

Urindiagnostik för att påvisa njurtubuliskada hos hund, N2021-0003

Rapportens författare

Inger Lilliehöök, Lena Pelander och Anna Selin

Populärvetenskaplig sammanfattning

Det har saknats bra och tillgängliga diagnostiska test för att påvisa akuta njurskador, framför allt i de fall som skadorna främst drabbat njurtubuli. Därför ville vi undersöka hur bra fem utvalda urinbiomarkörer var att påvisa akuta njurskador hos hundar med verifierad akut njurskada. Denna studie fokuserade på urinbiomarkörer som kan analyseras med vanliga biokemiinstrument som används till serumbiokemi på veterinärlaboratorier. Hos de 14 hundarna med akut njurskada sågs förhöjt cystatin C (hos 86 % av hundarna), protein (86 %), glukos (50 %), samt de två enzymen (NAG och GGT ca 60 %) i urinen. Dessutom undersöktes samma urinbiomarkörer i urin från 28 ormbitna hundar och 25 hundar med olika sjukdomar som krävde intensivvård. Flera dessa hundar hade indikationer på sekundära njurskador i form av förhöjda urinbiomarkörer. Urinbiomarkörerna följdes över tid genom upprepade provtagningar. Hos många av hundarna med förhöjda värden normaliserades dessa inom 14 dagar, medan hos vissa hundar framför allt i gruppen av hundar med verifierad akut njurskada sågs kvarstående höga cystatin C och protein-värden i urinproven.

Resultaten indikerar att den nya analysen cystatin C i urin är ett värdefullt komplement till urinprotein för att påvisa akuta njurskador, både primära och sekundära. Vid tidig upptäckt av njurskador kan man minska risk för ytterligare skador på njurarna genom med förebyggande åtgärder som dietkorrigering, undvikande av vissa läkemedel, etc.

Inledning och bakgrund

Akuta njurskador kan orsakas av akuta toxiska skador till exempel på grund av förgiftningar eller läkemedelskador, men det är också vanligt att njurarna påverkas sekundärt till olika akuta allvarliga tillstånd/sjukdomar som systemisk inflammation/infektion, allvarliga cirkulatoriska sjukdomstillstånd,

förgiftningar, ormbett, mm (Grauer et al. 2005, Martinez et al. 2020). Njurtubuliskada är vanlig, men upptäcks ofta inte eftersom det tidigare inte funnits några bra och tillgängliga diagnostiska markörer.

De blodprovsanalyser för att diagnosticera njursjukdom som vanligtvis används i djursjukvården är markörer för den glomerulära filtrationen (GFR) i njurarna, såsom kreatinin, SDMA och urea, men även cystatin C, i blodet. Dessa test fungerar bra för att påvisa gravt nedsatt njurfunktion – akut såväl som kronisk med minskat antal fungerande nefroner och glomeruli. Dessa GFR-markörer kan dock vara svårtolkade hos hundar med allvarliga akuta sjukdomstillstånd eftersom de hundarna ofta är uttorkade eller har minskad cirkulation, vilket också leder till stegringar. Dessutom förekommer fall med akut njurtubuliskada utan att glomerulära filtrationen (GFR) är nedsatt (det vill säga utan att den totala funktionen hos hela njuren blivit nedsatt) och då är kreatinin och övriga GFR-markörer inom referensintervallet. Så var det t.ex. i den norska studien med ormbitna hundar (Harjen et al. 2021)

Urin är det bästa provmaterialet för identifiering av tubulära njurskador, eftersom skador på epitelcellerna och minskad funktion hos epitelcellerna i tubuli påverkar vilka ämnen som förekommer i urinen. Vid allvarliga skador av tubuliepitelcellerna sker minskad resorption av ämnen som cystatin C, glukos, natrium, urea och albumin, vilket leder till ökad koncentration i urinen (Sasaki et al. 2014). Cystatin C i urinen är en lovande urinmarkör för skada som lett till minskad funktion hos proximala njurtubuliceller. I tidigare experimentella studier på hund har visat förhöjd koncentration av cystatin C i urinen efter tubuliskada orsakat av olika läkemedel med känd toxisk effekt på njurtubuli (Sasaki et al. 2014, Gu et al. 2018)

Vid skador på njurtubuliepitelcellerna är det vanligt med ökad produktion av vissa enzymer som till exempel gamma-glutamyl-transferas (GGT), och ALP (Heine et al. 2001, Ibba et al. 2016). Båda enzymen är möjligt att detektera med vanliga instrument för blod-biokemi (Ilchyshyn et al. 2019). Det finns även flera andra urinmarkörer som ökar vid njurtubuliskada som neutrofil gelatinas-associerat lipocalin (NGAL), N-acetyl- β -D-glukosaminidas (NAG), levertyp fettsyrabindande protein (L-FABP), njurskademolekyl-1 typ-1 (KIM-1) och interleukin-18 (Pressler 2013). För flera av dessa markörer finns det inga tillgängliga analysmetoder som är lämplig för rutinmässig diagnos i prover från djur.

