

Aus der Medizinischen Kleintierklinik
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Katrin Hartmann

Angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Johannes Hirschberger

Sepsis beim Hund: Interleukin-6 als prognostischer Parameter

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Stefanie Maria Rau geb. Weber
aus Ehingen an der Donau

München 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. Hirschberger
Koreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Gerhards

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

Für meinen Mann

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	9
I Einleitung	11
II Literaturübersicht	13
II.1 Historischer Rückblick	13
II.1.1 Geschichte der Sepsis	13
II.1.2 Geschichte des Interleukin-6	13
II.2 Epidemiologie der Sepsis	15
II.2.1 Humanmedizinischer Bereich	15
II.2.2 Veterinärmedizinischer Bereich	16
II.3 Definitionen	16
II.3.1 Humanmedizinischer Bereich	16
II.3.2 Veterinärmedizinischer Bereich	18
II.4 Pathogenese	19
II.4.1 Beteiligte Erreger	19
II.4.2 Rezeptorbindung und Signaltransduktion	21
II.4.3 Die Zytokine	22
II.4.3.1 Allgemeines	22
II.4.3.2 Interleukin-6	23
II.4.3.3 Die Zytokinkaskade	24
II.4.3.4 Zeitlicher Ablauf der Ausschüttung	24
II.4.4 Wege in die Sepsis und das Multiorganversagen	25
II.4.4.1 Das „Two-Hit“-Modell	25
II.4.4.2 Die immunologische Imbalanz	26
II.5 Auswirkungen der Sepsis	28
II.5.1 Kardiovaskuläres System	28
II.5.2 Die Niere	29
II.5.3 Gastrointestinaltrakt	30
II.5.4 Die Leber	31
II.5.5 Sepsis und Koagulation	31
II.5.6 Kohlehydratmetabolismus	32
II.5.7 Laktatazidose	33
II.5.8 Die Lunge	34

III	Publikation	35
IV	Diskussion.....	68
IV.1	Aufbau der Studie	68
IV.2	Patientendaten	69
IV.2.1	Allgemeine Daten.....	69
IV.2.2	Prädisponierende Faktoren.....	70
IV.2.3	SIRS-Kriterien	71
IV.2.4	Klinische und pathologische Diagnosen	72
IV.2.5	Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen	73
IV.3	Nachweismethoden für Interleukin-6.....	74
IV.3.1	Bioassay versus Immunoassay.....	74
IV.3.2	Zelllinie	75
IV.4	Interleukin-6.....	75
IV.4.1	Wahl des Zytokins.....	75
IV.4.2	Interleukin-6 und die SIRS-Kriterien.....	76
IV.4.3	Interleukin-6 und Sepsis.....	76
IV.4.4	Interleukin-6 und der Schweregrad.....	77
IV.4.5	Interleukin-6 und die Mortalität	78
IV.4.6	Individuelle Maximalwerte	80
IV.5	Bewertung von Interleukin-6 als Biomarker der caninen Sepsis.....	81
V	Zusammenfassung.....	82
VI	Summary	84
VII	Literaturverzeichnis.....	86
VIII	Anhang	106
VIII.1	Einschlusskriterien	106
VIII.2	Anamneseblatt.....	107
VIII.3	Klinische und hämatologische Parameter	110
IX	Lebenslauf.....	112
X	Danksagung.....	114

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ACCP	American College of Chest Physicians
APACHE	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
ATS	American Thoracic Society
BSF-2	B-cell Stimulatory Factor 2
BVSc	Bachelor of Veterinary Science
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CBC	Complete Blood Count
CD	Cluster of Differentiation
CDF	Cytotoxic Differentiation Factor
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	Counts Per Minute
CRP	C-Reaktives Protein
DIC	Disseminated intravascular coagulation
Dipl.	Diplomate
ECVD	European College of Veterinary Dermatology
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
et al.	"et alteri" oder "et alii", deutsch "und andere"
Fig.	Figure
G/l	Giga pro Liter
h	Stunde(n)

HMGB-1	High Mobility Group Protein B1
hons	honours degree
HPGF	Human Hybridoma/Plasmacytoma Growth Factor
HSF	Hepatocyte-Stimulating Factor
i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenöse
IFN	Interferon
IL	Interleukin
inc.	Incorporated
iNOS	induzierbare Nitroxid-Synthetase
IRAK2	Interleukin-1 rezeptor-assozierte Kinase 2
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LBP	LPS-Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharide
MACVSc	Member of the Australian College of Veterinary Scientists
MARS	Mixed Antagonists Response Syndrome
Max	Maximum
mg	Milligramm
Min	Minimum
min	Minute
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MOF	Multiorgan Failure
MSOF	Multiple System Organ Failure
NFκB	nukleärer Faktor kappa B
ng	Nanogramm
NIK	NF-κB-induzierende Kinase
nm	Nanometer
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCT-GF	Plasmacytoma Growth Factor
pg	Pikogramm
PRR	Pattern Recognition Receptors
rhuIL-6	Rekombinantes Humanes Interleukin-6
RIA	Radioimmunoassay
rIL-6	Rekombinantes Interleukin-6
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SIS	Surgical Infection Society
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
sp.	Spezies
SPI	Survival Prediction Index
Tab.	Tabelle
TF	Tissue Factor
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
tPA	tissue-type plasminogenactivator
TRAF-6	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor-Assoziierter Faktor 6
US	United States
WBC	White Blood Count
XTT	Tetrazolium Salz
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der SIRS-Kriterien ausgewählter Autoren (basierend auf HAUPTMAN, 1997; leicht modifiziert und erweitert).....	18
Tabelle 2: Interpretation von Blutkulturergebnissen (DOW und JONES, 1989).....	19
Abbildung 1: Signaltransduktion im Makrophagen (MODLIN, 1999, modifiziert)	22
Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der Zytokinausschüttung nach Infusion eines Menschen mit LPS (nach GOLDHILL et al., 2002).....	25
Abbildung 3: „Two-Hit“-Modell (nach BRADY et al., 1999).....	26
Abbildung 4: Pathogenetische Hypothese für die verschiedenen Reaktionen des Immunsystems (BONE et al., 1996).....	27
Abbildung 5: Durchschnittliche Werte der SIRS-Kriterien bei Patienten mit SIRS oder Sepsis bzw. bei Überlebenden oder Nicht-Überlebenden.....	71
Abbildung 6: Klinische und pathologische Diagnosen der Patientenpopulation, zusammengefasst nach Organsystemen	72
Abbildung 7: Darstellung der unterschiedlichen Messwerte der Gruppen Sepsis und SIRS	77
Abbildung 8: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier, gewählter Grenzwert von 1000 pg/ml	79

