



# Cystatin C och cylindrar i urin från hundar på intensivvårdsavdelning

---

*Cystatin C and casts in urine from dogs admitted to the intensive care unit*

Matilda Axelsson

Självständigt arbete • 30 hp  
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Veterinärprogrammet  
Uppsala 2021





# Cystatin C och cylindrar i urin från hundar på intensivvårdsavdelning

*Cystatin C and casts in urine from dogs admitted to the intensive care unit*

Matilda Axelsson

**Handledare:** Lena Pelander, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper  
**Bitr. handledare:** Inger Lilliehöök, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper  
**Examinator:** Ingrid Ljungvall, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

**Omfattning:** 30 hp  
**Nivå och fördjupning:** A2E  
**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin  
**Kurskod:** EX0869  
**Program/utbildning:** Veterinärprogrammet  
**Kursansvarig inst.:** Institutionen för kliniska vetenskaper

**Utgivningsort:** Uppsala  
**Utgivningsår:** 2021

**Nyckelord:** Cystatin C, cylindrar, AKI, hund, IVA, tubuliskada, urinmarkör

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper

## Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

## Sammanfattning

Akuta njurskador (AKI) är ett samlingsbegrepp för olika tillstånd som innebär skada på njurarna med akut uppkomst. Många olika etiologier kan ligga bakom AKI hos hund, exempelvis förgiftning, infektion, blödning och sepsis. Njurarnas anatomiska strukturer påverkas olika beroende på vilken eller vilka etiologier som är inblandade. Tubuli är på grund av sin höga metaboliska aktivitet särskilt känsliga för nefrotoxiska substanser och ischemi, medan glomeruli oftare drabbas av immunmedierade skador. Njurfunktion bedöms ofta genom uppskattning av den glomerulära filtrationshastigheten (GFR). Serumkoncentrationen av kreatinin är den biomarkör som vanligen används för att uppskatta GFR. International renal interest society (IRIS) har gjort en graderingsskala där förändringar i serum-kreatininkoncentrationen är av stor vikt för diagnostisering av AKI. Kreatininkoncentrationen påverkas av många olika faktorer, dels individens muskelmassa, men även prerenala tillstånd, som hypovolemi. Hundar med nedsatt cirkulation till följd av andra allvarliga skador/sjukdomar kan löpa risk att utveckla ischemiska njurskador och det finns ett behov av känsligare markörer för diagnostik av AKI. Cystatin C är ett litet protein som filtreras fritt i glomeruli och sedan resorberas och degraderas fullständigt av epitelcellerna i proximala tubuli. Histopatologiska förändringar i form av skador på proximala tubuli har detekterats hos individer med förhöjda nivåer av cystatin C i urin i studier på människa och enstaka på hund.

Den här studien syftade till att undersöka nivåerna av cystatin C i urin och förekomsten av cylindrar i urinsediment från hundar inlagda på intensivvårdsavdelning (IVA). Hundar på IVA antogs utgöra en grupp som ofta har nedsatt cirkulation och därför i högre utsträckning utvecklar ischemiska njurskador. Det diskuteras huruvida cystatin C i urin bör normaliseras med kreatinin vid akuta skador på njurarna, varför studien också presenterade cystatin C-nivåerna både som koncentration och efter normalisering genom kvotering med kreatinin.

Totalt samlades 28 urinprov in från 17 hundar på IVA och 15 urinprov från 15 friska kontrollhundar. Mätning av specifik vikt, analys med urinsticka och analys av urinsediment med hjälp av SediVue Dx genomfördes i direkt anslutning till provtagning. Urinproverna frystes sedan in ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) innan biokemisk analys av cystatin C, kreatinin och protein genomfördes. Hundarna på IVA delades in i grupper baserat på journalanteckningar; tre hundar som behandlande veterinär konstaterat njurskada på placerades i grupp A, elva hundar med tydligt nedsatt cirkulation i grupp B och tre hundar utan tydligt nedsatt cirkulation i grupp C. Median (och kvartilavstånd) avseende cystatin C och urin-cystatin C-kreatininkvoten var 6,91 (3,51–7,44) mg/L respektive  $2297 (1480\text{--}3004) \times 10^{-6}$  i grupp A och 0,00 (0,00–0,02) mg/L respektive  $0 (0\text{--}10) \times 10^{-6}$  i kontrollgruppen. Ingen statistisk signifikant skillnad förelåg mellan hela IVA-gruppen ( $n=17$ ) och kontrollgruppen för varken cystatin C eller urin-cystatin C-kreatininkvoten. Tre av hundarna med cystatin C-koncentrationer som översteg kontrollgruppens högsta värde (0,12 mg/L) var enligt journalanteckningar inte azotemiska och två av dessa hundar hade inte kliniskt konstaterad njurskada. Fem av hundarna med urin-cystatin C-kreatininkvoter  $>35 \times 10^{-6}$  (riktvärde från Damm (2020)) var inte azotemiska enligt journalanteckningar och fyra av dessa hade inte kliniskt konstaterad njurskada. Avseende förekomst av cylindrar förelåg ingen skillnad mellan grupperna.

Studiens resultat ihop med tidigare genomförda studier tyder på att cystatin C i urin kan ha potential som markör för tubuliskada på hund. Det saknas dock stora studier på hund där en histopatologisk undersökning av njurarna genomförts tillsammans med analys av cystatin C i urin. Sådana studier kan vara etiskt problematiska. Mer forskning behövs även för att avgöra om cystatin C i urin bör presenteras som koncentration eller normaliseras med exempelvis kreatinin eller urinens specifika vikt. Gällande cylindrar tyder resultaten i denna och andra studier på att det är ett sporadiskt fynd vid AKI hos hund och därmed inte sensitivt vid diagnostisering.

*Nyckelord:* cystatin C, cylindrar, AKI, hund, IVA, tubuliskada, urinmarkör

## Abstract

Acute kidney injury (AKI) is characterized by damage to the kidneys with an acute onset. Kidney injury may involve all different anatomical structures of the kidney, depending on the etiology. The tubular structures are often damaged by nephrotoxins and ischemia in contrast to the glomeruli where immune mediated damage is the most common cause of injury. Acute kidney injuries often, but not always, lead to a decrease in glomerular filtration rate. Glomerular filtration rate is commonly estimated by measuring the serum creatinine concentration. The concentration of creatinine in serum is affected by several factors, for example the muscle mass of the individual and prerenal factors (hypovolemia). Dogs with critical illness are at risk of developing AKI and there is a need of a more sensitive diagnostic markers of early AKI. Cystatin C is a small protein normally freely filtered in the glomeruli and then completely reabsorbed and degraded in the epithelial cells of the proximal tubules. Studies in humans and occasional studies in dogs have shown a connection between histopathological signs of tubular damage and increased levels of urinary cystatin C.

The purpose of this study was to measure the concentration of urinary cystatin C and to evaluate the presence of casts in the urine sediment from dogs admitted to the intensive care unit (ICU). Dogs in the ICU were considered to represent a group of dogs at risk for hypovolemia and therefore at risk of developing ischemic kidney injury. There is an ongoing discussion of whether cystatin C (and other markers of tubular damage) should be normalized with urinary creatinine or not. Therefore, the results of cystatin C before and after normalization with creatinine and were compared in this study.

Twenty-eight urine samples from 17 dogs admitted to the ICU and 15 urine samples from 15 healthy dogs were collected. Measurement of urine specific gravity, analysis with urinary dipstick test and analysis of urine sediment with SediVue Dx were performed directly after urine collection. Thereafter, the urine samples were placed in a freezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) before the batch analysis of cystatin C, creatinine and protein. Dogs in the ICU were split into three groups; three dogs that were diagnosed with kidney injury were assigned to group A, eleven dogs without kidney injury but with decreased circulation were assigned to group B and three dogs without kidney injury or decreased circulation were assigned to group C. Median (and interquartile range) regarding cystatin C concentration and urine-cystatin C to creatinine ratio were 6,91 (3,51–7,44) mg/L and 2297 (1480–3004)  $\times 10^{-6}$  in group A and 0,00 (0,00–0,02) mg/L and 0 (0–10)  $\times 10^{-6}$  in the control group. There were no statistically significant difference between the entire ICU group and the control group for neither the cystatin C concentration nor the urine-cystatin C to creatinine ratio. Three of the dogs with a cystatin C concentration  $>0,12$  mg/L (the highest value in the control group) were (according to the medical record) non-azotemic and two of these dogs did not have a clinical diagnosis of kidney disease. Five of the dogs with a urine-cystatin C to creatinine ratio of  $>35 \times 10^{-6}$  (from Damm (2020)) were (according to the medical record) non-azotemic and four of these dogs did not have a clinical diagnosis of kidney disease. There were no difference between the ICU group and the control group regarding the presence of urinary casts.

These results, combined with earlier studies, indicate that urinary cystatin C might be a useful marker of tubular damage in dogs. Large studies that compare histopathological signs of tubular damage to increased levels of urinary cystatin C in dogs are, however, lacking. Such a study would give more information about how and when cystatin C increases in the urine. It would also give information about whether normalization with creatinine or urine specific gravity/osmolality is a useful way to interpret the values. Regarding casts in urine sediment, the result of this and other studies imply that casts are an irregular finding in dogs with AKI and therefore an insensitive diagnostic tool.

*Keywords:* cystatin C, casts, AKI, dogs, ICU, tubular damage, urine markers

# Innehållsförteckning

<b>Förkortningar</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Inledning</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Litteraturoversikt</b> .....	<b>13</b>
2.1. Njuranatomi och -fysiologi .....	13
2.2. AKI hos hund .....	15
2.2.1. Definition och förekomst .....	15
2.2.2. Etiologi och patofysiologi .....	16
2.2.3. Gradering och behandling .....	18
2.2.4. Diagnosticering av AKI .....	18
2.3. Cystatin C .....	22
2.3.1. Cirkulerande cystatin C som markör för nedsatt GFR .....	23
2.3.2. Cystatin C i urin som markör för tubuliskada .....	23
<b>3. Material och metoder</b> .....	<b>25</b>
3.1. Studiepopulation och insamling av material .....	25
3.2. Hantering och analys av urinprov .....	26
3.3. Statistisk analys .....	27
<b>4. Resultat</b> .....	<b>28</b>
4.1. Studiepopulation .....	28
4.2. Cystatin C-koncentration och -kreatininkvot .....	30
4.2.1. Jämförelser mellan samtliga prover i IVA-gruppen .....	32
4.2.2. Jämförelser mellan det första, andra och tredje urinprovet .....	33
4.2.3. Gruppjämförelser (initialurinprov) .....	34
4.3. Specifik vikt och urinstickor .....	34
4.4. SediVue Dx .....	35
4.4.1. Gruppjämförelser (initialurinprov) .....	35
4.4.2. Manuell bedömning av bilder från SediVue Dx .....	36
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>37</b>
<b>6. Konklusion</b> .....	<b>42</b>

<b>Referenser</b> .....	<b>43</b>
<b>Tack</b> .....	<b>47</b>
<b>Populärvetenskaplig sammanfattning</b> .....	<b>48</b>
<b>Bilaga 1</b> .....	<b>51</b>



## Förkortningar

AKI	Acute kidney injury, akut njurskada
ARF	Acute renal failure, akut njursvikt
ATN	Akut tubulär nekros
CKD	Chronic kidney disease, kronisk njursjukdom
IRIS	International Renal Interest Society
IVA	Intensivvårdsavdelning
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
UPCR	Urine-protein to creatinine ratio, urin-protein-kreatininkvot



# 1. Inledning

Njurarna är för kroppen viktiga organ som har många funktioner. Den mest centrala funktionen är urinproduktionen – njurarna filtrerar blodet och reglerar sedan filtratets innehåll efter kroppens behov. På så sätt kan njurarna reglera vätske-, elektrolyt- och pH-balansen (Sjaastad *et al.* 2010). Skador på njurarna kan uppträda primärt vid exempelvis förgiftning eller infektion men också som komplikation vid andra sjukdomstillstånd till följd av en nedsatt perfusion. Njurarna har en hög metabolisk aktivitet och är därför känsliga för ischemi (Makris & Spanou 2016). Akuta njurskador (AKI, acute kidney injury) på hund har en hög dödlighet, cirka 50 % (Vaden *et al.* 1997; Legatti *et al.* 2018). Trots att AKI kan vara dödligt finns det brister gällande diagnostisering av tillståndet.

Den glomerulära filtrationshastigheten (GFR) är det globala måttet på njurfunktion, även om GFR endast utgör en av njurens många funktioner. I nuläget är det kreatinin som vanligen används för att indirekt uppskatta GFR, ofta tillsammans med urea (Harison *et al.* 2012; Makris & Spanou 2016; Palm 2017). Båda dessa har uppenbara brister. Kreatinin är en restprodukt från muskelmetabolismen och koncentrationen i blodet är starkt korrelerad till muskelmassan hos djuret, vilket innebär en stor normalvariation (Graham 2017; Palm 2017). De referensintervall som finns för serum-kreatinin tar inte hänsyn till djurens muskelmassa och det kan därför vara komplicerat att tolka värdet. Urea påverkas av en rad faktorer, bland annat av leverfunktion, diet *etc.* och bör avseende slutsatser om njurfunktion endast tolkas i kombination med kreatinin. Symmetriskt dimetylarginin (SDMA) är en molekyl som i en studie visats vara likvärdig kreatinin avseende uppskattning av GFR (Pelander *et al.* 2019). Förhöjda koncentrationer av kreatinin i blodet kan ge information om njurarnas filtration, men inte huruvida skador på njurarnas tubulära strukturer föreligger. Det finns ett behov av känsligare diagnostiseringsmetoder, som gör det möjligt att detektera tidiga skador på njurarna både i situationer då GFR inte påverkas nämnvärt, men också innan befintlig njurpatologi leder till att kreatinin stiger över referensvärdet. En tidig diagnos vid AKI skulle i bästa fall ge klinikveterinären en chans att anpassa behandlingen och förbättra prognosen för patienten.

Att uppskatta GFR är inte det enda alternativet för diagnostisering av njurskada. Ett flertal potentiella markörer för tubuliskada finns beskrivna, däribland cystatin C. Skador på proximala tubuli uppstår ofta till följd av exponering för nefrotoxiska

substanser och/eller ischemi (Sjaastad *et al.* 2010). Ischemi orsakas av en nedsatt perfusion av njurarna, vilket kan bero på en nedsatt cirkulation.