Akuta njurtubuliskador är sannolikt vanliga, men har varit svåra att påvisa. Vi gjorde denna studie för att försöka påvisa njurtubuliskador hos hundar med allvarliga sjukdomar som kan ha lett till sekundär njurskada. Det är viktigt att kunna diagnostisera skada på njurtubuli för att kunna bedöma omfattningen av skadan, bedöma prognosen och välja behandling. Syftet på längre sikt är att öka tillgången av bra urinalyser för njurtubuliskada som kan analyseras med vanliga biokemi-instrument.

Syften och frågeställningar

Syftet med denna studie var att undersöka fem urinbiomarkörer som kan analyseras med vanliga biokemiinstrument som används till serumbiokemi på veterinärlaboratorier för att utvärdera

- hur bra de undersökta urinbiomarkörerna fungerade hos hundar med verifierad akut njurskada, dvs i vilken frekvens de var förhöjda hos hundarna i denna grupp.

- frekvens av sekundära skador på njurtubuli hos hundar med ormbett eller vid akuta allvarliga sjukdomstillstånd som kräver intensivvård (IVA).
- om dessa urinbiomarkörer kan användas för att kunna följa skadornas tidsförlopp och avläkning.

Målet är att få mer kunskap om frekvens och omfattning av njurtubuliskador vid olika tillstånd, eftersom akut njurskada är associerad med hög sjuklighet och dödlighet och kan utvecklas till kronisk njursjukdom om den inte upptäcks. Vid tidig upptäckt kan man minska risk för ytterligare skador på njurarna genom med förebyggande åtgärder som dietkorrigering, undvikande av vissa läkemedel, etc.

Planen var att studien skulle leda till förbättrad tillgänglighet av bra diagnostiska urinmarkörer som kan indikera skador i njurtubuli vilket är till nytta för alla hundar med risk för njurskada.

Material och metoder

Under 2023 togs blod och urinprover från 67 sjuka hundar som inkom till vid AniCura Albano Djursjukhus med en allvarlig akut sjukdom som krävde intensivvård eller efter ormbett. De sjuka hundarna följdes med totalt två blodprover (dag 1 och 2) och fyra urinprovtagningar (dag 1, 2, 7 och 14).

Utifrån anamnes, klinisk bild och provsvar (blod/urin-prover och bilddiagnostik) klassificerades hundarna i olika grupper; akut njurskada (AKI), ormbett eller annan allvarlig sjukdom som krävde intensivvård. Blod- och urin-prover togs och analyserades enligt normala rutiner vid ankomst och under stationärvård. Dessutom togs ytterligare prover för studien efter djurägaren gett tillstånd. Som kontrollgrupp provtogs 30 friska hundar vid ett tillfälle. Serum och supernatan från centrifugerade urinprover sparades i små alikvoter i -80°C för senare analys.

Alla urinprover analyserades vid ett tillfälle vid Klinisk kemiska laboratoriet, UDS, SLU med ett biokemiinstrument Beckman-Coulter DxC 700 AU. Urin-protein, kreatinin och gammaglytamyltransferas (GGT) analyserades med reagens från Beckman-Coulter, cystatin C med reagens från Gentian AB och N-acetyl-B-D-glukosaminidase (NAG) med reagens från Diazyme. Serumproverna från hundarna i kontrollgruppen och kompletterande analyser i serumproverna från de sjuka hundarna analyserades vid ett tillfälle med Beckman-Coulter DxC 700 AU.

Koncentrationen av de analyserade urinmarkörerna kvotades med urinkreatinin för att justera för urinkoncentrationen. Urinprovsresultaten jämfördes mellan de olika grupperna med Kruskal Wallis och uppföljande parvis Wilcoxon-analys. Förändringar över tid studerades genom att följa resultaten från respektive hund i diagram, eftersom uppföljningstiden varierade stort mellan olika hundar.

