tro at den akutte nyreskaden er forbigående og at det ikke foreligger vedvarende nyreskade på hund i tidsperioden 14 dager til fem måneder etter huggorbitt.

## **Takk til bidragsyttere**

Vi ønsker å takke våre veiledere Karin Zimmer, Heidi S. Lund og Tove V. Nicolaysen for god og tett oppfølging under hele skriveprosessen. I tillegg til dette vil vi takke eiere av hunder i både kasus- og kontrollgruppen, samt ansatte ved NMBU Dyresykehuset Smådyr og Anicura Jeløy Dyresykehus for hjelp til innsamling av prøvemateriale. En spesiell takk rettes til stipendiat Muhammad Rahmad Royan ved avdeling for Biokjemi og fysiologi for uvurderlig hjelp til planlegging for gjennomføring av ELISA-prosedyre og prosessering av data i etterkant, samt professor Eystein Skjerve for hjelp med statistikkdelen.

## Summary

*Title:* Longitudinal assessment of serum creatinine and microalbuminuria in dogs bitten by the European adder (*Vipera berus*)

*Authors:* Sigrun L. Volden, Cornelia Örttenwall, Pia S. Wellerop

*Supervisors:* Karin E. Zimmer, Heidi S. Lund, Tove Nicolaysen

Every year, several dogs present to veterinary clinics due to snake bites caused by the common European adder (*Vipera berus*) during the spring and summer months in Norway. Envenomation by the common European adder is reported to cause acute kidney injury in dogs. It is speculated that acute kidney injury may in turn lead to chronic kidney disease. The aim of this study was to determine whether envenomation may cause long lasting kidney damage, through the application of the biomarkers urinary microalbumin and serum creatinine. Our study included 8 dogs envenomated by the European adder in South-East Norway. Urine and serum samples were collected from each patient at 5 different time points upon arrival to the veterinary clinic and then at approximately 24 hours, 14 days, 2 months and 5 months after snake bite exposure. Samples were analyzed and compared to a control group consisting of 8 healthy dogs. Our results showed a increase in urinary microalbumin for the study cases 24 hours after envenomation ( $p=0,05$ ). Serum creatinine did not exceed reference values, nor increased substantially between consecutive measurements in any of the dogs. This study may support existing reseach literature concluding that envenomation by the common European adder causes acute kidney injury in dogs after 24 hours. Due to normalization of microalbumin levels, temporary kidney injury is suspected. We did not find evidence to support development of chronic kidney disease in envenomated dogs 14 days to 5 months after snake bite exposure.



## Referanser

1997. *Aschehoug og Gyldendals store norske leksikon*, Kunnskapsforl.
- BARTGES, J. W. 2012. Chronic Kidney Disease in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 42, 669-692.
- BASILE, D. P., ANDERSON, M. D. & SUTTON, T. A. 2012. Pathophysiology of acute kidney injury. *Comprehensive Physiology*, 2, 1303-1353.
- BICKLER, P. E. 2020. Amplification of Snake Venom Toxicity by Endogenous Signaling Pathways. *Toxins*, 12.
- BJØRNEBOE, G.-E. 2019. *Biomarkører* [Online]. Available: <https://sml.sn�.no/biomark%C3%B8rer> [Accessed 23.03 2022].
- BOCIAN, A., URBANIK, M., HUS, K., ŁYSKOWSKI, A., PETRILLA, V., ANDREJČÁKOVÁ, Z., PETRILLOVÁ, M. & LEGATH, J. 2016. Proteome and Peptidome of *Vipera berus berus* Venom. *Molecules*, 21, 1398.
- BRAUN, J. P., LEFEBVRE, H. P. & WATSON, A. D. 2003. Creatinine in the dog: a review. *Vet Clin Pathol*, 32, 162-79.
- CARLSON, B. M. 2019. Chapter 13 - The Urinary System. *In*: CARLSON, B. M. (ed.) *The Human Body*. Academic Press.
- CASTRO, I., BURDMANN, E., SEGURO, A. & YU, L. 2004. Bothrops venom induces direct renal tubular injury: Role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 43, 833-9.
- CHAWLA, L. S., EGGERS, P. W., STAR, R. A. & KIMMEL, P. L. 2014. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes. *New England Journal of Medicine*, 371, 58-66.
- CHEVALIER, R. L. 2016. The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction. *Am J Physiol Renal Physiol*, 311, F145-61.