Cystatin C är en liten molekyl – cirka 13 kDa stor – som produceras i de flesta av kroppens kärnförande celler och cirkulerar i blodet (Grubb 2001; Filler *et al.* 2005). Cystatin C filtreras fritt i glomeruli, resorberas i princip fullständigt i proximala tubuli genom megalinmedierad endocytos och degraderas till sist av tubulicellerna (Kaseda *et al.* 2007). En studie på hund som utvärderade huruvida cystatin C i blod kan användas för uppskattning av GFR kom fram till att den fungerar sämre än både kreatinin och SDMA (Pelander *et al.* 2019). Mätning av cystatin C-koncentrationen i urin för detektion av tubuliskada finns också beskrivet. I en studie av Sasaki *et al.* (2014) kunde tubuliskada konfirmeras histopatologiskt hos hundar med förhöjda koncentrationer av cystatin C i urinen.

Syftet med denna studie var att undersöka ett urval markörer för tubuliskada i urin (cystatin C och cylindrar) hos hundar inlagda på intensivvårdsavdelning (IVA) och jämföra resultaten med kliniskt friska hundar. Hundar på IVA antogs utgöra en grupp som ofta har nedsatt cirkulation och därmed en ökad risk att utveckla ischemiska tubuliskador varför dessa utgjorde studiepopulationen. Hypotesen var att hundar på IVA kan ha ökad urinkoncentration av cystatin C samt förekomst av cylindrar i urinsediment. Studien syftade också till att undersöka vilka urinkoncentrationer friska hundar har av cystatin C. Utöver detta jämfördes cystatin C-nivåerna innan och efter normalisering med urin-kreatinin.

## 2. Litteraturöversikt

### 2.1. Njuranatomi och -fysiologi

Njurarna är pariga organ som ligger belägna i det retroperitoneala utrymmet på var sin sida om ryggraden i ländregionen (Sjaastad *et al.* 2010; König & Liebich 2014). Vänster njure är placerad något längre kaudalt än höger njure, som ligger dikt an leverns *processus caudatus*. Hos hund är njurarna böformade och unilobulära.

Njurparenkymet innesluts av en fibrös kapsel och kan delas in i bark, cortex, och märm, medulla (Zachary & McGavin 2012; König & Liebich 2014). Medulla är formad som en pyramid med den breda basen mot cortex. Urin från medulla passerar crista renalis och hamnar sedan i njurbäckenet (König & Liebich 2014). Från njurbäckenet transporteras urinen via urinledare, ureter, som avgår från njurens hilus, ned till urinblåsan och vidare ut ur kroppen genom urinröret, uretra (Sjaastad *et al.* 2010; König & Liebich 2014).

Njurarna har flera funktioner, bland annat urinproduktion. Urinproduktion avser att utsöndra metaboliter och toxiner från kroppen, reglera vätske-, elektrolyt- och, tillsammans med respirationsorganen, även pH-balansen samt återta näringsämnen (Sjaastad *et al.* 2010). Utöver detta producerar njurarna hormonerna erythropoetin (EPO) – som stimulerar benmärgen till ökad erythropoes – och renin – som utgör en viktig del i att bibehålla ett normalt blodtryck – med hjälp av reninangiotensinaldosteron-systemet (RAAS). I njurarna aktiveras även vitamin D till calcitriol som är viktig för kalcium- och fosforupptaget i tarmen.

Urinproduktionen sker genom njurarnas funktionella enheter: nefron (Sjaastad *et al.* 2010; Zachary & McGavin 2012; König & Liebich 2014). En njure hos hund har upp till 400 000 nefron. Ett nefron är uppbyggt av ett kapillärkomplex, där filtrationen av plasma sker, samt ett tillhörande rörsystem som reglerar innehållet i filtratet.

Kapillärnätverken, glomeruli, förses med blod av en afferent arteriol och omges av Bowmans kapsel. De återfinns i *cortex*. Blodet från den afferenta arteriolen filtreras genom blod-urinbarriären. Blod-urinbarriären utgörs av glomerulis fenestrerade endotel, ett gemensamt basalmembran samt podocyter i Bowmans kapsel.

Podocyter är celler som omger kapillärerna i glomeruli och har långa cellutskott, varemellan filtreringen sker. På cellerna finns ett skikt med negativt laddade glykoproteiner (Zachary & McGavin 2012). Blodurinbarriären har till följd av dessa egenskaper begränsad permeabilitet. Den är selektiv med avseende på både storlek (70kDa) och laddning (repellerar negativt laddade molekyler). Ultrafiltratet, eller primärurinen, har samma osmolalitet som plasma, men saknar de flesta av proteina eftersom de är för stora och ofta negativt laddade. Större molekyler som proteiner filtreras endast i en mycket liten utsträckning, medan små oladdade molekyler som exempelvis glukos filtreras fritt (Sjaastad *et al.* 2010). Efter filtration flödar blodet vidare i den efferenta arteriolen (Zachary & McGavin 2012; König & Liebich 2014).

Primärurinen i sin tur fångas upp av den första delen av njurarnas tubulisystem, proximala tubuli, som även de återfinns i *cortex*. I proximala tubuli är tubulilumen omgiven av ett kubiskt epitel med en hög metabolisk aktivitet (Sjaastad *et al.* 2010). Apikalt på epitelcellerna finns stora och till antalet många mikrovilli som ökar cellernas yta, så kallad "brush border". Basalt finns natrium-kalium-pumpar. Den här delen av nefronet ansvarar för resorption av majoriteten av natrium-, klorid-, kalium- och bikarbonatjoner, samt av vatten och förhindrar därmed en drastiskt sjunkande blodvolym. I glomeruli filtreras 20% av hjärtminutvolymen och kroppen behöver återta majoriteten av den vätskan (Sjaastad *et al.* 2010; König & Liebich 2014). Friska njurar har mycket hög kapacitet till att anpassa urinens vatteninnehåll efter djurets vattenintag. Vanligen är osmolaliteten i plasma lägre än den i urinen, men det förekommer att förhållandet är det omvända (Sjaastad *et al.* 2010). I proximala tubuli sker även resorption av glukos, albumin och cystatin C med flera ämnen, samt sekretion av väte- och kaliumjoner (Filler *et al.* 2005; Sjaastad *et al.* 2010). Resorption kan vara aktiv och energikrävande, exempelvis genom natriumkaliumpumpar (Sjaastad *et al.* 2010). Den kan även vara passiv som vid diffusion av vatten. Diffusion av vatten kan ske även genom tight junctions mellan proximala tubuliceller. Sekretion är däremot alltid är en aktiv process.

Nästa del av nefronet är Henles slynga. Henles slynga är en loop som passerar ned i *medulla* och är, liksom proximala tubuli, viktig för vatten- och elektrolytresorptionen (Sjaastad *et al.* 2010; Zachary & McGavin 2012). Henles slynga övergår i distala tubuli, som återfinns i *cortex*, och har en mer styrd resorption och sekretion. I distala tubuli finns betydligt färre mikrovilli. Vatten resorberas inte längre genom passiv diffusion med hjälp av koncentrationsgradienten, utan genom så kallade aquaporiner som är hormonstymda (antidiuretiskt hormon, ADH) (Sjaastad *et al.* 2010; Zachary & McGavin 2012). Hormonet aldosteron reglerar här natrium- och kaliumbalansen efter kroppens behov genom resorption av natriumjoner och sekretion av kaliumjoner (Sjaastad *et al.* 2010). Det sker även sekretion av andra ämnen, exempelvis ammoniak.

Distala tubuli mynnar ut i samlingsrör (flera distala tubuli mynnar i ett och samma samlingsrör) innan den färdiga urinen transporterats ut ur njuren enligt tidigare beskrivning.

Filtrationshastigheten i glomeruli (GFR) beror på ett antal faktorer, både permeabiliteten i glomerulifiltren och nettofiltrationstrycket. Det sistnämnda, nettofiltrationstrycket, bestäms av det hydrostatiska trycket i glomeruli och Bowmans kapsel, samt det proteinosmotiska trycket i plasma (Sjaastad *et al.* 2010). Regleringen av GFR sker genom tre mekanismer. Den första är autoreglering som innebär att den afferenta arteriolen anpassar sin diameter efter rådande blodtryck. Den andra mekanismen utgörs av angiotensin II, som styrs med hjälp av renin-angiotensin-aldosterosystemet (RAAS). Till sist kontrolleras GFR genom njurarnas sympatiska innervering. Vid sympatikuspåslag prioriteras blodet till andra organ än njurarna genom vasokonstriktion av njurkärlen.

## 2.2. AKI hos hund

### 2.2.1. Definition och förekomst

Akut njurskada (AKI) beskrivs enligt International Renal Interest Society (IRIS) som:

”... a spectrum of disease associated with a sudden onset of renal parenchymal injury most typically characterized by generalized failure of the kidneys to meet the excretory, metabolic, and endocrine demands of the body” (Cowgill 2013:1).

Tidigare kallades tillståndet för akut njursvikt (ARF, acute renal failure) men eftersom processen i verkligheten är successiv och inte alltid leder till organsvikt, beslutades att AKI är en lämpligare benämning (Makris & Spanou 2016). I en del litteratur kvarstår begreppet gamla definition. Akut njursvikt syftar idag till när njurarna inte längre kan upprätthålla vätske-, elektrolyt- och pH-balansen samt när det sker en ansamling av uremiska toxiner (Cowgill 2016).

Det råder oklarheter kring hur vanligt förekommande AKI är på hund. I en studie beräknades incidensen för njursjukdom (både akut och kronisk) genom att studera hundar försäkrade i försäkringsbolaget Agria mellan åren 1995–2006 (Pelander *et al.* 2015). Av 665 245 veterinärvårdsförsäkrade hundar var det 4390 hundar som någon gång sökte veterinärvård till följd av njursjukdom (incidens 15,8 fall per 10 000 hundår). Bland de 548 346 livförsäkrade hundar som studien avhandlade var det 1981 hundar som dog till följd av njursjukdom (mortalitet 9,7 dödsfall per 10 000 hundår). Hundar med AKI kunde inte skiljas från hundar med kronisk njursjukdom (CKD, chronic kidney disease) då studien var av retrospektiv karaktär och

baserad på inrapporterade diagnoskoder. På humansidan beräknas en underrapportering av AKI föreligga, framför allt i utvecklingsländer (Makris & Spanou 2016). Även hos hund anses en underrapportering sannolik till följd av att det tar tid för kliniska tecken att utvecklas och att känsliga diagnostiseringstekniker saknas (Pelander *et al.* 2015).

Enligt IRIS (Cowgill 2016) är AKI till följd av sjukhusvistelse den vanligaste orsaken till AKI hos människa, men inte hos hund och katt. Flera studier har visat en hög letalitet vid AKI hos hund, 45–57% (Vaden *et al.* 1997; Legatti *et al.* 2018).

### 2.2.2. Etiologi och patofysiologi

Akuta njurskador hos hund kan uppstå till följd av många olika orsaker. Det kan vara tillstånd som primärt affekterar njuren så som exponering för nefrotoxiska substanser (exempelvis etylenglykol och aminoglykosider), ascenderande infektioner (pyelonefrit), immunmedierad sjukdom (glomerulonefrit) eller neoplastisk sjukdom (lymfom) (Langston 2017). Njurarna kan också ta skada sekundärt till andra sjukdomstillstånd som leder till nedsatt perfusion i njurarna och därmed ischemi. Sådana tillstånd är exempelvis hypovolemi, hypotension, sepsis, tromboembolism och DIC. Ofta föreligger en kombination av olika etiologiska komponenter, både hos hund och människa. Orsakerna till AKI hos människa varierar i olika delar av världen (Makris & Spanou 2016). Det är exempelvis vanligare med AKI som komplikation hos ineliggande patienter på sjukhus i mer utvecklade länder och större städer. Omgivningsrelaterade orsaker till AKI, som diarré, dehydrering och infektion, förekommer i större utsträckning på landsbygden i mindre utvecklade länder.

Azotemi, det vill säga stegrade serumkoncentrationer av kreatinin och urea, kan uppstå av prerenala, renala och postrenala orsaker (Palm 2017). Prerenal azotemi orsakas av exempelvis hypovolemi. Postrenal azotemi i sin tur orsakas av exempelvis obstruktion av urinvägarna eller ruptur av urinblåsan. Pre- och postrenala tillstånd kan leda till intrarenala skador. Vissa författare benämner prerenal azotemi som funktionell AKI. Detta ska då jämföras med strukturell AKI när en faktisk skada uppstått i njuren. I kommande text kommer uttrycken pre- och postrenal AKI inte att användas.

Skador på njurarna kan strukturellt delas in i fyra olika områden: glomeruli, tubuli, interstitiet och de vaskulära strukturerna (Zachary & McGavin 2012). Alla dessa områden har sitt eget sätt att respondera vid skada. De drabbas olika allvarligt av olika etiologier. Skador på de vaskulära strukturerna resulterar ofta i olika typer av blödningar, exempelvis till följd av trauma eller koagulopati. Njurarnas vaskulära strukturer kan också drabbas av infarkter som leder till ischemi i mer eller mindre omfattade delar av parenkymet.

Glomeruli drabbas vanligen av immunkomplexdeponering hos både djur och människor, vilket leder till inflammation (akut glomerulonefrit) (Zachary &



McGavin 2012; Makris & Spanou 2016). Glomeruli kan också skadas genom tromboembolism och infektion (Zachary & McGavin 2012). Skador på glomeruli leder ofta till proteinuri. Proteinuri uppstår då permeabiliteten för större molekyler ökar och gränsvärdet för tubulis resorptionsförmåga överstigs. Djuret drabbas av så kallad ”protein losing nephropathy”. Detta tillstånd kan leda till nefrotiskt syndrom. En studie på råttor visade att långvarig ischemi (total ocklusion av njurartären i 20 minuter) också kan orsaka ökad permeabilitet, både avseende laddning och storlek (Rippe *et al.* 2006).

Akuta tubuliskador uppstår vanligen till följd av nefrotoxisk påverkan eller ischemi (Zachary & McGavin 2012; Langston 2017). Skada på tubuli kan också orsakas av hematogena och ascenderande infektioner (Zachary & McGavin 2012). Proximala tubuli är extra utsatt för både nefrotoxiner och ischemi på grund av den höga metabola aktiviteten (Zachary & McGavin 2012; Langston 2017) och faktumet att de kronologiskt återfinns direkt efter glomeruli (Zachary & McGavin 2012). Epitelcellerna i proximala tubuli drabbas genom att mikrovilli skadas och resorptionsförmågan blir nedsatt. Den nedsatta resorptionsförmågan uppstår till följd av en minskad adenosintrifosfat-produktion (ATP-produktion) vilket leder till dysfunktion av natrium-kaliumpumparna (Langston 2017). Låga ATP-nivåer innebär även höga nivåer av kalcium intracellulärt, frisättning av fria syreradikaler, metabolisk acidosis *etc.* (Zachary & McGavin 2012). Beroende på skadans karaktär och utbredning kan tubulicellerna degenerera, atrofiera, gå i apoptos eller nekros. Celler som går i nekros eller apoptos lossnar från basalmembranet och hamnar i tubulilumen, där de bildar cellulära cylindrar som sedan utsöndras med sekundärurinen. Om epitelcellernas basalmembran förblir intakt finns större chans till regeneration av celler och återkomst av funktion, vilket vanligen är fallet vid nefrotoxisk påverkan. Ischemi på grund av nedsatt perfusion orsakar oftare skador på basalmembranet. Ett skadat nefron kan trigga kompensatorisk hypertrofi av omgivande nefron. Akut tubulär nekros är en histopatologisk förändring som kan uppstå vid nefrotoxisk påverkan och ischemi (Zachary & McGavin 2012). Sammantaget kan kraftig/långt progredierad AKI av tubulär typ orsaka nedsatt filtration, intratubulär obstruktion, bakläckage av vätska och intrarenal vasokonstriktion (Zachary & McGavin 2012). Detta kan, beroende på skadornas utbredning, leda till nedsatt eller upphörd urinproduktion. En nedsatt urinproduktion i kombination med ett vätskeskifte (mellan intracellulära och extracellulära rummet) ger upphov till hyperkalemi. Hyperkalemi är en av de vanligaste dödsorsakerna vid AKI.