Resultat

Av de sjuka hundarna hade 14 diagnostiserad AKI (akut njurskada), 28 hundar var ormbitna och 25 hade andra akuta sjukdomar som krävde intensivvård (IVA). Stegringar hos de undersökta

urinmarkörerna (över det högsta värdet hos de friska kontrollhundarna) sågs hos många av de sjuka hundarna vid första provtagningen (tabell 1).

Av hundarna med fastställd AKI hade 86% förhöjd cystatin C och protein-kreakvot, andelen med förhöjt GGT, NAG och glukos var mellan 50-64%.

Tabell 1. Procentuell andel av hundar som hade förhöjda urinmarkörskvoter vid första provtagningstillfället.

	Protein krea-kv %	CysC krea-kv %	NAG krea-kv %	GGT krea-kv %	Glukos krea-kv %
AKI	86	86	57	64	50

Hos hundarna med ormbett och sjuka sågs protein-kreakvot och cystatin C-stegring hos ungefär hälften av hundarna i respektive grupp, mindre andel av hundarna hade stegringar i NAG, GGT och glukos.

Det var signifikant skillnad mellan de friska kontrollhundarna och de tre grupperna med sjuka hundar för alla fem urinmarkörerna. AKI-hundarna hade dessutom signifikant högre värden än både IVA-hundarna och de ormbitna hundarna ($p < 0,05$).

Tabell 2. Procentuell andel av hundar i ormbetts- och AKI-gruppen som hade förhöjda urinmarkörskvoter.

	Protein krea-kv %	CysC krea-kv %	NAG krea-kv %	GGT krea-kv %	Glukos krea-kv %
Ormbett	43	43	18	46	21
IVA	48	52	20	32	28

Vid provtagning dag 7 och 14 hade alla urinmarkörerna sjunkit tydligt jämfört med första provtagningen hos de flesta hundarna i ormbettsgruppen eller IVA-gruppen. Många av hundarna med AKI, speciellt de som dog, hade kvarstående förhöjda cystatin C, protein, GGT och NAG.

Diskussion med slutsatser och praktisk nytta för sällskapsdjurssektorn

Hos 71-86% av hundarna med verifierad AKI sågs stegringar hos alla fem urinmarkörerna, vilket indikerar akuta njurskador leder till förhöjningar av dessa urinmarkörer. Cystatin C och protein var de urinmarkörer som var förändrade hos flest av AKI-hundarna.

I tidigare experimentella studier på hund har visat förhöjd koncentration av cystatin C i urinen efter njurtubuliskada orsakat av olika läkemedel med känd toxisk effekt på njurtubuli (Sasaki et al. 2014, Gu et al. 2018) och vid hemorragisk shock (Boyed et al. 2019). Cystatin C är ett protein med låg molekylvikt som produceras av alla celler och fritt filtreras av glomerulus i urinen (Grubb 2001). I proximala tubuli återupptas normalt allt cystatin C i urinen av tubuliepitelcellerna (Kaseda et al. 2007), så hos normala hundar finns väldigt låg koncentration av cystatin C i urinen (Damm 2020). Så cystatin C-stegringarna hos 86% av hundarna i AKI-gruppen i vår studie, ofta i kombination med förhöjda njurtubulienzymer, indikerar att hundarna sannolikt hade skador på njurtubuli.

Analys av urinprotein är en frekvent använd och mycket bra analys för att påvisa njursjukdom med ökat läckage av små proteiner, som till exempel albumin, genom njurarnas glomerulära filter vid skador på glomeruli. Vid akuta skador huvudsakligen i njurtubuli ses däremot ofta ingen eller endast liten stegring av urinprotein. I denna studie sågs både förhöjt U-protein och U-cystatin C hos många hundar vilket kan indikera skador i njurens alla delar. Koncentrationen av protein i urin stiger även vid andra sjukdomar som urinvägsinfektion eller blödningar i urinvägarna, så det finns många orsaker till förhöjt urinprotein utöver njurskador.

Den vanliga europeiska huggormen (*Vipera berus berus*) är vanligt förekommande i Sverige. Man räknar med att ca 2000 svenska hundar blir bitna per år (Bremsjö 2016). Tecken på akut njurtubuliskada har observerats hos ormbitna hundar (Harjen et al. 2021, Martinez et al. 2020, Palviainen et al. 2013). Patofysiologin är sannolikt multifaktoriell med minskad vävnadsgenombildning på grund av nedsatt cirkulation och försämrad hjärtfunktion eller möjligen genom direkt nefrotoxicitet (Sitprija 2006). I en finsk och en norsk studie om huggormsbitna hundar sågs signifikant ökad koncentration av flera urinmarkörer som indikerar akut njurtubuliskada, som U-GGT och U-ALP/kreatinin-kvot (Palviainen et al. 2013), samt MCP-1, KIM-1 och IL-8 i urin (Harjen et al. 2021). I vår studie hade 40-50% av de bitna hundarna förhöjt U-cystatin C eller U-GGT, vilket bekräftar att ormbett i många fall verkar orsaka njurtubuliskada. När hundar följdes över tid sjönk dessa urinmarkörer ganska snabbt och de flesta hade normala nivåer efter 7 dagar.