Tabellen und Abbildungen der Publikation

Table 1: Distribution of owner-reported pre-existing diseases in 34 of the 79 dogs	55
Table 2: Distribution of mortality in subgroups.....	55
Table 3: The most frequent final clinical and pathological diagnoses.....	56
Table 4: Isolated organisms divided in origin and Gram staining	57
Table 5: IL-6 in pg/ml in the four categories SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock as measured on day 1, 2 and 3	58
Figure 1: Boxplots of measurement of IL-6 divided in subgroups SIRS and sepsis during day 0 to 2.....	62
Figure 2: Scatterplot: correlation between IL-6 and white blood cell count on day of admission	63
Figure 3: Logistic regression curve of probability for sepsis and ln-IL-6.....	64
Figure 4: Logistic regression curve of mortality rate and ln-IL-6	65
Figure 5: Survival function for a Cox proportional-hazards regression.	66
Table 6: Comparison of IL-6 measurement in dogs after experimentally induced sepsis	67

I Einleitung

Trotz aller medizinischen Fortschritte gehört die Sepsis immer noch zu einer der häufigsten Todesursachen in der Humanmedizin. Eine signifikante Reduktion der Mortalität konnte bisher nicht erreicht werden, und mit zunehmender Überalterung der Bevölkerung wird eher ein Ansteigen der Inzidenz erwartet (MARTIN et al., 2003). Auch in der Veterinärmedizin ist die Sepsis inzwischen ein bekanntes Erscheinungsbild. Durch Technisierung und vor allem durch monetäre Möglichkeiten intensiviert sich die spezifische Therapie und schwere Folgeerscheinung wie Multiorganversagen und das akute Atemnotsyndrom sind bei den Kleintieren keine Seltenheit mehr. Mortalitätsraten von 31 % bis 50 % unterstreichen die Schwere des Krankheitsbildes (HARDIE et al., 1986; DOW et al., 1989; KING et al., 1994a; KING et al., 2001; LANZ et al., 2001; DE LAFORCADE et al., 2003).

Mit besserer Kenntnis der Pathophysiologie und der zahlreichen involvierten Entzündungsfaktoren wie Zytokine hat man sich natürlich bemüht, spezifische anti-inflammatorische Therapiestrategien zu entwickeln. Diese sind bisher jedoch trotz viel versprechender Ergebnisse in Tierversuchen im therapeutischen Einsatz gescheitert (ASTIZ & RACKOW, 1998; TJARDES & NEUGEBAUER, 2002; RIEDEMANN et al., 2003a; WEIGAND et al., 2004). Eine artifizuell hervorgerufene Entzündung im Tierversuch lässt sich kaum mit der realen klinischen Situation vergleichen, und eine zielgerichtete Blockierung mancher Zytokine kann zum ungünstigen Zeitpunkt das Gegenteil erreichen (O'REILLY et al., 1999). Eine bisherige Behandlung erfolgt also im Rahmen unterstützender Maßnahmen gegenüber den Folgeerscheinungen der Sepsis und durch Bekämpfung der Bakterien mittels Antibiotika. Umso wichtiger ist eine frühe Diagnose der Risikopatienten, damit eine zielgerichtete Therapie begonnen werden kann.

Die Definition einer Sepsis basiert auch in der Veterinärmedizin auf den etablierten Kriterien für eine systemische Entzündung (SIRS-Kriterien), die im Rahmen einer Konferenz 1992 festgelegt wurden (BONE et al., 1992). Eine Sepsis wird, wie unten weiter erläutert, durch das Vorhandensein einer Infektion im Zusammenhang mit einer SIRS definiert. Mit dem heutigen Wissen der unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen wie beispielsweise auch des immunsuppressiven Stadiums (siehe Punkt II.4.4.2) müssen wir uns jedoch

fragen, wie genau diese Kriterien für das Erkennen einer Sepsis nun sind (TJARDES & NEUGEBAUER, 2002). Auch die Erkennung des Schweregrads und eventuell sogar Anzeichen für eine erhöhte Mortalität sind von Interesse.

In der Humanmedizin sind hierfür bereits zahlreiche Biomarker vorhanden, zu denen das C-reaktive Protein, inflammatorische Zytokine wie Interleukin(IL)-8 oder IL-6 und Procalcitonin gehören (MEISNER, 2005). Insbesondere IL-6 hat sich aufgrund seiner besonderen Eigenschaften als guter Parameter für die Diagnose einer Sepsis, den Schweregrad und die Mortalität in Forschung und Praxis bewährt (MEISNER, 2005; NOVOTNY et al., 2005).