- COCA, S. G., SINGANAMALA, S. & PARIKH, C. R. 2012. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney International*, 81, 442-448.
- COWGILL, L. D., POLZIN, D. J., ELLIOTT, J., NABITY, M. B., SEGEV, G., GRAUER, G. F., BROWN, S., LANGSTON, C. & VAN DONGEN, A. M. 2016. Is Progressive Chronic Kidney Disease a Slow Acute Kidney Injury? *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 46, 995-1013.
- D'AMICO, G. & BAZZI, C. 2003. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney International*, 63, 809-825.
- DE LOOR, J., DAMINET, S., SMETS, P., MADDENS, B. & MEYER, E. 2013. Urinary biomarkers for acute kidney injury in dogs. *J Vet Intern Med*, 27, 998-1010.
- FINCO, D. R. 1997. Chapter 17 - Kidney Function. In: KANEKO, J. J., HARVEY, J. W. & BRUSS, M. L. (eds.) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Fifth Edition)*. San Diego: Academic Press.
- FURUICHI, K., KANEKO, S. & WADA, T. 2009. Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*, 13, 9-14.
- GARY, A. T., COHN, L. A., KERL, M. E. & JENSEN, W. A. 2004. The Effects of Exercise on Urinary Albumin Excretion in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18, 52-55.
- GRAUER, G. 2005. Early Detection of Renal Damage and Disease in Dogs and Cats. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 35, 581-96.
- GRAUER, G. F. 2011. Proteinuria: Measurement and Interpretation. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26, 121-127.
- HARJÉN, H. 2021. *Clinical and clinicopathological characteristics in canine Vipera berus envenomation*. 2022 Doktoravhandling, Norwegian University of Life Sciences.
- HARJEN, H. J., HELLUM, M., RØRTVEIT, R., OSCARSON, M., ANFINSEN, K. P., MOLDAL, E. R., SOLBAK, S., KANSE, S. M. & HENRIKSSON, C. E. 2022. Persistent hypercoagulability in dogs envenomated by the European adder (*Vipera berus berus*). *PLOS ONE*, 17, e0263238.

- HARJEN, H. J., NICOLAYSEN, T. V., NEGARD, T., LUND, H., S?VIK, B. K., ANFINSEN, K. P., MOLDAL, E. R., ZIMMER, K. E. & R?RTVEIT, R. 2021. Serial serum creatinine, SDMA and urinary acute kidney injury biomarker measurements in dogs envenomated by the European adder (*Vipera berus*). *BMC Vet Res*, 17, 154-154.
- HELAL, I., FICK-BROSNAHAN, G. M., REED-GITOMER, B. & SCHRIER, R. W. 2012. Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Nephrology*, 8, 293-300.
- HOKAMP, J. A. & NABITY, M. B. 2016. Renal biomarkers in domestic species. *Vet Clin Pathol*, 45, 28-56.
- HROVAT, A., SCHOEMAN, J. P., DE LAAT, B., MEYER, E., SMETS, P., GODDARD, A., NAGEL, S. & DAMINET, S. 2013. Evaluation of snake envenomation-induced renal dysfunction in dogs using early urinary biomarkers of nephrotoxicity. *The Veterinary Journal*, 198, 239-244.
- IDEXX. u.å. *Urine protein creainine ratio* [Online]. Available: <https://www.idexx.no/nb/veterinary/reference-laboratories/upc/> [Accessed 23.03 2022].
- J. F. ZACHARY, M. D. M. 2017. Pathologic basis of veterinary disease. 617-627, 13-15,.
- J. JERRY KANEKO, J. W. H., MICHAEL L. BRUSS 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*.
- JACOB, F., POLZIN, D., OSBORNE, C., NEATON, J., KIRK, C., ALLEN, T. & SWANSON, L. 2005. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 393-400.
- JOHN E.HALL, M. E. H. 2020. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, Elsevier - Health Sciences Division.
- KARLSON-STIBER, C., SALMONSON, H. & PERSSON, H. 2006. A Nationwide Study of *Vipera Berus* Bites During One Year—Epidemiology and Morbidity of 231 Cases. *Clinical Toxicology*, 44, 25-30
- K. BRANDAL, F. Ø. 2000. Hoggormbitt hos hund i Norge - En retrospektiv studie over hoggormbitt hos hund i Norge. Norges veterinærhøgskole.