Skador på tubuli och glomeruli kan progrediera till interstitiet och orsaka akut tubulointerstitiell respektive glomerulointerstitiell nefrit (Zachary & McGavin 2012). I övrigt kan interstitiet drabbas av inflammation genom exempelvis septikemi, toxinemi och infektion (hematogen eller ascenderande). Upprepade eller tillräckligt allvarliga skador kan leda till fibrosutveckling i njuren (CKD). Njurarna

har då inte längre kapaciteten att reparera skadorna och permanent funktionsförlust uppstår.

Vid AKI kan förloppet övergå i återhämtning, CKD stage 1–4 eller att djuret avlider (Cowgill 2016). En hund med pågående CKD kan även drabbas av en akuti-sering av sitt tillstånd och presenteras kliniskt som en AKI.

### 2.2.3. Gradering och behandling

För att kunna gradera AKI hos hund och katt har IRIS skapat en lista med kriterier för totalt fem olika grader av AKI. Till skillnad från staging av CKD, som baseras på patientens ”steady state”, är gradering av AKI en momentan bedömning (Cowgill 2016). Vid AKI förväntas patientens tillstånd antingen förbättras, försämraras eller övergå i CKD. Graderingarna baseras framför allt på förändringar i serum-kreatininkoncentrationen, men även på djurets urinproduktion. Hunden eller katten ska även ha ”dokumenterad AKI”, vilket i dokumentet av IRIS beskrivs som ”historical, clinical, laboratory, or imaging evidence of AKI” (Cowgill 2016:3).

Patienter med AKI grad I–II har serum-kreatininkoncentrationer på  $<140$   $\mu\text{mol/L}$  till  $220$   $\mu\text{mol/L}$  och det ska ha skett en höjning av kreatinin inom detta intervall på  $\geq 26,4$   $\mu\text{mol/L}$  inom 48 timmar (Cowgill 2016). Vid vätskebehandling ska kreatininkoncentrationen återgå till den normala (det vill säga det värde djuret hade innan höjningen) inom 48 timmar. Vid oliguri hos dessa patienter ska urinproduktionen öka vid vätskebehandling;  $1$  mL/kg/h inom sex timmar. Djur med AKI grad III–V har serum-kreatininkoncentrationer från  $221$   $\mu\text{mol/L}$  till  $>880$   $\mu\text{mol/L}$ . Dessa patienter har drabbats av större förlust av njurparenkym och -funktion och löper högre risk att drabbas av uremi.

Behandling av AKI syftar till att upprätthålla njurarnas funktion och förhindra progredierande skada (Langston 2017). Detta uppnås primärt genom vätsketerapi, men även genom åtgärd av underliggande orsak. Vid pre- och postrenala orsaker till AKI syftar behandling till att korrigera dessa tillstånd. Korrigering av prerenala tillstånd handlar vanligen om att återställa en normal perfusion i njurarna. Vid tillstånd när patienten inte svarar på den medicinska behandlingen kan ”renal replacement therapy” (RRT) vara ett alternativ till avlivning. Renal replacement therapy innebär behandling som ersätter njurarnas egen funktion, exempelvis dialys eller njurtransplantation. Behovet av RRT är en undergradering i IRIS AKI-skala (Cowgill 2016).

### 2.2.4. Diagnosticering av AKI

Diagnosticering av AKI utförs med hjälp av IRIS AKI-gradering. För att göra det krävs kunskap om vad som kännetecknar tillståndet kliniskt. Vad räknas som ”dokumenterad” AKI? En del patienter kan diagnosticeras delvis genom anamnes,

exempelvis vid känt intag av etylenglykol eller pågående behandling med aminosyror (Syne & Jepson 2017).

### *Klinisk bild*

Den kliniska bilden vid AKI är ofta ospecifik, men varierar beroende på orsaken till njurskadorna (Syne & Jepson 2017). En hund med etylenglykolförgiftning kan exempelvis ha neurologiska tecken, medan dessa vanligen inte förekommer hos en hund med glomerulonefrit.

Det som kännetecknar AKI till skillnad från CKD är bland annat att uppkomsten av kliniska tecken hos djuren ska ha gått fort, under en veckas tid (Langston 2017; Syne & Jepson 2017). Vanligen ses anorexi, letargi, illamående/kräkning, diarré, polydipsi och polyuri eller oliguri/anuri. Vid den kliniska undersökningen förekommer ibland förstörade njurar och/eller smärta vid renal palpation. Om hunden har elektrolyttrubbningar kan taky- eller bradykardi auskulteras. I en studie kunde anuri och oliguri kopplas till försämrad prognos hos hundar med AKI till följd av indigestion av russin och vindruvor (Eubig *et al.* 2005).

Glomerulära skador med kraftig förlust av protein i njurarna (proteinuri) kan leda till så kallat nefrotiskt syndrom (Zachary & McGavin 2012). Nefrotiskt syndrom innebär att hunden får hypoalbuminemi, hyperkolesterolemi och generaliserat ödem/ascites/pleural effusion (Segev 2017).

### *Bilddiagnostik*

För att visualisera njurarna kan bilddiagnostik som röntgen och ultraljud användas. På röntgenprojektioner kan tecken på AKI som förstörade njurar och nefroliter upptäckas (Langston 2017). Med ultraljud kan förändringar så som förstörade njurar, hyperechoiska områden i *cortex* och/eller *medulla*, dilatation av njurbäcken och perirenal effusion detekteras (Syne & Jepson 2017; Mannucci *et al.* 2019). Akuta njurskador, liksom kroniska njurskador, ger inte alltid förändringar som kan detekteras med hjälp av ultraljud (Syne & Jepson 2017).

Det finns studier som tyder på att användning av ultraljud med kontrastförstärkning kan påvisa ett förändrat blodflöde i en skadad njure (Lee *et al.* 2017; Mannucci *et al.* 2019).

### *Blodanalys*

Vid misstanke om njurskada är ett mål vid blodanalys att uppskatta GFR. Den vanligaste metoden för detta i dag är genom analys av kreatinin i blod. Kreatinin är en metabolit från muskulatur (Palm 2017). Normalvärdet för kreatinin beror därför på muskelmängd och det föreligger en stor individuell variation för ämnet av den anledningen. Serum-kreatinin är i dagsläget gold standard vad gäller diagnosticering av AKI trots dess brister (Makris & Spanou 2016). Många olika markörer studeras

kontinuerligt med avseende på att hitta nya biomarkörer för GFR. Symmetriskt dimetylarginin (SDMA) är en aminosyra som i en relativt ny studie visats vara likvärdig kreatinin avseende uppskattning av GFR (Pelander *et al.* 2019).

Urea är ett ämne som brukar analyseras samtidigt som och tolkas ihop med kreatinin. Förhöjda värden av kreatinin och urea kallas för azotemi. Urea i sin tur påverkas av en rad olika faktorer, exempelvis leverfunktion (Palm 2017).

Utöver azotemi kan AKI ge upphov till elektrolytförändringar som hypokalcemi och hypo- eller hyperkalemi (Langston 2017). En del djur drabbas av rubbningar i pH-balansen i form av metabolisk acidosis. Hyperfosfatemi kan uppstå till följd av nedsatt sekretion i njurarna.

### *Urinalanalys*

Urinprov är, vid insamling av spontankastade prov, en icke invasiv provtagningsteknik. Analys av urin kan ge mycket information om patienten, bland annat avseende njurfunktion (Graham 2017). Vanligen utförs direkttester i form av mätning av specifik vikt, analys med urinstickor samt undersökning av sediment. Vid misstanke om infektion sätts en odling.

Att mäta urinens specifika vikt görs med hjälp av en refraktometer (Graham 2017). Den specifika vikten är lika med kvoten mellan vikten av urin och destillerat vatten. Tolkningen av urinens specifika vikt görs med hänsyn till den specifika vikten hos plasma. Isostenuri innebär att urinen har samma specifika vikt som plasma, det vill säga en specifik vikt på 1,008–1,012. Vid hypostenuri är urinen mer utspädd än plasma. En dehydrerad hund med fungerande njurar förväntas ha en specifik vikt över cirka 1,035–1,040. Är den specifika vikten lägre än så kan det bero på att njurarna inte kan koncentrera urinen ordentligt.

Protein i urinen kan analyseras semikvantitativt med urinstickor, men dessa har begränsat mätområde och måste tolkas tillsammans med urinens specifika vikt (Graham 2017). Låga nivåer av protein kan förekomma i urin hos friska hundar. En studie på hund rekommenderar att alla resultat med 1+ eller högre samt en specifik vikt på  $\leq 1,012$  ska kvantifieras med urin-protein-kreatininkvot (UPCR; urine-protein to creatinine ratio) (Zatelli *et al.* 2010). Protein i urinen kan bero på prerenala (exempelvis hemolys), renala (glomerulära eller tubulära skador) eller postrenala (exempelvis inflammation i nedre urinvägarna) orsaker (Graham 2017).

Glukosuri förekommer när glukoskoncentrationen i blodet överstiger proximala tubulis förmåga till resorption (170–180 mg/dL) (Graham 2017). Hyperglykemi är den vanligaste orsaken till glukosuri. Glukosuri förekommer även hos normoglykemiska patienter och tyder då på tubuliskada. Glukos i urin kan mätas med hjälp av urinstickor och genom kemisk analys. Falskt negativa svar på urinstickorna förekommer bland annat vid analys av kall urin.

Hematuri innebär blod i urinen och hemoglobinemi innebär hemoglobin i urinen (Graham 2017). Vid nedbrytning av erythrocyter frisätts hemoglobin (Sjaastad *et al.*

2010). Hemoglobin i plasma binder i normala fall till haptoglobin, ett protein som är för stort för att filtreras. Vid en ökad nedbrytning av erythrocyter (hemolytiska tillstånd) blir haptoglobulinet mättat och vidare kan en del av hemoglobinet passera ut i urinen. Erythrocyter i urinen tyder på blödning av ospecifik härkomst (Graham 2017). Blödningen kan vara renal, men är vanligtvis postrenal till följd av inflammation eller trauma i nedre urinvägarna. Hematuri och hemoglobinuri kan mätas med urinstickor och förekomst av erythrocyter verifieras genom undersökning av urinsediment.

Förekomst av leukocyter i urinen kan bero på inflammation, nefroliter och neoplasma någonstans i urinvägarna (Graham 2017). Små mängder förekommer normalt i urin hos friska hundar. Vid spontankastade urinprov kan leukocyter i urinen vara en kontamination från genitalia. Leukocyter kvantifieras säkrast genom undersökning av urinsediment. Vid semikvantitativ analys på urinsticka används metoder för detektering av leukocytsteras-aktivitet. Få studier finns tillgängliga avseende analys av hundurin med den här metoden.

Cylindrar är ansamlingar av proteinrikt debris eller cellulärt material som kommer från njurarnas tubulisystem (Graham 2017). De kan detekteras i urinsediment. Det finns olika typer av cylindrar: hyalina, granulära, cellulära och vaxartade. Hos friska hundar kan små mängder av hyalina och granulära cylindrar förekomma utan klinisk relevans. I en studie på människa förekom minst en granulär cylinder per synfält i 40 gångers förstoring hos cirka 55 % av konstaterat njursjuka patienter (Perazella *et al.* 2008). Cellulära cylindrar talar för definitiv tubuliskada till följd av ischemi, inflammation eller toxinpåverkan. De cellulära cylindrarna kan utgöras av en blandning mellan döda tubuliceller, leukocyter till följd av inflammation och erythrocyter till följd av blödning (Zachary & McGavin 2012). Vaxartade cylindrar förekommer vid långt progredierad njurskada, ofta CKD, alternativt vid urinstas (Graham 2017). I en studie sågs hyalina och/eller cellulära cylindrar hos samtliga hundar (n=4) med inducerad AKI till följd av exponering för toxiska doser av gentamicin (Sasaki *et al.* 2014). I en studie av Vaden *et al.* (1997) förekom hyalina och/eller granulära cylindrar i sediment hos 28 av 89 hundar med akut njursvikt (ARF). Fem eller fler cylindrar detekterades hos fem av dessa hundar. Eubig *et al.* (2005) undersökte resultat av bland annat urinanalyser retrospektivt hos hundar med AKI till följd av indigestion av russin eller vindruvor. Hyalina eller granulära cylindrar förekom hos fem av 24 hundar (Eubig *et al.* 2005).

Epitelceller kan detekteras i sediment (Graham 2017). De celler som oftast ses är övergångsepitel från nedre urinvägarna (rundepitel) samt skivepitelceller (plattepitel) från vagina eller uretra. Det är ovanligt att påvisa renala tubulära celler eller kubiska celler med mikrovilli ("brush border") från proximala tubuli. Hos 29 % av patienterna i en studie på människa med konstaterad AKI förekom tubulära epitelceller (minst en per synfält med 40 gångers förstoring) i urinsediment (Perazella *et al.* 2008).

Kristaller kan förekomma i urin hos friska hundar utan klinisk relevans (Graham 2017). Urin med hög koncentration predisponerar för kristallbildning. Förvaring i kylskåp och förlängd tid till analys är faktorer som kan öka förekomsten av kristaller. Det finns kristaller som förekommer i urinen vid specifika sjukdomstillstånd, exempelvis kalciumoxalatmonohydratkristaller vid etylenglykolförgiftning (Syme & Jepson 2017). Andra kristalltyper förekommer vid vissa medfödda defekter, behandling med vissa läkemedel *etc.* (Graham 2017).