Ziel dieser prospektiven Arbeit war eine Erforschung des Nutzens von IL-6 als Biomarker in der klinischen Sepsis beim Hund, da dies bisher in der Veterinärmedizin noch nicht erfolgt ist. Untersucht wurden 79 Hunde, die mit Verdacht auf Sepsis in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München und in der Klinik und Poliklinik für Kleine Haustiere der Freien Universität Berlin im Zeitraum von 2004 bis 2005 vorgestellt wurden. Der Plasmaspiegel von IL-6 wurde anhand der kolorimetrischen Auswertung eines Bioassays mit der murinen 7TD1-Zelllinie bestimmt. Anschließend erfolgte eine statistische Auswertung der Ergebnisse und der Vergleich mit bekannter Literatur.

II Literaturübersicht

II.1 Historischer Rückblick

II.1.1 Geschichte der Sepsis

Bei dem Begriff der Sepsis handelt es sich um einen alten medizinischen Terminus, der von Hippokrates (ca. 460 – 370 v. Chr.) eingeführt wurde und sich vom griechischen *Σήψις* (sepsios = „Fäulnis“) ableitet. Die Pathogenese blieb jedoch lange im Unklaren, bis Louis Pasteur (1822 – 1895) Bakterien als mögliche Krankheitserreger identifizierte und Robert Koch 1884 seine Kochschen Postulate formulierte. Bekannte Mediziner wie Ignaz Semmelweis (1818 – 1865) und Joseph Lister (1827 – 1912) entwickelten Strategien der Antisepsis (BLOOS, 2003). 1886 entdeckte Ludwig Brieger (1849 – 1919), dass Bakterien giftige Produkte produzierten und sezernierten und nannte diese „Toxine“. Wenig später identifizierte Richard Pfeiffer (1858 – 1945) Zellbestandteile von *V. cholerae* als toxisch und gab diesen den Namen „Endotoxin“ (BEUTLER et al., 2003). Hugo Schottmüller (1867 – 1936) legte 1914 den Grundstein der modernen Sepsisdefinition, in dem er die Bedeutung eines Infektionsherdes als fundamentalen Bestandteil der Sepsis formuliert (BUDELMANN, 1969). Die nun wichtigste Erkenntnis, dass die Entstehung der Sepsis nicht allein auf einen Infektionsherd beruhen konnte, sondern auch die Reaktion der körpereigenen Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen musste, wurde von Roger C. Bone (1941 – 1997) in der heute noch gültigen Sepsisdefinition dargelegt (BONE, 1991a).

II.1.2 Geschichte des Interleukin-6

In der Vergangenheit gab es vor allem drei Forschungsrichtungen, die letztlich zu einer Identifizierung und Charakterisierung von IL-6 und seinen Eigenschaften beigetragen haben.

WEISSENBACH und Mitarbeiter versuchten Interferon- β aus humanen Fibroblasten zu klonieren, und isolierten dabei zwei ihnen zuvor unbekannte cDNA-Klone. Deren korrespondierendes, 26 kDa großes Protein nannten sie aufgrund seiner IFN- β ähnlichen Eigenschaften IFN- β_2 (WEISSENBACH et al., 1980). CONTENT und Mitarbeiter folgten einem ähnlichen Ansatz und isolierten ein identisches, ebenfalls 26 kDa großes Protein, konnten jedoch die IFN- β

ähnlichen Eigenschaften nicht nachvollziehen (CONTENT et al., 1982). Einige Jahre später publizierten zwei Forschungsgruppen Sequenzen dieser Proteine und zeigten damit die fehlende strukturelle Homologie des 26 kDa Proteins sowie des IFN- β_2 zu Interferon- β (ZILBERSTEIN et al., HAEGEMANN et al., beide 1986). Etwa um die gleiche Zeit beobachteten TERANISHI und Mitarbeiter sowie HIRANO und Mitarbeiter, dass aktivierte T-Zellen einen spät wirkenden B-Zell-Differenzierungsfaktor produzieren, der bei aktivierten B-Zellen die Herstellung von Immunglobulinen induziert. Nach der Aufreinigung und Klonierung bekam dieser Faktor den Namen „B-cell stimulatory factor 2“ (BSF-2) (TERANISHI et al., 1982; HIRANO et al., 1984). Weder die biologische Aktivität noch der zelluläre Ursprung von BSF-2 ließ eine Verbindung zu IFN- β_2 oder dem 26kDa-Protein vermuten; nach Publikation der Sequenz erwies sich BSF-2 jedoch als identisch mit diesen Faktoren (BILLIAU, 1986).

Die dritte Forschungsrichtung beschäftigte sich mit der Untersuchung von Wachstumsfaktoren für Plasmazytome und B-Zell-Hybridome. VAN SNICK und Mitarbeiter purifizierten als erstes einen murinen Hybridom-Wachstumsfaktor, den sie vorläufig „Interleukin-HP1“ taufte (H für Hybridom, P für Plasmazytom) (VAN SNICK et al., 1986). Ein ähnliches Molekül konnte von NORDAN und Mitarbeiter aus einem Makrophagenüberstand isoliert werden und wurde von ihnen „plasmacytoma growth factor“ (PCT-GF) genannt (NORDAN et al., 1987). Die Erkenntnis, dass diese murinen Hybridomzelllinien auch zur Isolierung humaner Wachstumsfaktoren genutzt werden konnte, führte schließlich zu der Entdeckung eines „human hybridoma/plasmacytoma growth factor“ (HPGF) durch VAN DAMME und Mitarbeiter (VAN DAMME et al., 1987a, 1987b). Überraschenderweise zeigte die Aminosäuresequenz dieses Faktors wenig Homologie mit seinem zuvor entdeckten murinen Äquivalent, erwies sich dafür aber als identisch mit der des 26kDa Proteins, des IFN- β_2 , als auch des BSF-2 (VAN DAMME et al., 1987c; BRAKENHOFF et al., 1987). GAULDIE und Mitarbeiter stellten fest, dass anti-BSF-2/IFN- β_2 Antikörper die Aktivität eines sogenannten „hepatocyte-stimulating factor“ (HSF) neutralisierten (GAULDIE et al., 1987). Damit konnte eine Beteiligung dieser Moleküle an der Akuten-Phase-Reaktion vermutet werden.