- KOLBJØRNSSEN, A. 2014. Hund død etter huggormbitt. *Norsk Veterinærtidsskrift*, 126.
- KUMAR, V., ABBAS, A. K. & ASTER, J. C. 2015. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, Philadelphia, PA, Elsevier/Saunders.
- LANGSTON, C. & GORDON, D. 2021. Effects of IV Fluids in Dogs and Cats With Kidney Failure. *Frontiers in Veterinary Science*, 8.
- LEES, G. E., BROWN, S. A., ELLIOTT, J., GRAUER, G. E. & VADEN, S. L. 2005. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). *J Vet Intern Med*, 19, 377-85.
- LEFEBVRE, H. P. 2015. *Creatinine (Dog)* [Online]. Available: [http://www.iris-kidney.com/education/creatinine\\_dogs.html](http://www.iris-kidney.com/education/creatinine_dogs.html) [Accessed 22.02.2022].
- LERVIK, J. B., LILLIEHÖÖK, I. & FRENDIN, J. H. M. 2010. Clinical and biochemical changes in 53 Swedish dogs bitten by the European adder - *Vipera berus*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52, 26.
- LOTE, C. J. 2012. *Principles of Renal Physiology*. 5th 2012. ed. New York, NY: Springer New York : Imprint: Springer.
- M.MAXIE, G. (ed.) 2016. *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals* : 2, St. Louis: Elsevier.
- MACEDO, E., BOUCHARD, J., SOROKO, S. H., CHERTOW, G. M., HIMMELFARB, J., IKIZLER, T. A., PAGANINI, E. P., MEHTA, R. L. & FOR THE PROGRAM TO IMPROVE CARE IN ACUTE RENAL DISEASE, S. 2010. Fluid accumulation, recognition and staging of acute kidney injury in critically-ill patients. *Critical Care*, 14, R82.
- MATOVINOVIĆ, M. S. 2009. 1. Pathophysiology and Classification of Kidney Diseases. *Ejifcc*, 20, 2-11.
- MURGIER, P., JAKINS, A., BEXFIELD, N. & ARCHER, J. 2009. Comparison of semiquantitative test strips, urine protein electrophoresis, and an immunoturbidimetric assay for measuring microalbuminuria in dogs. *Vet Clin Pathol*, 38, 485-92.
- NISJA, I. M. 2022. Mailkommunikasjon med kunderedaktør/presseansvarlig Ida Marie Nisja i Agria dyreforsikring. .