Resultatet från studien visar att flera av de undersökta biomarkörerna stiger vid akut njurskada. Framför allt cystatin C verkar vara en bra diagnostisk urinmarkör vid misstanke på njurtubuliskada.

Plan för vetenskaplig publicering och informationsspridning

Anna skriver just nu manuskript gällande denna studie som är avsedd för publikation i internationell *peer review*-granskad tidskrift, exempelvis *Journal of Internal Medicine*. Vi avser också publicera i populärvetenskapliga kanaler såsom Framtidens djurhälsa och djurvälstånd. För att nå de kliniskt verksamma veterinärerna avser vi författa en artikel alternativt pressmeddelande till Svensk veterinärtidning och/eller Veterinärmagazinet, samt Hundsport.

Litteraturlista

- Boyd CJ, Claus MA, Rasis AL, Cianciolo R, Bosio E et al. Evaluation of biomarkers of kidney injury following 4% succinylated gelatin and 6% hydroxyethyl starch 130/0.4 administration in a canine hemorrhagic shock model. J Vet Emerg Crit Care 2019;29(2):132-142.
- Bremsjö E. Omvårdnad vid huggormsbett på hund. Kandidatarbete inom djursjukskötare kandidatprogram, 2016:27. Epsilon, SLU
- Damm E. Koncentration av kemiska metaboliter i urin hos friska hundar. (Examensarbete, Avancerad nivå, A2E). Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet.
- Grauer GF. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Animal Practice 2005;35(3):581-96.
- Grubb AO. Cystatin C – properties and use as diagnostic marker. Advances in clinical chemistry 2001;35:63-99.
- Gu Y, Vlasakova K, Troth S, et al. Performance Assessment of New Urinary Translational Safety Biomarkers of Drug-induced Renal Tubular Injury in Tenofovir-treated Cynomolgus Monkeys and Beagle Dogs. Toxicol Pathol 2018 Jul;46(5):553-563.
- Harjen HI, Nicolaysen TV, Negard T, et al. Serial serum creatinine, SDMA and urinary acute kidney injury biomarker measurements in dogs envenomated by the European adder (*Vipera berus*). BMC Vet Res 2021;17:154.
- Heiene R, Moe L, Mølmen G. Calculation of urinary enzyme excretion, with renal structure and function in dogs with pyometra. Res Vet Sci 2001;70:129-137.
- Ibba F, Mangiagalli G, Paltrinieri S. Urinary gamma-glutamyl transferase (GGT) as a marker of tubular proteinuria in dogs with canine leishmaniasis, using sodium dodecylsulphate (SDS) electrophoresis as a reference method. Vet J 2016;210:89-91.
- Ilchysyn NP, Villiers E, Monti P. Validation of a spectrophotometric method for GGT measurement in canine urine and determination of the urine GGT-to-creatinine ratio reference interval and biological variation in 41 healthy dogs. J Vet Diagn Invest 2019 Jan;31(1):33-39.
- Kaseda R, Iino N, Hosojima M, et al. Megalin-mediated endocytosis of cystatin C in proximal tubule cells. Biochem Biophys Res Com, 2007;357:1130-1134.
- Martinez J, Londoño LA, Schaer M. Retrospective evaluation of acute kidney injury in dogs with pit viper envenomation (2008-2017): 56 cases. J Vet Emerg Crit Care. 2020;30(6):698-705.
- Palviainen M, Raekallio M, Vainionpää M, et al. Evaluation of renal impairment in dogs after envenomation by the common European adder (*Vipera berus berus*) Vet J. 2013 Dec;198(3):723-4.
- Pressler BM. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats. Vet Clin Small Anim. 2013;43:1193-1208.
- Sasaki A, Sasaki Y, Iwama R et al. Comparison of renal biomarkers with glomerular filtration rate in susceptibility to detection of gentamicin-induced acute kidney injury in dogs. J Comp Path 2014;151:264-270.
- Sitprija V. Snakebite nephropathy. Nephrology (Carlton). 2006;11:442- 448