Nachdem die Klonierung der cDNA des murinen Faktors gelang, stand auch hier eine Homologie mit dem humanen Hybridom-Wachstumsfaktor fest (VAN SNICK et al., 1988). Beiträge zu den vielfältigen Eigenschaften dieses Moleküls

lieferten IKEBUCHI und Mitarbeiter sowie WONG und Mitarbeiter, die eine Beteiligung an der Hämatopoese nachwiesen; des weiteren erwies es sich wichtig als Differenzierungsfaktor zytotoxischer T-Zellen und wurde dort „cytotoxic differentiation factor“ (CDF) bezeichnet (TAKAI et al., 1988).

Entsprechend der Erkenntnis, dass es sich bei dem 26kDa Protein, IFN- β_2 , BSF-2, HPGF, PCT-GF, HSF, und CDF um ein und dasselbe Molekül handelte, einigte man sich auf den gemeinsamen Namen Interleukin-6 (IL-6).

II.2 Epidemiologie der Sepsis

II.2.1 Humanmedizinischer Bereich

Studien zur Untersuchung der Inzidenz, Mortalität und Kosten einer Sepsis liegen vor allem aus den USA vor. Ebenso existieren Untersuchungen aus Australien und einigen anderen europäischen Staaten wie Frankreich und Österreich; eine deutschlandweite Studie wurde erst kürzlich vom Kompetenznetzwerk Sepsis (SepNet) durchgeführt (siehe unten). Hier sollen jedoch nur aktuelle Vergleichszahlen aus den USA und Deutschland erwähnt werden.

In den USA liegt die Sepsis laut einer aktuellen Studie von MARTIN und Mitarbeiter aus dem Jahr 2003 an zehnter Stelle der Haupttodesursachen mit 240 Patienten pro 100000 Einwohner und verursacht Kosten von über 17 Milliarden Dollar pro Jahr. ANGUS und Mitarbeiter beschreiben 2001 eine Fallzahl von 300 Patienten pro 100000 Einwohner sowie jährliche Kosten von 16,7 Milliarden Dollar. Hierbei wurde berechnet, dass die Inzidenz jährlich im Zusammenhang mit der Überalterung der Bevölkerung um etwa 1,5 % steigen wird.

Für Deutschland errechnet eine aktuelle prospektive multizentrische Prävalenzstudie unter der Leitung von BRUNKHORST eine jährliche Fallzahl von 226 Patienten pro 100000 Einwohner, wobei die Sepsis hiermit die dritthäufigste Todesursache nach der koronaren Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt darstellt. Der direkte Kostenfaktor liegt in dieser Studie bei 1,77 Milliarden Euro pro Jahr.

II.2.2 Veterinärmedizinischer Bereich

Leider sind entsprechende epidemiologische Untersuchungen im Bereich der Veterinärmedizin noch nicht durchgeführt worden, dementsprechend existiert auch keine klinikübergreifende Statistik. Klinikinterne Fallzahlen finden sich bei OTTO, die für das Veterinary Teaching Hospital der Universität von Pennsylvania 1998 eine jährliche Inzidenz von 3,5 Fällen pro 1000 Patienten der Klinik angeben, was im Gegensatz zu 1988 (1 Fall pro 1000 Patienten) eine deutliche Steigerung bedeutet (OTTO, 2002). Die Durchführung nationaler oder internationaler Studien zur Epidemiologie der Sepsis in der Tiermedizin wäre durchaus wünschenswert.

II.3 Definitionen

II.3.1 Humanmedizinischer Bereich

Nachdem der Intensivmediziner Roger C. Bone zu einer Einigung auf international gültige Definitionen zur Sepsis aufgerufen hatte (BONE, 1991b), wurde im Jahr 1991 zum ersten Mal eine „Consensus Conference“ des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) einberufen und allgemeine Definitionen zur Erleichterung der Diagnose, der Überwachung und der Behandlung einer Sepsis etabliert (BONE et al., 1992). Diese Kriterien wurden bereits vielfach in der Praxis eingesetzt und dienten als Einschlusskriterien diverser Studien. Aufgrund neuer Erkenntnisse in der Pathogenese dieser Erkrankung bestand jedoch bald der Bedarf nach einer Modifikation dieser Definitionen; so wurde 2001 die International Sepsis Definitions Conference in Zusammenarbeit mit dem American College of Chest Physicians (ACCP), der Society of Critical Care Medicine (SCCM), der European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), der American Thoracic Society (ATS) und der Surgical Infection Society (SIS) einberufen:

Die folgenden Definitionen sind gemäß der neuesten Internationalen Sepsisdefinitionen-Konferenz von 2001 formuliert (LEVY et al., 2003).

Bakteriämie: das Vorhandensein wachstumsfähiger Bakterien im Blut

Infektion: ein pathologischer Prozess, der durch die Invasion von pathogenen oder potentiell pathogenen Mikroorganismen in normalerweise steriles Gewebe, Körperflüssigkeiten oder Körperhöhlen verursacht wird.