- NOUTSOS, T., CURRIE, B. J., LEK, R. A. & ISBISTER, G. K. 2020. Snakebite associated thrombotic microangiopathy: a systematic review of clinical features, outcomes, and evidence for interventions including plasmapheresis. *PLoS Negl Trop Dis*, 14, e0008936.
- PALM, C. A. 2020. *Acute kidney injury Kidney disease in dogs & cats* [Online]. Available: [https://www.vetspecialists.com/vet-blog-landing/animal-health-articles/2020/04/07/acute-kidney-injury-in-dogs-and-cats#:~:text=Acute%20kidney%20injury%20\(AKI\)%20is,acute%20renal%20ofailure%20\(ARF\)](https://www.vetspecialists.com/vet-blog-landing/animal-health-articles/2020/04/07/acute-kidney-injury-in-dogs-and-cats#:~:text=Acute%20kidney%20injury%20(AKI)%20is,acute%20renal%20ofailure%20(ARF)). [Accessed 21.03.2022].
- PALVIAINEN, M., RAEKALLIO, M., VAINIONPÄÄ, M., KOSONEN, S. & VAINIO, O. 2012. Proteomic profiling of dog urine after European adder (*Vipera berus berus*) envenomation by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Toxicon*, 60, 1228-1234.
- PALVIAINEN, M., RAEKALLIO, M., VAINIONPÄÄ, M., LAHTINEN, H. & VAINIO, O. 2013. Evaluation of renal impairment in dogs after envenomation by the common European adder (*Vipera berus berus*). *The Veterinary Journal*, 198, 723-724.
- PETRIE, A. & WATSON, P. 2013. *Statistics for veterinary and animal science*, Oxford, Wiley Blackwell.
- PRESSLER, B., VADEN, S., JENSEN, W. & SIMPSON, D. 2001. Prevalence of microalbuminuria in dogs evaluated at a referral veterinary hospital. *J Vet Intern Med*, 15, 300.
- PRESSLER, B. M. 2013. Clinical Approach to Advanced Renal Function Testing in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43, 1193-1208.
- PRICE, R. G. 2002. Early markers of nephrotoxicity. *Comparative Clinical Pathology*, 11, 2-7.
- ROSS, L. 2011. Acute kidney injury in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 41, 1-14.
- S. J. ETTINGER, E. C. F., E. CÔTE Textbook of Veterinary Internal Medicine.
- SITPRIJA, V. 2006. Snakebite nephropathy (Review Article). *Nephrology (Carlton)*, 11, 442-448.

- SMETS, P. M. Y., MEYER, E., MADDENS, B. E. J., DUCHATEAU, L. & DAMINET, S. 2010. Urinary Markers in Healthy Young and Aged Dogs and Dogs with Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, 65-72.
- STRIMBU, K. & TAVEL, J. A. 2010. What are biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS*, 5, 463-466.
- SUTTON, T. A., FISHER, C. J. & MOLITORIS, B. A. 2002. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney International*, 62, 1539-1549.
- VADEN, S. L., PRESSLER, B. M., LAPPIN, M. R. & JENSEN, W. A. 2004. Effects of urinary tract inflammation and sample blood contamination on urine albumin and total protein concentrations in canine urine samples. *Veterinary Clinical Pathology*, 33, 14-19.
- VANMASSENHOVE, J., VAN BIESEN, W., VANHOLDER, R. & LAMEIRE, N. 2019. Subclinical AKI: ready for primetime in clinical practice? *Journal of Nephrology*, 32, 9-16.
- WAIKAR, S. S., SABBISSETTI, V. S. & BONVENTRE, J. V. 2010. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney International*, 78, 486-494.
- WHITTEMORE, J., JENSEN, W., PRAUSE, L., RADECKI, S., GILL, V. & LAPPIN, M. 2003. Comparison of microalbuminuria, urine protein dipstick, and urine protein creatinine ratio results in clinically ill dogs. *J Vet Intern Med*, 17, 437.
- YERRAMILI, M. & OBARE, E. 2014. Symmetric dimethylarginine (SDMA) increases earlier than serum creatinine in dogs with chronic kidney disease (CKD). *J Vet Intern Med*, 28, 1084-1085.
- Ø. V. SJAASTAD, O. S., K. HOVE 2016. *Physiology of domestic animals*, Scandinavian veterinary press.