## 2.3. Cystatin C

Cystatin C är ett positivt laddat protein med en låg molekylvikt på cirka 13 kDa som produceras av de flesta kärnförande celler i kroppen i en kontinuerlig takt (Grubb 2001). Proteinet är uppbyggt av 120 aminosyror och sekvensering av dessa genomfördes för första gången år 1981. Cystatin C är ett proteasom som har till uppgift att inhibera cysteinproteaser. Efter produktion utsöndras cystatin C ur cellerna. Cystatin C återfinns framför allt extracellulärt: i blod, cerebrospinalvätska, saliv *etc.* De flesta studier som avhandlat mekanismerna för cystatin C är från humansidan.

I njurarna filtreras cystatin C fritt till följd av sin storlek och positiva laddning (Grubb 2001; Filler *et al.* 2005). I proximala tubuli genomgår cystatin C sedan en i princip fullständig resorption och degradering. Resorptionen sker genom megalin-medierad endocytos (Kaseda *et al.* 2007). Megalin är ett stort glukoprotein som återfinns på de proximala tubulicellernas apikala cellmembran. Transporten är kalciumberoende.

Urin hos friska hundar innehåller, på grund av den i princip totala resorptionen och degraderingen, obefintliga till mycket låga mängder av cystatin C. I ett examensarbete av Damm (2020) analyserades urinen för bland annat cystatin C hos 30 kliniskt friska hundar för att ta fram ett referensintervall. Cystatin C för dessa hundar låg mellan 0,00–0,12 mg/L, medianen uppmättes till 0,02 mg/L. För den fraktionella utsöndringen av cystatin C hos samma hundar uppmättes ett riktvärde (inkluderade 96,7% av studiepopulationen) till <0,20%. I en annan studie på 14 friska hundar mättes cystatin C-koncentrationerna i urin också till ett medianvärde på 0,02 mg/L med en standardavvikelse på  $\pm 0,06$  (Monti *et al.* 2012). I studien av Monti *et al.* (2012) var ålder inte en faktor som påverkade cystatin C-koncentrationen i urin. Normalvärde för cystatin C i urin hos människa är <0,18 mg/L (Conti *et al.* 2009).

I blod är det flera olika faktorer utöver GFR som påverkar koncentrationen av cystatin C. En relativt stor individuell variation hos friska hundar har iakttagits (Pagitz *et al.* 2007). Högre ålder innebär ökade koncentrationer av cystatin C på hund (Monti *et al.* 2012). Behandling med kortikosteroider orsakade höjningar av cystatin C-koncentrationen i blod på hund i en studie (Muñoz *et al.* 2017). I samma

studie förelåg ingen signifikant skillnad mellan hundar diagnosticerade med hyperadrenokorticism och kontrollgruppen. Ansamling av kylomikroner i plasma kan leda till både falskt höga och låga värden enligt humanlitteratur (Grubb 2001). Cystatin C i serum påverkades även av sjukdomar i sköldkörteln enligt flera studier på människa (Fricker *et al.* 2003; Jayagopal *et al.* 2003; Wiesli *et al.* 2003). Lägre koncentrationer av cystatin C detekterades hos hypotyroida människor och högre koncentrationer av cystatin C detekterades hos hypertyroida människor. Vid behandling av sköldkörtelsjukdomarna stabiliserades koncentrationerna.

Analys av Cystatin C har studerats både i blod och urin med avsikt att upptäcka nedsatt GFR respektive skada på proximala tubuli. Analysen används inte kliniskt på hund i nuläget.

### 2.3.1. Cirkulerande cystatin C som markör för nedsatt GFR

Resultaten avseende användande av cystatin C i serum som biomarkör för GFR varierar. I en studie på 97 hundar (67 med misstänkt/diagnosticerad CKD och 30 friska) utvärderades cystatin C som biomarkör för GFR jämfört med kreatinin och SDMA (Pelander *et al.* 2019). Både kreatinin och SDMA var bättre markörer för GFR än cystatin C i den studien.

En humanstudie jämförde kreatinin i serum med cystatin C i serum hos 85 IVA-patienter (Herget-Rosenthal *et al.* 2004). Cystatin C-koncentrationen ökade snabbare än kreatininkoncentrationen hos de 44 patienter som utvecklade AKI i den studien.

### 2.3.2. Cystatin C i urin som markör för tubuliskada

Huruvida mätning av cystatin C i urin är en känslig metod för detektering av tubuliskada är inte helt klarlagt. Det finns i nuläget få studier som avhandlat detta på hund. Monti *et al.* (2012) undersökte förekomsten av Cystatin C i urin från 46 hundar. Hundarna delades in i grupper beroende på om de var friska, njursjuka eller sjuka av annan anledning. Majoriteten av hundarna i den njursjuka gruppen var diagnosticerade med CKD. I studien förelåg skillnad mellan gruppen med njursjuka hundar och de andra grupperna, men inte mellan gruppen med friska hundar och gruppen med hundar sjuka av andra orsaker än njursjukdom.

En annan studie på hund undersökte olika renala biomarkörer i relation till GFR (som mättes med hjälp av iodixanol) hos fyra hundar med gentamicin-inducerad AKI (Sasaki *et al.* 2014). Gentamicin injicerades sju dagar i rad. Markörerna mättes hos hundarna innan ”behandling” samt fyra och åtta dagar efter första injektionen. En förhöjning av cystatin C i urin detekterades vid provtagningen dag fyra, vilket var snabbare än för både serum-kreatinin, serum-urea och de andra markörerna. Hos samtliga hundar i gentamicingruppen visade histopatologisk undersökning av vänster njure dag åtta på kraftig degeneration/nekros av proximala tubuli.

Ytterligare en studie undersökte sambandet mellan serum-kreatininkoncentrationer, UPCr och urin-cystatin C-koncentrationer hos hundar med CKD orsakad av leishmanios (García-Martínez *et al.* 2015). Studiens hypotes var att ökad permeabilitet i glomeruli skulle föranleda höjda nivåer av cystatin C, vilket det gjorde först vid serum-kreatininkoncentrationer  $>124 \mu\text{mol/L}$  och UPCr  $>0,5$ .

#### *Normalisering med avseende på kreatinin*

För att få ett tillförlitligt värde på protein i urin rekommenderas ofta normalisering med kreatinin, vilket ger urin-protein-kreatininkvot. Syftet med normaliseringen är att ta hänsyn till urinkoncentrationen vid tolkning av värdet. Normalisering av cystatin C med kreatinin kan ge missvisande resultat enligt Conti *et al.* (2009). I studien av Conti *et al.* (2009) undersöktes 13 människor som genomgått njurtransplantation. Koncentrationer för bland annat cystatin C och kreatinin i urin uppmättes. På nio av personerna utfördes renala biopsier med syfte att upptäcka avstötning. Fyra av biopsierna visade inga tecken på avstötning. Urin-cystatin C-koncentrationerna och urin-cystatin C-kreatininkvoterna var  $0,07\text{--}0,17 \text{ mg/L}$  respektive  $0,064\text{--}0,081 \text{ mg/mmol}$  hos dessa personer. Motsvarande värden för de fem personer som visade tecken på avstötning var  $0,19\text{--}0,29 \text{ mg/L}$  och  $0,023\text{--}0,049 \text{ mg/mmol}$ . Artikelförfattarna menar att normalisering med hjälp av kreatinin riskerar att ge falskt positiva resultat på människa. I studien av Monti *et al.* (2012) var kvoten signifikant högre hos de njursjuka hundarna än både de friska och de som var sjuka av annan anledning än njursjukdom. De flesta av njursjuka hundarna var diagnosticerade med CKD.



## 3. Material och metoder

### 3.1. Studiepopulation och insamling av material

Insamling av urinprov skedde från hundar inlagda på intensivvårdsavdelningen (IVA) och vårdavdelning på Universitetsdjursjukhuset (UDS) vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) under perioden 7 september till 25 september 2020. Samtliga hundar som befann sig på IVA under de totalt 16 dagarna som insamlingen pågick inkluderades, förutsatt att provtagningen var praktiskt genomförbar. Målsättningen var att ta totalt tre urinprov från varje hund; det första innan påbörjad vätsketerapi och de andra ett respektive två dygn efter det första urinprovet. Personal på akutmottagningen på UDS ombads spara överbliven urin från redan tagna urinprov för att öka chanserna till att erhålla det initiala urinprovet innan hunden påbörjat vätskebehandling.

Proverna samlades från spontankastad urin, med undantag från de fall då hunden redan hade urinkateter (tabell 1). I dessa fall samlades urinen optimalt direkt från den befintliga katetern, men när detta inte var möjligt aspirerades urinprovet från kateterpåsen efter att denna blandats ordentligt. Hundar som efter första urinprovet flyttades från IVA till vårdavdelningen inkluderades fortsatt i studien.

Efter insamling av urinprov studerades patienternas journaler. Hundarna delades in i tre grupper (tabell 1). Hundar med konstaterad njurpåverkan (exempelvis vid kvalificering för AKI enligt IRIS gradering, CKD sedan tidigare eller bildiagnostiska fynd som tyder på njurskada *etc.*) placerades i grupp A. Hundar utan konstaterad njurpåverkan men med nedsatt cirkulation (exempelvis hypovolemi) placerades i grupp B. Till sist placerades hundar utan både konstaterad njurskada och nedsatt cirkulation (exempelvis postoperativ smärtövervakning efter diskbråcksoperation) i grupp C.

Studien hade etiskt godkännande för användning av urinprov från hundar inskrivna på UDS i forskningssyfte (Dnr 5.8.18-15533/2018). Djurägarmedgivande för användning av journal och överblivet material från tagna prover i utbildnings- och forskningssyfte erhöles vid inskrivning av samtliga hundar i studien.

Insamling av urinprov från friska hundar pågick under samma tidsperiod. Frisk definierades i studien som ”utan kliniska tecken på sjukdom”. Några av hundarna hade behandlats med fästigprofylaktiska läkemedel, men i övrigt förekom ingen

medicinering. Proverna erhöles från hundar ägda av andra studenter på frivillig basis. Från de friska hundarna erhöles endast ett spontankastat urinprov. Urinsamlingen skedde under dagtid (ej specifikt morgonurin).

## 3.2. Hantering och analys av urinprov

I direkt anslutning till provtagning för respektive urinprov, analyserades urinen med hjälp av urinstickorna Multistix 7 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, USA) för variablerna: leukocyter, nitrit, protein, pH, blod, ketoner och glukos. Urinstickorna avlästes med hjälp av analysapparat (Urisys 1100 urine analyzer, Roche Diagnostics, Basel, Schweiz). Den specifika vikten mättes med refraktometer (ATAGO Master-URC/Na U.G. 1.000–1.050, ATAGO co LTD, Tokyo, Japan). Urinsediment analyserades med hjälp av analysapparaten SediVue Dx (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA). Resultaten antecknades på individuella provtagningsprotokoll (se Bilaga 1) och fördes sedan in i ett exceldokument. Resterande mängd urin överfördes efter homogenisering till separata datum- och individmärkta kryrorör och frystes in i en temperatur av cirka  $-80^{\circ}\text{C}$  för senare biokemisk batchanalys av cystatin C, kreatinin och protein.

Analys av urinsediment utfördes med hjälp av analysapparaten SediVue Dx. SediVue Dx analyserar 165  $\mu\text{L}$  ocentrifugerad urin med avseende på röda och vita blodkroppar, bakterier, epitelceller, kristaller och cylindrar (IDEXX Laboratories 2020). Urinen tillsätts i en kassett och centrifugeras sedan i instrumentet i låg hastighet under 30 sekunder. Efter det undersöker det inbyggda mikroskopet sedimentet. Maskinen tar 70 bilder motsvarande cirka 45 "high power fields" (HPF; synfält vid 40 gångers förstoring) per urinprov. Resultaten presenteras som antal per HPF för leukocyter, erythrocyter, epitelceller och kristaller och antal per "low power field" (LPF; synfält vid 10 gångers förstoring) för cylindrar. Förekomst av erythrocyter, leukocyter och kristaller presenteras i ett intervall mellan  $<1$  och  $>50$ . Förekomst av epitelceller presenteras i ett intervall mellan  $<1$  och  $>10$ . Resultat för bakterie- och cylinderförekomst presenteras som antingen konstaterad förekomst, misstänkt förekomst eller ingen förekomst. Fotografierna som SediVue Dx tagit sorteras i en ordning där de av bäst kvalitet och med flest fynd placeras längre fram. I de fall SediVue Dx varnade för "crowded image" späddes proven till 1:10 med hjälp av van laboratoriepersonal på laboratoriet för klinisk kemi på UDS och urinprovet analyserades igen.

Efter analys bedömdes samtliga bilder manuellt av masterstudenten, med stöd av klinisk patolog Inger Lilliehöök, för att minska risken för eventuellt oupptäckta felaktigheter i analysresultaten. SediVue Dx har en funktion som gör det möjligt att visualisera vad maskinen bedömt respektive komponent i fotografierna som. Störst fokus lades på att räkna antalet cylindrar (eftersom de kan indikera njurskada) och

jämföra dessa med resultatet från SediVue Dx. En översiktlig bedömning av maskinens benämning av de andra komponenterna på fotografierna av sedimentet utfördes också.

Batchanalys av urinproverna (efter infrysning i  $-80^{\circ}\text{C}$ ) avseende kreatinin, cystatin C och protein ägde rum den 19 oktober 2020. Urinproverna analyserades i Architect c4000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Två timmar innan analys tinades urinproverna i rumstemperatur. Proverna blandades i sin behållare och centrifugerades sedan på en hastighet av 3500 varv per minut i fem minuter. Sedan pipetterades supernatanten över till specifika provrör anpassade för analysapparaten. Dessa provrör märktes upp med individuella kodmärkningar och placerades i analysapparaten. För att undvika skillnader mellan grupper, orsakat av ändring över tid vid analys av proverna, analyserades de i en blandad ordning (mellan kontroller och prover från grupp A, B och C). Innan proverna analyserades genomfördes kvalitetskontroll för urin-protein och urin-kreatinin med en kommersiell urinkontroll uTrol (Thermoscientific, Vantaa, Finland) och för cystatin C med cystatin-C control (Gentian Diagnostics AS, Moss, Norge).

Utifrån de erhållna värdena beräknades kvoter av protein och kreatinin respektive cystatin C och kreatinin. Resultaten omvandlades till samma enhet innan beräkning avseende UPCR och urin-cystatin C-kreatininkvoterna.

### 3.3. Statistisk analys

Deskriptiva uträkningar i form av median och kvartilavstånd utfördes i Microsoft Excel. Vid uträkning av median och kvartilavstånd för parametrar på urinstickorna omvandlades de olika resultaten på följande vis: negativt = 0; spår = 0,5; 1+ = 1; 2+ = 2 *etc.*

För de statistiska analyserna användes programmet MiniTab 19. Jämförelser mellan hundgrupperna (icke normalfördelade data) utfördes med hjälp av Mann-Whitney U-test. P-värden  $<0,05$  räknades som statistiskt signifikanta.