SIRS: „Systemic Inflammatory Response Syndrome“, systemisch-entzündliche Reaktion auf verschiedene schwere infektiöse oder nicht-infektiöse Insulte, charakterisiert durch mehr als eines der folgenden Symptome:

- (1) Körpertemperatur von mehr als 38°C oder weniger als 36°C
- (2) Herzfrequenz von mehr als 90 Schlägen pro Minute
- (3) Tachypnoe, also eine Respirationsrate von mehr als 20 Zügen pro Minute oder eine Hyperventilation, wie durch einen PaCO₂ von weniger als 32 mmHg angezeigt
- (4) Eine Veränderung im weißen Blutbild, zum Beispiel eine Leukozytenanzahl von mehr als 12 000/mm³ oder weniger als 4 000/mm³, oder das Vorhandensein von mehr als 10 % Jugendformen (Stabkernige)

Sepsis: das klinische Erscheinungsbild, das durch das Vorhandensein einer Infektion und einer systemisch-entzündlichen Reaktion (SIRS) definiert ist. Hier wird im Rahmen der Konferenz eine längere Liste möglicher weiterer Anzeichen außerhalb des strengen Rahmens der SIRS-Definition erstellt; dazu zählen z.B. Parameter wie eine Hyperlaktatämie, verringerte kapilläre Füllungszeit, eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins im Plasma usw.

Schwere Sepsis: Sepsis, die mit einer Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension verbunden ist. Eine abnorme Hypoperfusion oder Hypotension kann mit einer Laktatazidose, Oligurie oder einer akuten Veränderung des Bewusstseins einhergehen, muss aber nicht darauf beschränkt bleiben.

Septischer Schock: Sepsisinduzierter Schock mit persistierender arterieller Hypotension, die durch keine anderen Ursachen erklärbar ist und trotz adäquater Volumensubstitution bestehen bleibt.

Sepsis-induzierte Hypotension: systolischer Blutdruck < 90 mmHg oder eine Reduktion des Basalwertes um ≥ 40 mmHg, durch keine andere Ursachen erklärbar.

MODS: „Multiple Organ Dysfunction Syndrome“, das Vorhandensein einer veränderten Organfunktion bei einem akut erkrankten Patienten. Eine Homöostase kann ohne Intervention nicht aufrechterhalten werden.

II.3.2 Veterinärmedizinischer Bereich

Angelehnt an die Definitionen der Sepsiskonferenz, entwickelten einige Autoren bald auch SIRS-Kriterien für die Veterinärmedizin. Diese stellten aufgrund individueller Temperatur- und Frequenzschwankungen ein breites Spektrum an Möglichkeiten dar (Tab. 1).

Tabelle 1: Vergleich der SIRS-Kriterien ausgewählter Autoren (basierend auf HAUPTMAN et al., 1997; leicht modifiziert und erweitert)

Kriterium	Grenzwerte			
	HARDIE, 1995:	PURVIS & KIRBY, 1994:	HAUPT- MAN et al., 1997:	DE LAFOR- CADE et al., 2003:
Temperatur (°C)	<38; >40	<37; >39	<38; >39	<37,8; >39,4
Herzfrequenz (Schläge/min)	>120	>160	>120	>140
Atemfrequenz (Züge/min)	>20	>20	>20	>20
Leukozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	<5; >18	<4; >12	<6; >16	<6; >16
Stabkernige (%)	>5	>10	>3	>3

OKANO und Mitarbeiter (OKANO et al., 2002) werfen die Frage nach einer Erhöhung der erforderlichen Atemfrequenz auf, da die bisherigen Frequenzen von der Humanmedizin entlehnt wurden. Die Autoren schlagen als Kriterium eine Atemfrequenz von über 40/min vor.

Insgesamt herrscht also eine gewisse Uneinigkeit über die Grenzen „normaler“ Parameter vor. Eine individuelle Varianz lässt jedoch auch ein mehr oder weniger breites Einschlussspektrum zu, so dass über eine internationale Einigung auch im veterinärmedizinischen Bereich nachgedacht werden sollte.

II.4 Pathogenese

II.4.1 Beteiligte Erreger

Eine systemische Infektion mit Mikroorganismen lässt sich am Besten durch das Abnehmen und Anlegen einer oder mehrerer Blutkulturen nachweisen. DOW (DOW, 1995) empfiehlt ein Minimum an zwei und ein Optimum an drei Blutkulturen zur Erleichterung zum einen des Nachweises von Bakterien und zum anderen der Interpretation der Ergebnisse (Tabelle 2).

Tabelle 2: Interpretation von Blutkulturergebnissen (DOW und JONES, 1989)

Isolierter Organismus	Häufiges Vorkommen	Interpretation
<i>Staphylokokkus aureus</i> oder <i>intermedius</i> (Koagulase-positiv)	Haut, intravenöser Katheter, Endokarditis, Diskospondylitis	signifikant
<i>Staphylokokkus</i> (Koagulase-negativ)	Haut, intravenöser Katheter	mögliche Kontamination *
<i>Streptokokkus</i> (β -hämolisierend)	Haut, Endokarditis, Diskospondylitis	signifikant
<i>Streptokokkus</i> (α -hämolisierend)	Haut, Mund	mögliche Kontamination *
<i>Enterokokkus</i> (enterischer <i>Streptokokkus</i>)	Gastrointestinaltrakt	signifikant
<i>Corynebakterium</i>	Haut, Endokarditis	möglicherweise signifikant
<i>Erysipelothrix</i>	Haut, Endokarditis	möglicherweise signifikant
<i>Enterobacteriaceae:</i> <i>Escherichia coli, Salmonella,</i> <i>Klebsiella, Enterobacter,</i> <i>Proteus, Serratia</i>	Gastrointestinal-, Harn-, Respirationstrakt	signifikant
<i>Pseudomonas</i>	Haut, Gastrointestinal-, Harntrakt	signifikant
<i>Bacteroides</i>	Gastrointestinaltrakt, Abszeß	signifikant
<i>Clostridium</i>	Haut, Gastrointestinaltrakt, Abszeß	Signifikanz unsicher