## 4. Resultat

### 4.1. Studiepopulation

Totalt 43 urinprov samlades in från 32 olika hundar. Av de 32 hundarna var 15 friska hundar (kontrollgruppen) och 17 var hundar inskrivna på IVA eller vårdavdelningen (IVA-gruppen). Tre av de 17 hundarna i IVA-gruppen var inskrivna på vårdavdelningen vid första provtagningsstillfället, i övrigt togs alla initiala urinprov från hundar på IVA. Från de 17 hundarna i IVA-gruppen togs totalt 28 urinprover. Tre urinprover erhöles från tre hundar, två urinprover erhöles från fem hundar och från resterande nio hundar erhöles endast ett urinprov per hund. Anledningar till färre än tre insamlade urinprov var exempelvis att hunden avlivades eller skrevs ut och åkte hem. Hundraserna som förekom mest frekvent i IVA-gruppen var blandras (tre) och border collie (två), övriga hundar var av olika raser. Elva av hundarna var tikar (sex intakta och fem kastrerade) och sex av hundarna var hanar (tre intakta och tre kastrerade). Nio urinprov från fyra olika hundar i IVA-gruppen erhöles genom befintliga urinkatetrar. Tre av dessa urinprov togs direkt från befintlig kateter, medan sex av urinproverna aspirerades ur kateterpåsen. Tre av urinproverna som aspirerades ur kateterpåsen var upp till två och en halv timme gamla vid insamling och de resterande tre urinproverna var fyra till sju timmar gamla vid insamling.

Tre av hundarna i IVA-gruppen inkluderades i grupp A (kliniskt uppenbart njursjuka hundar), elva hundar inkluderades i grupp B (hundar utan kliniskt uppenbar njurskada men med nedsatt cirkulation) och tre hundar inkluderades i grupp C (hundar med varken kliniskt uppenbar njurskada eller nedsatt cirkulation). Samtliga hundar i IVA-gruppen utom en (IVA 11) hade påbörjat vätskebehandling innan första urinprovet. I tabell 1 beskrivs grupptillhörighet, diagnos, ålder, provtagnings-teknik och provantal för samtliga hundar i IVA-gruppen.

Tabell 1. Hundar från IVA och vårdavdelningen: grupp, diagnos, ålder, provtagningsteknik och provantal. Grupp A innefattar kliniskt njursjuka hundar, grupp B innefattar hundar utan kliniskt uppenbar njurskada men nedsatt cirkulation och grupp C innefattar hundar med varken kliniskt uppenbar njurskada eller nedsatt cirkulation. Diagnos och ålder erhöles från hundarnas journaler. \*Det råder vissa oklarheter kring huruvida ett av proverna var spontankastat eller erhöles från redan befintlig kateter.

Individ	Grupp	Diagnos	Ålder (år)	Sp.kast(S)/ Kateter(K)	Antal prover
IVA 1	A	Symtom på sjukdom utan fastställd orsak, njure/uretär Hypertoni	9	K	2
IVA 2	A	Övriga akuta inflamma-to- risk tillstånd, njure/uretär Proteinrubbingar Fever	12	S	2
IVA 3	A	Blodig diarré IRIS AKI grad 2	5	K	3
IVA 4	B	Supraventrikulär takykardi Symtom på neurologisk sjuk- dom	4	S*	2
IVA 5	B	Rotspetsabscess Sepsis	6	K	1
IVA 6	B	Traumatiska/mekaniska ska- dor, hela djuret	1	S	2
IVA 7	B	Kräkning och diarré Chock	10	S	1
IVA 8	B	Adenocarcinom tunntarm Invagination av tunntarm	9	S	3
IVA 9	B	Pyometra	8	S	1
IVA 10	B	Akut hepatit Pyometra	3	S	1
IVA 11	B	Epileptiforma kramper	4	S	1
IVA 12	B	Fraktur revben/bröstben Smärta från kotpelarens leder vid palpation	10	S	2
IVA 13	B	Symtom på sjukdom utan fastställd orsak, hela djuret	7	S	1
IVA 14	B	Ormbett	11	S	1
IVA 15	C	Diskbräck i thorakolumbal- regionen	5	S	1
IVA 16	C	Trombos/emboli, ryggmärg	8	K	3
IVA 17	C	Tumör i paratyroidea	10	S	1

Från kontrollgruppen erhölls ett spontankastat urinprov per hund, vilket innebär totalt 15 urinprover. Hundarna var från ett halvår till tio år gamla och de hundraser som förekom mest frekvens var engelsk springer spaniel (två), mops (två), akita (två) och pudel (två). Resten av hundarna var av olika raser. Elva av hundarna i kontrollgruppen var tikar (fem intakta och sex kastrerade) och fyra av hundarna var hanar (tre intakta och en kastrerad).

## 4.2. Cystatin C-koncentration och -kreatininkvot

Resultaten för hundarnas initiala urinprov avseende kreatininkoncentration, proteinkoncentration, urin-protein-kreatininkvot (UPCR), cystatin C-koncentration och urin-cystatin C-kreatininkvot presenteras i tabell 2. Totalt analyserades 16 initiala urinprov från IVA-gruppen, då ett av hundarnas initiala urinprov var av för liten mängd för den biokemiska analysen. Från ett av de 16 initiala urinproverna från IVA-gruppen erhölls inget värde för cystatin C trots analys.

Samtliga hundar i kontrollgruppen uppmätte cystatin C-koncentrationer på  $\leq 0,12$  mg/L, vilket var laboratoriets preliminära referensvärde för cystatin C. Nio (16 %) av de 15 hundarna i kontrollgruppen uppmätte en cystatin C-koncentration under analysmetodens lägsta mätvärde (0,02 mg/L). Åtta (47 %) av de 16 initiala urinproverna i hela IVA-gruppen uppmätte en cystatin C-koncentration under analysmetodens lägsta mätvärde. Förhöjd cystatin C-koncentration ( $>0,12$  mg/L) uppmättes hos fyra (27 %) av 15 hundar i IVA-gruppen (tabell 3 och figur 1), varav två i grupp A (kliniskt uppenbart njursjuka hundar) och två i grupp B (hundar utan kliniskt uppenbar njurskada men med nedsatt cirkulation). Den tredje hunden i grupp A uppmätte ett värde på 0,12 mg/L, vilket var precis på gränsen till ett förhöjt värde.

Sju hundar (47 %) uppmätte förhöjda urin-cystatin C-kreatininkvoter på  $>35 \times 10^{-6}$  i IVA-gruppen (referensvärde från Damm (2020); tabell 3 och figur 1). Av dessa inkluderades de fyra hundarna med förhöjda cystatin C-koncentrationer, hunden i grupp A med cystatin C-koncentration på 0,12 mg/L samt ytterligare två hundar från grupp B. Samtliga urinprov från hundarna i kontrollgruppen uppmätte en urin-cystatin C-kreatininkvot på  $<35 \times 10^{-6}$ .

Bland hundarna med både förhöjd koncentration och kvot fanns en hund som sedan innan var diagnosticerad med CKD (IVA 1) och en annan som misstänktes lida av pyelonefrit med dilaterade njurbäcken vid ultraljudsundersökning (IVA 2). Från båda dessa hundar erhölls två urinprov där koncentrationen och kvoten hade sjunkit vid andra provtagningstillfället (tabell 5). Den tredje hunden med både förhöjd koncentration och kvot genomgick en tarmresektion och diagnosticerades med adenocarcinom efter histopatologisk undersökning (IVA 8). Från IVA 8 erhölls tre urinprov och stegringen skedde vid det andra provtagningstillfället (tabell 5). Den

fjärde hunden opererades för pyometra och diagnosticerades även med kronisk hepatit (IVA 10). Hunden med en cystatin C-koncentration på 0,12 mg/L och stegrad kvot (IVA 3) diagnosticerades med IRIS AKI grad 2 under sjukhusvistelsen. Även från IVA 3 erhöles tre urinprov och de två sista urinproverna uppmätte cystatin C-värden under analysmetodens lägsta mätvärde (tabell 5). Bland de två andra hundarna med normal koncentration men stegrad kvot drabbades den ena av hypovolemisk chock efter upprepade kräkningar och diarré (IVA 7) och den andra inkom till djursjukhuset med tecken på kompenserad till tidigt de-kompenserad chock och opererades för pyometra (IVA 9).

Tabell 2. Resultaten för hundarnas initialprov från de biokemiska analyserna presenterade i median (kvartilavstånd). Värden <0,02 har räknats som 0. Grupp A utgörs av kliniskt uppenbart njursjuka hundar, grupp B av hundar utan kliniskt uppenbar njurskada men med nedsatt cirkulation, och grupp C av hundar med varken kliniskt uppenbar njurskada eller nedsatt cirkulation. \*För cystatin C gäller n-1 eftersom det inte erhöles något provsvar från ett av initialurinproverna i grupp B, trots analys.

Analys	IVA (n=27*)				Kontroll (n=15)
	Samtliga (n=16*)	Grupp A (n=3)	Grupp B (n=10*)	Grupp C (n=3)	
u-cystatin C (mg/L)	0,00 (0,00–0,08)	6,91 (3,51–7,44)	0,00 (0,00–0,03)	0,00 (0,00–0,01)	0,00 (0,00–0,02)
u-cystatin C-kreatininkvot ( $\times 10^{-6}$ )	0 (0–104)	2 297 (1 480–3 004)	0 (0–729)	0 (0–5)	0 (0–10)
u-protein-kreatininkvot	0,36 (0,18–0,64)	1,62 (0,99–5,42)	0,34 (0,19–0,49)	0,17 (0,16–0,26)	0,06 (0,05–0,07)
u-kreatinin ( $\mu\text{mol/L}$ )	6 439 (3 521–10 733)	2 391 (2 193–5 241)	7 835 (4 450–11 261)	6 865 (4 712–14 967)	19 459 (13 390–23 314)
u-protein (g/L)	0,19 (0,15–0,42)	0,36 (0,35–1,43)	0,19 (0,16–0,50)	0,13 (0,12–0,15)	0,16 (0,13–0,18)

Tre av hundarna med förhöjda cystatin C-koncentrationer uppmätte serum-kreatinin-koncentrationer inom referensintervallet (tabell 3). I övrigt var det endast en till hund med förhöjd kvot (IVA 3) som uppmätte ett förhöjt serum-kreatinin.

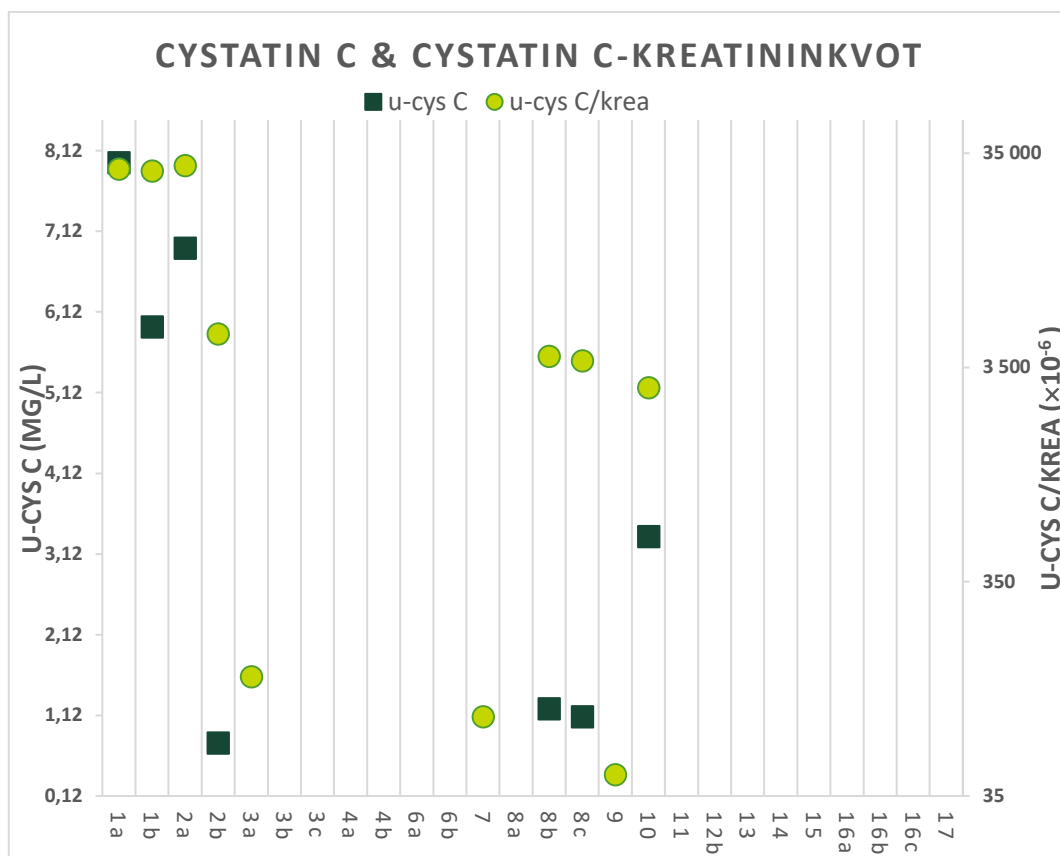
Tabell 3. Data gällande de sju hundarna med förhöjd cystatin C-koncentration (u-cys C) och/eller urin-cystatin C-kreatinin-kvot (u-cysC/krea); grupptillhörighet, UPCR, serum-kreatinin (s-krea), urinprovets specifika vikt och hundens vikt. Bokstaven efter individnumret representerar provnummer (IVA 1a = prov ett från IVA 1, IVA 8b = prov två från IVA 8). Fetmarkerade siffror indikerar värde över referensintervall. Grupp A innebär kliniskt uppenbart njursjuk individ och grupp B innebär individ utan kliniskt uppenbar njurskada men med nedsatt cirkulation. Referensintervallet för s-kreatinin för aktuellt laboratorium var 44–159  $\mu\text{mol/L}$ . \*Värdet erhöles en dag innan urinprovtagning.

Individ	Grupp	u-cys C (mg/L)	u-cys C/krea ( $\times 10^{-6}$ )	UPCR	s-krea ( $\mu\text{mol/L}$ )	Specifik vikt	Vikt (kg)
IVA 1a	A	<b>7,97</b>	<b>29 473</b>	<b>9,2</b>	<b>378</b>	1,009	40
IVA 2a	A	<b>6,91</b>	<b>30 623</b>	<b>1,6</b>	57	1,009	7
IVA 3a	A	0,12	<b>126</b>	0,4	<b>185</b>	1,019	36
IVA 7a	B	0,04	<b>82</b>	0,4	135*	1,011	14
IVA 8b	B	<b>1,20</b>	<b>3 938</b>	<b>0,6</b>	57	1,009	22
IVA 9a	B	0,03	<b>45</b>	<b>1,1</b>	96*	1,015	19
IVA 10a	B	<b>3,34</b>	<b>2 816</b>	<b>0,5</b>	95*	1,032	18

#### 4.2.1. Jämförelser mellan samtliga prover i IVA-gruppen

Sju urinprov uppmätte en förhöjd ( $>0,12$  mg/L) cystatin C-koncentration jämfört med tio urinprov som uppmätte en förhöjd ( $>35 \times 10^{-6}$ ) urin-cystatin C-kreatininkvot (referensvärden från Damm (2020)). Resultat avseende samtliga prover med förhöjd cystatin C-koncentration och cystatin C-kreatininkvot i IVA-gruppen (inte bara initialurinproverna) presenteras i figur 1. Totalt 15 av 26 urinprov i IVA-gruppen uppmätte en cystatin C-koncentration under analysmetodens lägsta mätvärde (0,02 mg/L).





Figur 1. Resultaten avseende cystatin C-koncentrationer (mg/L) och urin-cystatin C-kreatinin-kvoter från IVA-gruppen. Varje prov beskrivs i x-axeln: 1a = urinprov ett från IVA 1; 1b = urinprov två från IVA 1 etc. Gränsvärden i diagrammet är >0,12 mg/L för cystatin C-koncentrationer och >35 $\times 10^{-6}$  för urin-cystatin C-kreatininkvoter. Av totalt 26 prover var 15 under analysmetodens mätvärde för cystatin C (0,02 mg/L).

#### 4.2.2. Jämförelser mellan det första, andra och tredje urinprovet

Från sju av hundarna i IVA-gruppen erhöles minst två urinprover som analyserades för cystatin C. I tabell 4 presenteras cystatin C-värden för alla hundar som bidrog med minst två urinprov.

Tabell 4. Urin-cystatin C-koncentrationen (u-cys C) och urin-cystatin C-kreatininkvoten (u-cysC/krea) från urinprov 1,2 och 3 för de sju hundar som bidrog med fler än ett urinprov till studien.

Urinprov (nr)	u-cys C (mg/L)			u-cys C/krea ( $\times 10^{-6}$ )		
	1	2	3	1	2	3
IVA 1	7,97	5,93		29 473	28 882	
IVA 2	6,91	0,78		30 623	5 014	
IVA 3	0,12	<0,02	<0,02	126	0	0
IVA 4	<0,02	<0,02		0	0	
IVA 6	<0,02	<0,02		0	0	
IVA 8	<0,02	1,20	>1,10	0	3 938	>3 757
IVA 16	0,03	<0,02	<0,02	10	0	0

### 4.2.3. Gruppjämförelser (initialurinprov)

Ingen statistiskt signifikant skillnad förelåg mellan kontroll- och hela IVA-gruppen avseende cystatin C-koncentrationen i urin. Detta gällde även då grupp C (hundar med varken kliniskt uppenbar njurskada eller nedsatt cirkulation) exkluderades ur IVA-gruppen. Ingen statistiskt signifikant skillnad förelåg heller mellan kontroll- och hela IVA-gruppen avseende urin-cystatin C-kreatininkvoten, inte heller då grupp C exkluderades ur IVA-gruppen.

### 4.3. Specifik vikt och urinstickor

I tabell 5 redovisas resultaten för de initiala urinprov som togs från respektive hund avseende den specifika vikten och resultatet på urinstickorna. Totalt 32 initialurinprov analyserades avseende den specifika vikten och 31 initialurinprov analyserades med urinsticka. Ett av urinproverna innehöll en sådan liten mängd att analys med urinsticka prioriterades bort till förmån för analys av sediment.

*Tabell 5. Resultat avseende mätningar med refraktometer och urinsticka utifrån gruppindelning för IVA- och kontrollhundar. Resultaten redovisas som median (kvartilavstånd). Resultat på urinstickor tolkas enligt följande: neg = 0, spår = 0,5, 1+ = 1, 2+ = 2 etc. Grupp A utgörs av kliniskt uppenbart njursjuka hundar, grupp B av hundar utan kliniskt uppenbar njurskada men med nedsatt cirkulation, och grupp C av hundar med varken kliniskt uppenbar njurskada eller nedsatt cirkulation.*

Refraktometer	IVA (n=17)				Kontroll (n=15)
	Samtliga (n=17)	Grupp A (n=3)	Grupp B (n=11)	Grupp C (n=3)	
Specifik vikt	1,016 (1,011–1,025)	1,009 (1,009–1,014)	1,016 (1,014–1,029)	1,019 (1,015–1,028)	1,041 (1,036–1,050)
Urinstickor	IVA (n=17)				Kontroll (n=15)
	Samtliga (n=16)	Grupp A (n=3)	Grupp B (n=10)	Grupp C (n=3)	
Protein	1,0 (0,4–2,0)	1,0 (1,0–1,5)	1,5 (0,6–2,0)	0,0 (0,0–0,5)	1,0 (0,3–2,0)
Blod	1,0 (0,5–2,0)	2,0 (1,5–2,0)	1,0 (0,5–1,8)	0,5 (0,3–0,5)	0 (0)
Glukos	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ketoner	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
pH	7,5 (6,9–8,1)	7,0 (6,8–7,3)	7,8 (7,0–8,5)	7,5 (7,0–7,5)	7,0 (6,5–8,0)

## 4.4. SediVue Dx

### 4.4.1. Gruppjämförelser (initialurinprov)

Totalt 32 initialurinprover analyserades i SediVue Dx. I tabell 6 presenteras resultaten för erythrocyter och leukocyter innan manuell bedömning. Cylinderförekomsten vid manuell bedömning av bilderna från SediVue Dx presenteras i figur 2. Vid den manuella bedömningen av bilderna från SediVue Dx detekterades inga cylindrar i initialurinproverna från grupp A (kliniskt njursjuka hundar) eller grupp B (hundar med nedsatt cirkulation). Ett fåtal hyalina cylindrar detekterades i ett initialurinprov från grupp C (hundar utan både njursjukdom och nedsatt cirkulation). Enligt SediVue Dx var två initialprover från IVA-gruppen misstänkt positiva för icke-hyalina cylindrar. Ingen av dessa prover hade förekomst av cylindrar vid manuell bedömning. I kontrollgruppen detekterades hyalina cylindrar i två av proverna. Ett av dessa prover hade misstänkt förekomst av både hyalina och icke-hyalina cylindrar enligt SediVue Dx. Skillnaden mellan resultaten från SediVue Dx och den manuella bedömningen presenteras i tabell 7.



Figur 2. Cylinderförekomst (hyalina cylindrar) hos IVA-gruppen (n=17) och kontrollgruppen (n=15) enligt manuell bedömning av bilderna från SediVue Dx.

Tabell 6. Resultaten redovisas som median (kvartilavstånd) avseende kvantifiering av leukocyter och erythrocyter enligt SediVue Dx, innan manuell bedömning av bilderna. Resultat på >50 celler per HPF har räknats som 50 celler per HPF och resultat på <1 cell per HPF har räknats som negativa. Resultat på spädningar som har överstigit 50 celler per HPF har också räknats som 50 celler per HPF. Grupp A utgörs av kliniskt uppenbart njursjuka hundar, grupp B av hundar utan kliniskt uppenbar njurskada men med nedsatt cirkulation, och grupp C av hundar med varken kliniskt uppenbar njurskada eller nedsatt cirkulation.

SediVue Dx (antal/HPF)	IVA (n=17)				Kontroll (n= 15)
	Samtliga (n=17)	Grupp A (n=3)	Grupp B (n=11)	Grupp C (n=3)	
Leukocyter	2,0 (1,0–5,0)	5,0 (3,5–27,5)	2,0 (1,5–5,0)	1,0 (0,5–1,5)	1,0 (0,0–5,0)
Erythrocyter	3,0 (1,0–8,0)	50,0 (28,5–50,0)	2,0 (1,5–7,0)	1,0 (1,0–4,0)	1,0 (0,0–2,0)

#### 4.4.2. Manuell bedömning av bilder från SediVue Dx

I tabell 7 beskrivs de fall där den manuella bedömningen av bilderna från SediVue Dx inte stämde överens med SediVue Dx bedömning. I tio av proverna från IVA-gruppen och sex av proverna från kontrollgruppen avvek SediVue Dx:s bedömning från den manuella bedömningen.

Tabell 7. Sammanställning av de tveksamheter som upptäcktes vid manuell bedömning av bilderna från SediVue Dx.

<b>Antal prover</b>	<b>Parameter som skiljde sig åt</b>	<b>Kommentar</b>	<b>Konsekvens</b>
11	Leukocyter, Erythrocyter	Felaktigt markerade erythrocyter som leukocyter	Falskt höga leukocyter, falskt låga erythrocyter
5	Stavformade bakterier	Inga stavar kan ses, dock spermier – förväxling?	Felaktig rapport om misstanke på stavformade bakterier
4	Cylindrar	Missad förekomst av hyalina cylindrar och misstolkade slem/cellansamlingar som icke hyalina cylindrar	Falskt negativa prover samt felaktig misstanke om icke hyalina cylindrar

## 5. Diskussion

Denna studien syftade till att jämföra urinkoncentrationerna av cystatin C och förekomsten av cylindrar i urinsediment hos hundar som vårdades på IVA med friska kontrollhundar. Medianvärdet (och kvartilavståndet) för cystatin C i en undergrupp av IVA-hundarna, grupp A (kliniskt uppenbart njursjuka hundar) var 6,91 (3,51–7,44) mg/L, jämfört med 0,00 (0–0,08) mg/L i kontrollgruppen. Trots de höga cystatin C-värdena i grupp A innehöll gruppen för få individer (tre stycken) för att det ska vara möjligt att dra några statistiska slutsatser utifrån detta. Tidigare studier har dock påvisat förhöjda koncentrationer av cystatin C i urin hos hund och människa med histopatologiska tecken på tubuliskada (Conti *et al.* 2009; Sasaki *et al.* 2014). Resultaten skulle kunna innebära att Cystatin C i urin har potential att skilja individer med tubuliskada från individer utan tubuliskada.

Mellan hela IVA-gruppen och kontrollgruppen förelåg ingen statistiskt signifikant skillnad avseende cystatin C, inte heller då resultaten från grupp C (hundar utan varken kliniskt uppenbar njurskada eller nedsatt cirkulation) exkluderades ur IVA-gruppen. En trolig anledning är att det inte förekom tubuliskador på många av hundarna i denna studie och därför inte heller förhöjda cystatin C-koncentrationer. Ett annorlunda resultat hade sannolikt erhållits i ett urval där fler hundar haft konstaterad njurskada och där hundar helt utan nedsatt cirkulation exkluderats. Dock tyder inte resultaten i denna studie på att hundar på IVA eller hundar med nedsatt cirkulation, generellt har en förhöjd urinkoncentration av cystatin C. På grund Covid-19-relaterade restriktioner (som begränsade masterstudentens närvaro på IVA) och studiens tidsmässiga begränsning bedömdes det inte vara meningsfullt att förlänga provinsamlings-perioden för att på så vis öka chansen till inkludering av fler misstänkt njursjuka eller cirkulatoriskt nedsatta hundar.

Hos tre icke azotemiska hundar i denna studie förekom förhöjda cystatin C-koncentrationer i urinen. Huruvida det tyder på subklinisk tubuliskada går inte att avgöra utan histopatologisk undersökning av njurarna. Sasaki *et al.* (2014) inducerade AKI genom att injicera fyra hundar med toxiska doser av gentamicin under sju dagar. Provtagning skedde dag fyra och åtta. Dag fyra hade urin-cystatin C-kreatininkvoten stigit på hundarna, men om provtagningen hade skett dagligen (och inkluderat fler hundar) hade studien varit ännu mer informativ. Av etiska skäl är dock inkludering av fler hundar i en sådan studie tveksam. I studien av Monti *et al.* (2012)

förelåg skillnad mellan njursjuka hundar och hundar sjuka av annan anledning avseende cystatin C-koncentrationen i urin. Majoriteten av hundarna i den njursjuka gruppen var dock diagnosticerade med CKD sedan innan, vilket innebär att det inte går att dra några slutsatser om huruvida cystatin C i urin är en lovande metod för detektering av njurskador i tidigt skede. I en annan studie på hundar med leishmanios (glomerulonefrit) steg nivåerna av cystatin C i urin inte med statistisk signifikans förrän serum-kreatininkoncentrationerna var  $>124 \mu\text{mol/L}$  och UPCr  $>0,5$  (García-Martínez *et al.* 2015). Att jämföra cystatin C i urin med serum-kreatinin kan vara missvisande då de är markörer för två olika patologiska tillstånd i njurarna. Serum-kreatinin uppskattar GFR (Palm, 2017) medan cystatin C i urin påverkas av huruvida cellerna i proximala tubuli kan resorbera och eliminera molekylen (Grubb, 2001). Eftersom egenskaperna hos cystatin C inte har studerats på hund baseras detta antagande på att cystatin C hos hund beter sig likadant som hos människa. Att mäta cystatin C i urin säger alltså sannolikt inget om GFR, utan (förutsatt att det går att extrapolera de studier som finns till hund) om det föreligger skada i proximala tubuli eller inte. Utifrån resultaten i studien av García-Martínez *et al.* (2015) är cystatin C i urin inte lämplig som markör för glomeruliskada, men resultaten ger ingen information om huruvida cystatin C i urin är en olämplig markör för tubuliskada. För hundarna i denna studien med normal serum-kreatininkoncentration och förhöjd cystatin C-nivå i urinen (tabell 3) kan följande antagande göras: GFR är opåverkad (eller tillräckligt opåverkad för att förändringen ska detekteras med serum-kreatinin) samtidigt som hundarna har skada på tubuli. En intressant individ i denna studie är IVA 10 i grupp B (tabell 3). Cystatin C-koncentration hos den här hunden uppmätte ett värde på  $>25$  gånger referensvärdet, utan att hundens övriga provsvar antydde njurskada: serumkreatinin inom referensintervall och UPCr 0,5 (vilket förvisso är precis på gränsen). Hunden diagnosticerades med pyometra och akut hepatit och urinprovet erhöles dagen efter ovariehysterektomi-operation. Enligt journalanteckningar förlöpte narkosen utan cirkulatoriska eller respiratoriska komplikationer. Olyckligtvis saknas uppföljande urinprov från den här hunden, då det hade varit av intresse att följa förloppet. Viktigt att notera är också att serum-kreatininkoncentrationen erhöles en dag innan urinprovtagningen.