*Außer isoliert aus mehreren Kulturen

HIRSH und Mitarbeiter berichteten 1984 von den Ergebnissen einer prospektiven Untersuchung von Blutkulturen, hier wurden hauptsächlich *Enterobacteriaceae* (29 %) sowie koagulase-positive Staphylokokken (26 %) nachgewiesen. Zusätzlich untersuchte Proben vom vermuteten primären Infektionsherd oder einer Urinkultur ergaben zu 81 % *Enterobacteriaceae* sowie zu 57 % koagulase-positive Staphylokokken. CALVERT und GREENE stellen in ihrem Patientengut 1986 ebenfalls ein Überwiegen an gram-negativen Bakterien fest (57 %; gram-positive 42 %). Als Einzelorganismus konnte *Escherichia coli* und *Staphylokokkus aureus* am häufigsten aus Blutkulturen sowie zusätzlichen Isolaten aus lokalen Infektionsherden isoliert werden. Eine weitere Studie aus dem gleichen Jahr bestätigt *Escherichia coli* als wichtigstes Pathogen, an zweiter Stelle wird dort ebenfalls *Staphylokokkus aureus* genannt. Mischinfektionen wurden bei 24 % bzw. 54 % der Kulturen nachgewiesen (Blut- und Organkulturen; Einteilung in zwei Gruppen: Sepsis prä- und postoperativ) (HARDIE et al., 1986). 1989 ergab die Auswertung von Blutkulturergebnissen kritischer kranker Tiere in einer retrospektiven Studie ein Überwiegen gram-negativer Bakterien bei den Hunden. *Escherichia coli* und β -hämolisierende Streptokokken konnten als häufigste Erreger nachgewiesen werden. Mischinfektionen stellten einen Anteil von 15 % (DOW et al., 1989). Eine neuere Untersuchung mit jedoch wenigen caninen Patienten ergibt wiederum *Escherichia coli* als Haupterreger, an zweiter Stelle β -hämolisierende Streptokokken. Insgesamt überwogen auch hier gram-negative Bakterien (37 %) sowie ein ebenso großer Anteil an Mischinfektionen (DE LAFORCADE et al., 2003).

Insgesamt lässt sich also eine hauptsächliche Beteiligung von gram-negativen Bakterien mit *Escherichia coli* als häufigstem Organismus feststellen. Von den gram-positiven Erregern stehen die β -hämolisierenden Streptokokken klar im Vordergrund. Mischinfektionen stellen ebenfalls einen erheblichen Anteil an den für eine Bakteriämie verantwortlichen Erregern.

II.4.2 Rezeptorbindung und Signaltransduktion

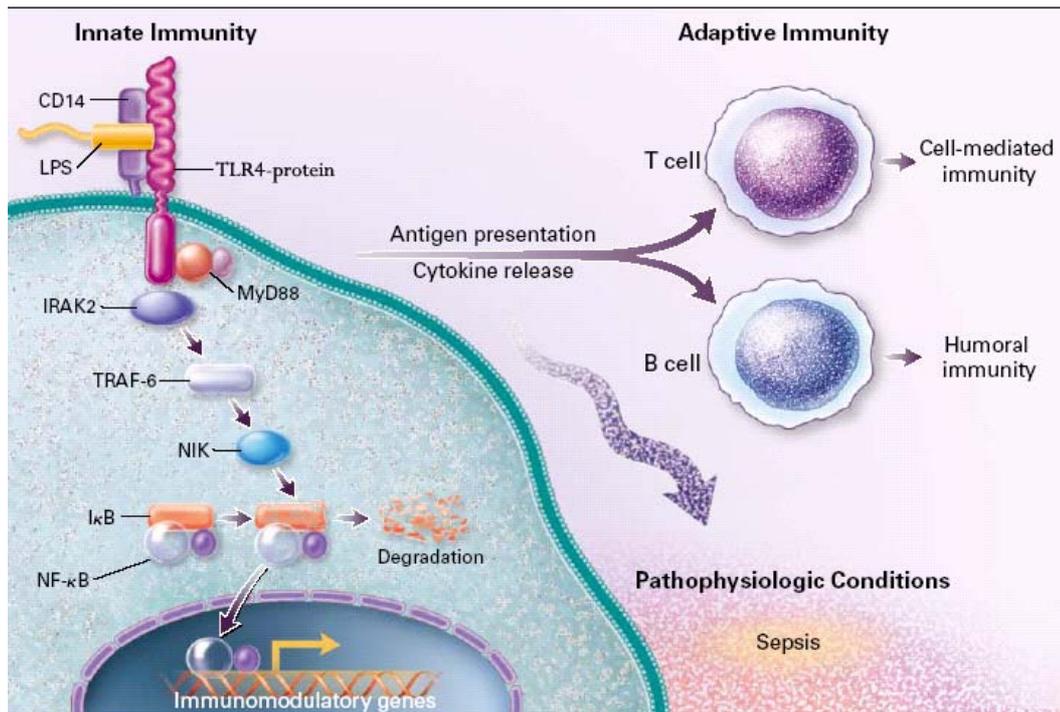
Um eine Invasion durch Mikroorganismen bekämpfen zu können, muss der Körper den Eindringling zunächst als solchen erkennen. Hier sind Mechanismen des angeborenen Teils des Immunsystems von besonderer Bedeutung, die näher erläutert werden sollen (nach TIZARD und SCHUBOT, 2004).

Makrophagen stellen zusammen mit den Dendritischen Zellen und den Mastzellen die drei wichtigsten Typen von Sentinel-Zellen (Wächterzellen) dar. Diese Zellen besitzen Rezeptoren, die hochkonservierte Moleküle oder Molekülmuster erkennen, die bei den verschiedensten Mikroorganismen, im Gegensatz zum Säugetier, weit verbreitet vorkommen. Diese Molekülmuster heißen „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs). Die wichtigsten der Zellrezeptoren sind die „toll-like receptors“ (TLRs), benannt nach einem verwandten Rezeptor namens „Toll“, der zuerst in der Fruchtfliege isoliert wurde. Bisher wurden mindestens 13 verschiedene TLR identifiziert (WEIGAND et al., 2004). TLR2 erkennt unterschiedliche bakterielle Komponenten, beispielsweise Peptidoglykane, Lipoproteine und Lipoarabinomannan (*Mycobacterium tuberculosis*). Ein weiterer wichtiger Rezeptor ist TLR4, der Lipopolysaccharide von der Oberfläche gram-negativer Bakterien (LPS) identifiziert. TLR5 bindet an Flagellin, dem Geißelprotein des Bakteriums, TLR9 an bakterielle DNA.

Freigesetztes bakterielles LPS aktiviert die Zelle nicht direkt, sondern wird zunächst von einem „LPS-binding protein“ (LBP) im Serum gebunden. Dieser Komplex bindet dann seinerseits an ein Protein namens CD14 („cluster of differentiation“), das sich an der Oberfläche von Makrophagen befindet. Dieses wiederum bindet an den TLR und setzt mit dem akzessorischen Molekül MD-2 (SHIMAZU et al., 1999) eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang: der Transkriptionsfaktor MyD88 wird rekrutiert und leitet das Signal weiter über die Interleukin-1 rezeptor-assoziierte Kinase 2 (IRAK2) und den Tumor-Nekrose-Faktor rezeptor-assoziiierter Faktor 6 (TRAF-6), bis zur NF- κ B-induzierenden Kinase (NIK). Diese Kinase phosphoryliert dann I κ B (Inhibitor), ruft dadurch dessen schnelle Degradation hervor und damit die Freisetzung des gebundenen NF- κ B. Dieser Transkriptionsfaktor ist nun in der Lage, in den Nukleus der Zelle einzudringen und dann an spezifischen Promotor-Regionen der Gene anzudocken, die zu einer vermehrten Expression immunmodulatorischer Substanzen wie Zytokine oder ko-stimulierende Moleküle führen. Diese Produkte wiederum stimulieren T- und B-Zellen zu einer Antwort des erworbenen Immunsystems

(MODLIN et al., 1999). Diese Signalkaskade unterscheidet sich in Details bei den einzelnen TLRs, dem auslösenden Faktor und den gewünschten Endprodukten.

Abbildung 1: Signaltransduktion im Makrophagen (MODLIN, 1999, modifiziert)



II.4.3 Die Zytokine

II.4.3.1 Allgemeines

„Zytokine“ werden eine wachsende Anzahl an Proteinen und Glykoproteinen genannt, die als chemische Botschafter zwischen Zellen fungieren und bei Zellwachstum und -differenzierung, Reparatur und Remodeling von Gewebe sowie der Regulation des Immunsystems beteiligt sind. Zytokine beeinflussen im Gegensatz zu gewöhnlichen Hormonen eine Vielzahl an verschiedener Zellen (Pleiotropismus) und wirken auch auf die Synthese anderer Zytokine ein. Durch die Fähigkeit, diese Produktion zu steigern oder zu unterdrücken, kann das Immunsystem und die Entzündungsreaktion gesteuert werden (OBERHOLZER et. al., 2000). Zytokine werden äußerst selten einzeln sezerniert, stattdessen

produziert eine Zelle, zum Beispiel ein Makrophage, mehrere dieser Proteine gleichzeitig. Diese sind sich teilweise in ihrer biologischen Funktion gleich; so wird Fieber sowohl von IL-1, TNF- α , TNF- β , IL-6 und HMGB-1 hervorgerufen (synergistische Effekte). „Interleukine“ sind die Zytokine, die für die Interaktion zwischen Lymphozyten und anderen Leukozyten verantwortlich sind (TIZARD und SCHUBOT, 2004). Die Produktion von Interleukinen erfolgt durch verschiedene Zellen, vornehmlich jedoch durch Makrophagen, T-Zellen, und B-Zellen. Die Zytokin-Aktivität kann auf unterschiedliche Weise reguliert werden: durch Erhöhung der Rezeptorexpression nach Aktivierung (z.B. IL-2 Rezeptoren auf T-Zellen, TIZARD und SCHUBOT, 2004), Rezeptorantagonisten (z.B. IL-1 RA, COLOTTA et al., 1994), die Existenz von löslichen Rezeptoren, die dadurch entweder die Bindung an die Zellrezeptoren verhindern (z.B. TNF- α , VAN ZEE et al., 1992) oder einen biologisch aktiven Komplex formen (z.B. die lösliche IL-6R α -Kette mit IL-6, MODUR et al., 1997). Die wichtigste Regulierungsmaßnahme stellt jedoch die Fähigkeit der Zytokine dar, sich gegenseitig zu beeinflussen und die Produktion anderer entweder zu verstärken oder zu unterdrücken (OBERHOLZER et al., 2000).