Denna studie syftade till att undersöka hundar med förmodat nedsatt cirkulation, eftersom dessa hundar antogs ha en ökad risk att drabbad av nedsatt perfusion i njurarna och därmed ischemiska tubuliskador (Zachary & McGavin 2012). Studiens utfall avseende studiepopulationen skiljer sig från målbeskrivningen på så vis att flera av hundarna inte drabbats av tillstånd som lett till en nedsatt cirkulation (grupp C) samt att alla utom en hund redan vid första provtagningstillfället inlett intravenös vätskebehandling. Samband mellan isostenuri och förhöjda nivåer av cystatin C i urin kan inte heller utforskas eftersom vätskebehandling i högsta grad påverkar urinens specifika vikt.

En svaghet hos exempelvis serum-kreatinin är att värden hos friska och sjuka hundar kan överlappa varandra. Det innebär att det kan uppstå svårigheter vid tolkning och bedömning av värdet. För att avgöra huruvida samma problematik föreligger hos cystatin C i urin behöver normalvärde hos friska hundar först fastställas. Enligt Damm (2020) är koncentrationen av cystatin C i urin för friska hundar (median och min-max) 0,02 (0,00–0,12) mg/L och enligt Monti *et al.* (2012) är koncentrationen av cystatin C i urin hos friska hundar (median och min-max) 0,02 (0,02–0,26) mg/L. Hos samtliga hundar i kontrollgruppen i denna studie uppmättes cystatin C-koncentrationerna till <0,12 mg/L. Urinproverna i IVA-gruppen med förhöjda cystatin C-koncentrationer (fyra av 15 hundar) var 10–65 gånger högre än 0,12 mg/L. Om detta resultat är representativt för en större grupp kan det tala för att överlappning mellan friska och njurskadade hundar inte föreligger för cystatin C i urin. Även i studien av Monti *et al.* (2012) förelåg tydlig skillnad mellan gruppen med friska hundar (se ovan) och gruppen med njursjuka hundar (median: 5,28 mg/L). För att utvärdera detta ytterligare krävs dock histopatologiska undersökningar som konfirmerar tubuliskada. En av hundarna i grupp A hade IRIS AKI grad II under sin sjukhusvistelse (IVA 3). Initialurinprovet från den hunden uppmätte en cystatin C-koncentration på 0,12 mg/L, det vill säga precis på gränsen. Cystatin C-kreatininkvoten i samma prov var förhöjd. I det andra och tredje urinprovet från den hunden var cystatin C-värdet under analysmetodens lägsta mätvärde. En möjlig förklaring är att det uppstod tillfällig ischemi i njurarna i samband med hypovolemisk chock, men att njurarna vid chockbehandling återhämtade sig fort tack vare att inga allvarliga skador hunnit uppstå.

Det råder oklarheter kring på vilket sätt cystatin C-värdet bör presenteras för en så korrekt tolkning som möjligt i en klinisk situation, speciellt vid AKI. Flera författare har utelämnat värden för cystatin C-koncentrationer och endast presenterat dem efter normalisering med kreatinin, bland annat Garzia-Martinez *et al.* (2015) och Sasaki *et al.* (2014). Conti *et al.* (2009) menar att risken med att använda urincystatin C-kreatininkvoten är att erhålla både falskt positiva och falskt negativa svar, eftersom kreatininkoncentrationerna i urin beror på flera faktorer. Risken med att endast titta på cystatin C-koncentrationen är att den inte tar hänsyn till urinens koncentration. För att ta hänsyn till urinkoncentrationen kan kvoten istället räknad ut med den specifika vikten, eller urinens osmolalitet. Huruvida det ger mer pålitliga resultat är ej utrett.

Att jämföra olika studiers resultat för urin-cystatin C-kreatininkvoter är mer komplicerat än att jämföra enbart cystatin C-värden, eftersom uträkningarna utförts på olika sätt. Damm (2020) presenterar sina värden dimensionslösa då respektive värde omvandlats till samma enhet innan uträkning. Studien resulterade i ett riktvärde (det högsta värdet i studiepopulationen exkluderades) på  $<35 \times 10^{-6}$  för friska hundar. I studien av Monti *et al.* (2012) var medianvärdet för de friska hundarna  $0,01 \pm 0,08$  mg/L. Det framgår inte hur uträkningarna gått till. Conti *et al.* (2009)

presenterar sina värden i enheten mg/mmol och anser att tröskelvärdet för tubuliskada är  $>0,056$  mg/mmol. Sasaki *et al.* (2014) kom fram till medianvärdet  $0,11 \pm 0,02$  mg/g för friska hundar och Garcia-Martinez *et al.* (2015) presenterar sina kvoter i enheten  $\mu\text{g/g}$ .

I denna studie omvandlades samtliga värden till samma enhet innan uträkning, varför resultaten från Damm (2020) har använts vid jämförelse. I hela IVA-gruppen i denna studie förekommer fler urinprov med förhöjda urin-cystatin C-kreatinin-kvoter jämfört med antalet urinprov med förhöjda cystatin C-koncentrationer. Om det beror på att normalisering med kreatinin leder till falskt positiva resultat, eller om cystatin C-koncentrationer gett falskt negativa resultat går inte att avgöra utan histopatologisk undersökning av njurarna.

I denna studie undersöktes även förekomsten av cylindrar i urinsediment. Två av 15 urinprov från kontrollgruppen konstaterades ha förekomst av hyalina cylindrar vid manuell bedömning av bilderna från SediVue Dx. Ett av dessa prover hade SediVue Dx märkt som ”misstänkt förekomst” av både hyalina och icke-hyalina cylindrar. I IVA-gruppen detekterades hyalina cylindrar endast i ett av de 17 initial-urinproverna. Detta urinprov var enligt SediVue Dx negativt, medan två andra prover från IVA-gruppen beskrevs ha misstänkt förekomst av cylindrar. Analys med SediVue Dx avseende förekomst av cylindrar utan manuell bedömning av bilderna riskerar att ge både falskt positiva och falskt negativa resultat.

En brist i denna studien avseende detektering av cylindrar i urinsediment är åldern på urinproven. Sex av proverna från IVA-gruppen var över två timmar gamla, vilket innebär att eventuella cylindrar kan ha sönderfallit innan analys.

Ingen skillnad förelåg mellan grupperna avseende förekomst av cylindrar. Det kan bero på att få av hundarna hade allvarliga tubuliskador. I en studie av Eubig *et al.* (2005) förekom granulära cylindrar i urinen hos tre, och hyalina cylindrar i urinen hos två, av 25 hundar med AKI till följd av indigestion av vindruvor. En humanstudie detekterade granulära cylindrar hos 55% av patienterna med AKI (Perazella *et al.* 2008). Kontrollgrupp saknades i både studien av Perazella *et al.* (2008) och Eubig *et al.* (2005). I studien av Sasaki *et al.* (2014) förekom hyalina eller cellulära cylindrar (ej specificerat tydligare än så) hos samtliga hundar med gentamicininducerad AKI, medan ingen cylinderförekomst detekterades i kontrollgruppen. I respektive grupp inkluderades endast fyra hundar, vilket inte är ett tillräckligt stort urval för att dra några slutsatser om populationen i stort. I en studie med 89 hundar med AKI detekterades fler än fem granulära eller hyalina cylindrar per LPF hos sex av hundarna (Vaden *et al.* 1997). Resultaten avseende cylindrar för kontrollgruppen presenterades inte. Cylindrar kan förekomma vid AKI, men det verkar vara ett inkonsekvent fynd och därmed ett hjälpmedel med låg sensitivt vid diagnostisering av tidiga njurskador.

I denna studie fanns inte serum-kreatininkoncentrationen att tillgå från samma dag som urinprovtagningen för alla hundar. Den normala serum-kreatinin-koncentra-



tionen (utan prerenal eller renal påverkan) var inte känt hos någon av hundarna. Det gör det omöjligt att till fullo avgöra om hunden var i IRIS AKI grad I, eftersom kreatininnivåerna i grad I ska stiga  $\geq 26,4$   $\mu\text{mol/L}$  inom referensvärdet ( $< 140$   $\mu\text{mol/L}$ ) inom 48 timmar. Oavsett är IRIS AKI-gradering inte optimal att använda som jämförelse i denna studie, eftersom den inte tar hänsyn till tubuliskador. Detta är även något som veterinärer bör ta hänsyn till vid användning av graderingen i en klinisk situation.

Eftersom studien hade begränsad ekonomi utfördes analys av urinsediment med hjälp av SediVue Dx istället för genom mikroskopering av van laboratoriepersonal. Enligt en studie av IDEXX, som är tillverkaren till SediVue Dx, stämde maskinens bedömning av bilderna med manuell bedömning av erfaren kliniker i 68,5–98,0% av fallen, beroende på vilken parameter som avhandlades (Hammond *et al.* 2016). Hammond *et al.* (2016) utvärderade endast huruvida ”positiva” jämfört med ”negativa” resultat avseende respektive analysparameter överensstämde med den manuella bedömningen av bilderna. Bäst överensstämmelse förelåg hos prover som saknade förekomst av skivepitelceller och sämst vid prover som hade förekomst av icke hyalina cylindrar. Ett examensarbete jämförde resultaten från SediVue Dx med mikroskopering av urinsediment (Utterström 2020). Resultaten för erythrocyter och leukocyter stämde överens väl jämfört med resultaten för bakterier, cylindrar, skivepitelceller och kristaller som var mer opålitliga enligt Utterström (2020). IDEXX rekommenderar att det utförs en manuell bedömning av bilderna efter varje analys för att upptäcka eventuella felaktigheter (IDEXX Laboratories 2020). Manuell bedömning utfördes i denna studie av masterstudenten, vilken är en person med begränsad erfarenhet av sedimenttolkning. För att förbättra bedömningarnas trovärdighet utfördes de med stöd av sakkunnig person. Flera avvikelser i SediVue Dx bedömningar hittades, vilket stämmer överens med resultatet i examensarbetet av Utterström (2020) och ytterligare stödjer IDEXX Laboratories (2020) uttalande om rekommendationen att granska bilderna manuellt. Ett fynd i denna studie som inte gjorts av Utterström (2020) eller Hammond *et al.* (2016) är den misstänkta feltolkningen av spermier som stavformade bakterier.

## 6. Konklusion

I denna studie sågs ingen skillnad mellan de friska hundarna och hundarna inlagda på IVA avseende nivåerna av cystatin C i urin och förekomsten av cylindrar i urinsediment. Samtliga njursjuka hundar, samt fyra cirkulatoriskt nedsatta hundar (utan konstaterad njurpåverkan) uppmätte dock förhöjda urinkoncentrationer av cystatin C, då ett referensvärde på 0,12 mg/L tillämpades. Samtliga hundar i kontrollgruppen uppmätte en urinkoncentration av cystatin C på  $\leq 0,12$  mg/L, vilket stämmer överens med tidigare examensarbete av Damm (2020). Detta, tillsammans med resultatet av litteraturgenomgången, tyder på att cystatin C i urin kan ha potential som markör för tubuliskada på hund, men att mer forskning krävs för att kunna dra några slutsatser om det kliniska värdet av analysen. Dessutom finns behov av att utvärdera huruvida cystatin C-koncentrationen ska presenteras som kvot ihop med kreatinin, eller om andra metoder fungerar bättre i avseende att ta hänsyn till urinkoncentrationen vid AKI, exempelvis normalisering med urinens osmolalitet eller specifika vikt.

## Referenser

- Conti, M., Moutereau, S., Esmilaire, L., Desbene, C., Lallali, K., Devanlay, M., Durbach, A., Manivet, P., Eschwège, P. & Loric, S. (2009). Should kidney tubular markers be adjusted for urine creatinine? The example of urinary cystatin C. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 47 (12), ss. 1553–1556.
- Cowgill, L. (2016). *Grading of acute kidney injury*. IRIS International Renal Interest Society. Tillgänglig: [http://www.iris-kidney.com/pdf/4\\_idc-revised-grading-of-acute-kidney-injury.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/4_idc-revised-grading-of-acute-kidney-injury.pdf) [2020-09-04]
- Eubig, P.A., Brady, M.S., Gwaltney-Brant, S.M., Khan, S.A., Mazzaferro, E.M. & Morrow, C.M.K. (2005). Acute renal failure in dogs after the ingestion of grapes or raisins: a retrospective evaluation of 43 dogs (1992-2002). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 19 (5), ss. 663–674.
- Filler, G., Bökenkamp, A., Hofmann, W., Le Bricon, T., Martínez-Brú, C. & Grubb, A. (2005). Cystatin C as a marker of GFR - history, indications, and future research. *Clinical Biochemistry*, vol. 38 (1), ss. 1–8 United States: Elsevier Inc.
- Fricke, M., Wiesli, P., Brändle, M., Schwegler, B. & Schmid, C. (2003). Impact of thyroid dysfunction on serum cystatin C. *Kidney International*, vol. 63 (5), ss. 1944–1947.
- García-Martínez, J.D., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Caldin, M. & Ceron, J.J. (2015). Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. *Research in Veterinary Science*, vol. 99, ss. 204–207.
- Graham, P.A. (2017). Urinalysis. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. & Côté, E. *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and the Cat*. St. Louis, Missouri: Elsevier, Inc., 8. uppl., ss. 283–288.
- Grubb, A.O. (2001). Cystatin C-properties and use as diagnostic marker. *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, ss. 63–99.
- Hammond, J., Bilbrough, G., McCrann, D.J., Myrick, C.L. & DeNicola, D.B. (2016). *Evaluation of the IDEXX SediVue Dx<sup>TM</sup> Urine Sediment Analyzer*. IDEXX Laboratories.
- Harison, E., Langston, C., Palma, D. & K. Lamb (2012). Acute azotemia as a predictor of mortality in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 26 (5), ss. 1093–1098.

- Herget-Rosenthal, S., Marggraf, G., Hüsing, J., Göring, F., Pietruck, F., Janssen, O., Philipp, T. & Kribben, A. (2004). Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney International*, vol. 66 (3), ss. 1115–1122.
- Holan, K.M., Kruger, J.M., Gibbons, S.N. & Swenson, C.L. (1997). Clinical evaluation of a leukocyte esterase test-strip for detection of feline pyuria. *Veterinary Clinical Pathology*. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.1997.tb00723.x>
- IDEXX Laboratories (2020). *SediVue Dx\* urine sediment analyser Operator's guide*. IDEXX Laboratories.
- Jayagopal, V., Keevil, B.G., Atkin, S.L., Jennings, P.E. & Kilpatrick, E.S. (2003). Paradoxical changes in cystatin C and serum creatinine in patients with hypo- and hyperthyroidism. *Clinical Chemistry*, vol. 49 (4), ss. 680–681.
- Kaseda, R., Iino, N., Hosojima, M., Takeda, T., Hosaka, K., Kobayashi, A., Yamamoto, K., Suzuki, A., Kasai, A., Suzuki, Y., Gejyo, F. & Saito, A. (2007). Megalin-mediated endocytosis of cystatin C in proximal tubule cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 357 (4), ss. 1130–1134.
- König, H.E. & Liebich, H.-G. (2014). *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals – Textbook and Colour Atlas*. 6. uppl. Stuttgart: Schattauer.
- Langston, C.E. (2017). Acute kidney injury. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. & Côté, E. *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and the Cat*. St. Louis, Missouri: Elsevier, Inc., 8. uppl., ss. 1919–1934.
- Lee, G., Jeon, S., Lee, S.-K., Cheon, B., Moon, S., Park, J.-G., Cho, K.-O. & Choi, J. (2017). Quantitative evaluation of renal parenchymal perfusion using contrast-enhanced ultrasonography in renal ischemia-reperfusion injury in dogs. *Journal of Veterinary Science*, vol. 18 (4), ss. 507–514.
- Legatti, S.A.M., El Dib, R., Legatti, E., Botan, A.G., Camargo, S.E.A., Agarwal, A., Barretti, P. & Paes, A.C. (2018). Acute kidney injury in cats and dogs: A proportional meta-analysis of case series studies. *PloS One*, vol. 13 (1), s. e0190772.
- Makris, K. & Spanou, L. (2016). Acute kidney injury: Definition, pathophysiology and clinical phenotypes. *The Clinical Biochemist Reviews*, vol. 37 (2), ss. 85–98.
- Mannucci, T., Lippi, I., Rota, A. & Citi, S. (2019). Contrast enhancement ultrasound of renal perfusion in dogs with acute kidney injury. *The Journal of Small Animal Practice*, vol. 60 (8), ss. 471–476.
- Monti, P., Benchekroun, G., Berlato, D. & Archer, J. (2012). Initial evaluation of canine urinary cystatin C as a marker of renal tubular function. *Journal of Small Animal Practice*, vol. 53 (5), ss. 254–259.
- Muñoz, J., Soblechero, P., Duque, F.J., Macías-García, B., Ruiz, P., Zaragoza, C. & Barrera, R. (2017). Effects of Oral Prednisone Administration on Serum Cystatin C in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 31 (6), ss. 1765–1770.

- Pagitz, M., Frommlet, F. & Schwendenwein, I. (2007). Evaluation of biological variance of cystatin C in comparison with other endogenous markers of glomerular filtration rate in healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 21 (5), ss. 936–942.
- Palm, C.A. (2017). Blood urea nitrogen and creatinine. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. & Côté, E. *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and the Cat*. St. Louis, Missouri: Elsevier, Inc., 8. uppl., ss. 250–252.
- Pelander, L., Häggström, J., Larsson, A., Syme, H., Elliott, J., Heiene, R. & Ljungvall, I. (2019). Comparison of the diagnostic value of symmetric dimethylarginine, cystatin C, and creatinine for detection of decreased glomerular filtration rate in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 33 (2), ss. 630–639.
- Pelander, L., Ljungvall, I., Egenvall, A., Syme, H., Elliott, J. & Häggström, J. (2015). Incidence of and mortality from kidney disease in over 600,000 insured Swedish dogs. *The Veterinary Record*, vol. 176 (25), s. 656.
- Perazella, M.A., Coca, S.G., Kanbay, M., Brewster, U.C. & Parikh, C.R. (2008). Diagnostic value of urine microscopy for differential diagnosis of acute kidney injury in hospitalized patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3 (6), ss. 1615–1619.
- Rippe, C., Rippe, A., Larsson, A., Asgeirsson, D. & Rippe, B. (2006). Nature of glomerular capillary permeability changes following acute renal ischemia-reperfusion injury in rats. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, vol. 291 (6), ss. F1362–1368.
- Sasaki, A., Sasaki, Y., Iwama, R., Shimamura, S., Yabe, K., Takasuna, K., Ichijo, T., Furuhashi, K. & Satoh, H. (2014). Comparison of renal biomarkers with glomerular filtration rate in susceptibility to the detection of gentamicin-induced acute kidney injury in dogs. *Journal of Comparative Pathology*, vol. 151 (2–3), ss. 264–270.
- Segev, G. (2017). Familial and congenital renal diseases of cats and dogs. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. & Côté, E. *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and the Cat*. St. Louis, Missouri: Elsevier, Inc., 8. uppl., ss. 1981–1984.
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*. 2. uppl. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Syme, H.M. & Jepson, R. (2017). Clinical approach and laboratory evaluation of renal disease. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. & Côté, E. *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and the Cat*. St. Louis, Missouri: Elsevier, Inc., 8. uppl., ss. 1905–1918.
- Utterström, B. (2020). *Utvärdering av SediVue Dx med hund-och katturin*. (Examensarbete, Avancerad nivå, A2E). Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet. <https://stud.epsilon.slu.se/15376/>
- Vaden, S.L., Levine, J. & Breitschwerdt, E.B. (1997). A retrospective case-control of acute renal failure in 99 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 11 (2), ss. 58–64.

- Wiesli, P., Schwegler, B., Spinas, G.A. & Schmid, C. (2003). Serum cystatin C is sensitive to small changes in thyroid function. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, vol. 338 (1–2), ss. 87–90.
- Zachary, J.F. & McGavin, M.D. (2012). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5. uppl. St. Louis: Elsevier.
- Zatelli, A., Paltrinieri, S., Nizi, F., Roura, X. & Zini, E. (2010). Evaluation of a urine dipstick test for confirmation or exclusion of proteinuria in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 71 (2), ss. 235–240.

# Tack

Ett stort tack till mina handledare Lena Pelander och Inger Lilliehöök för ert ovärderliga engagemang! Ni besitter otroliga kunskaper som ni dessutom kan förmedla på ett pedagogiskt sätt!

Tack till personalen på IVA och vårdavdelningen på UDS vid SLU för er stora hjälpsamhet under provinsamlingsperioden.

Tack till fina vänner och familjemedlemmar som hjälpt till att korrekturläsa texten när jag själv läst den så många gånger att jag blivit blind för stavfel och tokiga formuleringar.

## Populärvetenskaplig sammanfattning

Denna studien handlar om diagnostik av akuta njurskador på hund. Friska njurar har många olika funktioner, bland annat att producera urin för reglering av vätskebalansen och utsöndra restprodukter och ämnen som kan bli farliga för kroppen i fel mängd. Njurarna deltar också i regleringen av blodtrycket, regleringen av produktionen av röda blodkroppar och aktiveringen av vitamin D, m.m. I njurarna sker först en filtration av blodet, då alla blodkroppar och andra stora molekyler som exempelvis stora proteiner lämnas kvar i blodbanan, medan vätska, små molekyler och joner passerar. Filtrationen sker i kärlnystan som kallas glomeruli. Den filtrerade vätskan transporteras vidare genom ett långt rörsystem där sammansättningen regleras. Rörsystemen kallas för tubuli. De ämnen kroppen behöver återtas i tubuli (exempelvis majoriteten av vätskan för att förhindra uttorkning), medan andra ämnen utsöndras och följer med urinen ut ur kroppen. Glomeruli och tubuli kallas tillsammans för nefron (=urinproducerande enheter). Varje njure består av cirka 400 000 nefron hos hund.

Akuta njurskador är relativt vanligt hos både hund och människa, även om det är svårt att säga exakt hur ofta det inträffar. De kan uppstå till följd av exempelvis förgiftning med kylarvätska, infektion med bakterier eller vid syrebrist i organet till följd av ett nedsatt blodflöde m.m. Skadorna kan uppstå i olika delar av njurarna. Om skadan orsakat en tillräckligt stor försämring i njurfunktionen kan den försämrade njurfunktionen upptäckas i ett blodprov, men detta ses inte alltid i ett tidigt skede.

Idag används ett ämne i blodet som heter kreatinin för att detektera en nedsatt njurfunktion. Kreatinin är en restprodukt från musklerna vilket gör att en hund med mycket muskler naturligt kommer ha högre koncentrationer av kreatinin än en hund med lite muskler. Detta innebär att det kan vara svårt att tolka värdets betydelse för njurfunktionen. När kreatinin överstiger referensintervallet har njurarna i genomsnitt hunnit förlora 75 % av sina urinproducerande enheter och därför finns ett behov av att kunna diagnosticera njurskador tidigare, gärna innan skadorna hunnit leda till en nedsatt funktion i organet.

Den här studien har framför allt syftat till att undersöka ett litet protein som heter cystatin C i urin hos sjuka hundar. Cystatin C finns bland annat i blodet och bryts ned i njurarna, vilket innebär att nivåerna av cystatin C i urin ska vara mycket låga



hos friska hundar. Nivåerna i urin ökar vid skador som påverkar den delen av njurarna där cystatin C bryts ned. Till skillnad från kreatinin säger cystatin C i urin inget om njurarnas filtrerande funktion – bara om det har uppstått en skada/dysfunktion i en specifik del av njuren. I studien undersöktes också förekomsten av så kallade cylindrar (ansamlingar av trasiga celler och/eller proteiner från njurarna) i urinsediment hos sjuka hundar. Vissa varianter av cylindrar kan förekomma hos friska hundar, medan vissa varianter tyder på definitiv njurskada. Syftet med studien var att undersöka om hundar som var inlagda på intensivvårdsavdelningen (IVA) på Universitetsdjursjukhuset i Uppsala hade förhöjda nivåer av cystatin C i urin och ökad förekomst av cylindrar i urinsediment. Studien syftade också till att undersöka nivåerna av cystatin C i urin hos friska hundar. Cystatin C kan normaliseras med exempelvis nivån av kreatinin i urinen. Det görs för att ta hänsyn till hur utspädd urinen är. I den här studien kvoterades (normaliserades) cystatin C-koncentrationen med kreatinin och resultaten jämförde sedan med resultaten för urinkoncentrationen av cystatin C.

Att hundar på IVA valdes ut som studiepopulationen beror på att de antogs utgöra en grupp som löper ökad risk för att drabbas av njurskador. Många djur på IVA har problem med sin blodcirkulation. Allvarliga skador och sjukdomar, exempelvis en stor blödning eller blodförgiftning, startar mekanismer i kroppen som omfördelar blodet mellan organen. Vid en blödning prioriteras de absolut viktigaste organen för kroppens överlevnad – hjärtat, lungorna och hjärnan – och dessa tilldelas då en större del av blodet, medan organ som njurarna, levern och tarmarna blir bortprioriterade. Om njurarna får för lite blod kan det uppstå syrebrist i njurarna som orsakar skador. Cellerna som bryter ned cystatin C har en hög energiåtgång och är därför känsliga för syrebrist. På grund av detta misstänktes hundar på IVA kunna ha stegrade nivåer av cystatin C i urinen.

Totalt 17 sjuka och 15 friska hundar inkluderades studien. Tre av de sjuka hundarna var diagnosticerade med njurskada, dessa placerades i grupp A. Elva av hundarna var inte diagnosticerade med njurskada men hade nedsatt blodcirkulation, dessa placerades i grupp B. Tre hundar visade inga tecken på varken njurskada eller nedsatt blodcirkulation, dessa placerades i grupp C. Från varje hund togs minst ett urinprov. Urinprovet analyserades sedan avseende förekomst av cystatin C, proteiner, glukos, ketoner, cylindrar, vita blodkroppar, röda blodkroppar, kristaller och epitelceller.

Två av tre hundar i grupp A uppmätte förhöjda nivåer av cystatin C i urinen. Två av elva hundar i grupp B uppmätte förhöjda nivåer av cystatin C i urinen. Värdena hos dessa hundar var 10–65 gånger högre än det högsta värdet hos de friska hundarna. Tre av de totalt fyra hundarna med förhöjda cystatin C nivåer hade normala nivåer av kreatinin i blodet. Det innebär att det skulle kunna förekomma skador på njurarna i den här hundgruppen som inte detekterades med hjälp av kreatininkoncentrationen i blodet. Utöver de fyra hundarna med förhöjda cystatin C nivåer var

det ytterligare tre hundar som fick förhöjda cystatin C-värden när resultaten kvoterades med urin-kreatinin. För att veta säkert om ett högt cystatin C-värde i urinen innebär njurskada behöver vävnadsprov från njurarna undersökas med mikroskop (för att konfirmera faktisk skada), vilket inte gjordes i den här studien. Samband mellan konstaterade (i mikroskop) njurskador och förhöjda nivåer av cystatin C i urin har dock fastställts i andra studier på människa och i enstaka studier på hund.

Det gick inte att fastslå en statistisk skillnad mellan cystatin C-nivåerna hos de sjuka hundarna och de friska hundarna i den här studien, vilket kan bero på att det var för få hundar med njurskador bland de sjuka hundarna. Ett prov från gruppen med sjuka hundar och två prov från gruppen med friska hundar hade förekomst av cylindrar i urinsediment. Hos samtliga dessa hundar förekom den typ av cylindrar som kan förekomma även hos friska hundar.

Syftet med denna studie var att undersöka ett urval markörer för njurskada i urin (cystatin C och cylindrar) hos hundar inlagda på intensivvårdsavdelning (IVA) och jämföra med kliniskt friska hundar. Sammanfattningsvis tyder resultaten i denna studien och litteraturgenomgången på att cystatin C i urin kan ha potential som markör för vissa typer av njurskador på hund, men fler studier krävs för att säkerställa kopplingen till konstaterade njurskador och huruvida normalisering med exempelvis kreatinin bör genomföras. Förekomsten av cylindrar är, enligt den här och tidigare studier, sporadisk vid njurskada och därför till begränsad hjälp vid diagnosticering av akuta njurskador.

# Bilaga 1

Provtagning urin

IVA / KONTROLL

ID SediVue:

Plats för etikett

	<b>Prov 1</b>	<b>Prov 2</b>	<b>Prov 3</b>
<b>Påbörjad</b>	JA <input type="checkbox"/>	JA <input type="checkbox"/>	JA <input type="checkbox"/>
<b>vätskebeh.</b>	NEJ <input type="checkbox"/>	NEJ <input type="checkbox"/>	NEJ <input type="checkbox"/>
<b>Sp.kastad</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Kateter</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Urinstix & Refraktometer**

	<b>Prov 1</b> den	kl	<b>Prov 2</b> den	kl	<b>Prov 3</b> den	kl
<i>Specifik vikt</i>						
<i>Leukocyter</i>						
<i>Nitrit</i>						
<i>Protein</i>						
<i>pH</i>						
<i>Blod</i>						
<i>Keton</i>						
<i>Glukos</i>						

**SediVue**

	<b>Prov 1</b>	<b>Prov 2</b>	<b>Prov 3</b>
<i>WBC</i>			
<i>RBC</i>			
<i>Bakterier</i>			
<i>Epitelceller</i>			
<i>Cylindrar</i>			
<i>Kristaller</i>			

**Övrigt**

---



---