II.4.3.2 Interleukin-6

Interleukin-6 wird von einer großen Anzahl an Zellen produziert, beispielsweise aktivierten Makrophagen, T- und B-Zellen, Mastzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und mesangiale Zellen (TIZARD und SCHUBOT, 2004). IL-6 selber scheint jedoch eine sehr kontroverse Rolle bei der Pathogenese der Sepsis zu spielen, da IL-6 defiziente und Mäuse vom Wildtyp in einigen Studien keinen Unterschied in ihrer Reaktion nach Induktion einer Sepsis zeigten (REMICK et al., 2005; LEON et al., 1998). Eine andere Studie mit knock-out Mäusen zeigt jedoch eine erhöhte Anfälligkeit für eine Bakteriämie (DALRYMPLE et al., 1996), sowie eine erhöhte Überlebensrate nach Infusion mit einem anti-IL-6 Antikörper (GENNARI & ALEXANDER, 1995; RIEDEMANN et al., 2003a). Wenn auch die pathogenetische Beteiligung nicht endgültig klar ist, so ist jedoch die Rolle von IL-6 als Marker der Entzündung vielfach nachgewiesen (siehe Punkt IV.4.3).

II.4.3.3 Die Zytokinkaskade

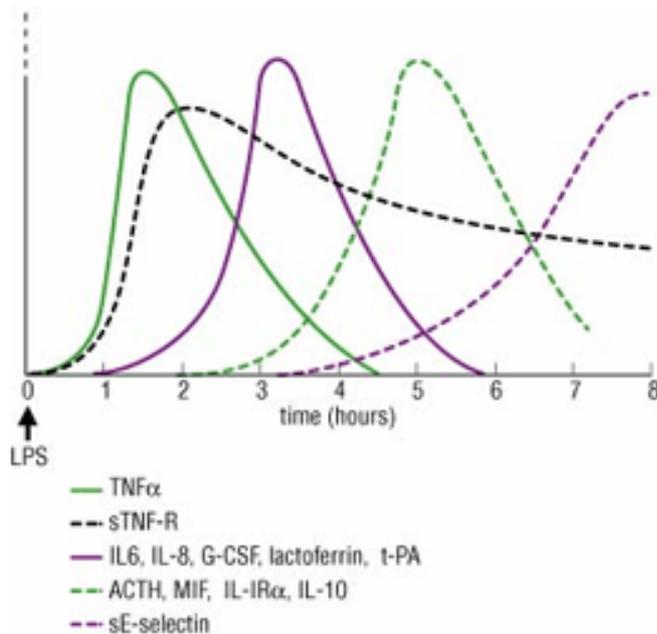
Nachdem ein Stimulus wie etwa ein bakterielles Endotoxin die Produktion von Zytokinen anregt, werden zunächst die frühen, so genannten „proximalen“ Zytokine ausgeschüttet. Dazu gehören TNF- α und IL-1 β (BLACKWELL & CHRISTMAN, 1996). Sowohl die proximalen Zytokine als auch das Endotoxin selber stimulieren wiederum die Produktion späterer, „distaler“ Zytokine wie IL-6 und IL-8. IL-6 moduliert die Lymphozytenfunktion, aktiviert die Koagulation und induziert die Synthese der Akute-Phase-Proteine in den Hepatozyten und hemmt auch die Produktion der frühen Zytokine (BLACKWELL & CHRISTMAN, 1996; HEINRICH et al., 1990). IL-8 hingegen ist ein sehr potenter Aktivator und Chemoattraktor für polymorphkernige Leukozyten (BLACKWELL & CHRISTMAN, 1996). Im späteren Verlauf der Sepsis werden auch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 ausgeschüttet, das die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und die Antigen-Präsentation der Makrophagen inhibiert (WEIGAND et al., 2004), sowie als sehr später Mediator der Sepsis ein weiteres pro-inflammatorisches Zytokin, HMGB-1 (WANG et al., 2001).

II.4.3.4 Zeitlicher Ablauf der Ausschüttung

TNF- α wird innerhalb Minuten nach Infektion ausgeschüttet, ein Peak findet sich in der Regel nach 1 – 2 h. Nach bereits 4 – 6 h kann kein nachweisbarer Serumspiegel mehr gefunden werden (BEUTLER et al., 1985; LEMAY et al., 1990; MIYAMOTO et al., 1996; KITOHO et al., 2001). Dies impliziert natürlich die geringe Verwendbarkeit als Marker, und zum anderen die Schwierigkeit therapeutischer Maßnahmen wie anti-TNF- α Antikörper. IL-1 β kann hingegen nur selten überhaupt im Serum gefunden werden (DAMAS et al., 1992; PINSKY et al., 1993) und wenn, dann meist mit niedrigeren Spiegeln als TNF- α (WAAGE et al., 1989; DAMAS et al., 1989). IL-6 zeigt bei experimentellen Studien einen Peak nach 2 Stunden (LEMAY et al., 1990; MIYAMOTO et al., 1996; YAMASHITA et al., 1994a). In prospektiven klinischen Studien konnten die höchsten Serumspiegel zum Zeitpunkt der Einlieferung gemessen werden, und, je nach Schwere der Erkrankung, ein kontinuierlicher Abfall über mehrere Tage hinweg (THIJS & HACK, 1995). Die bisherigen wenigen Untersuchungen zu IL-8 lassen den Schluss erhöhter Blutspiegel zum Zeitpunkt der Einlieferung zu, sind aber bisher kontrovers bezüglich eines Abfalls (THIJS & HACK, 1995;

BLACKWELL & CHRISTMAN, 1996). Die pro-inflammatorischen Zytokine werden nach dem initialen Peak von TNF- α ausgeschüttet (VAN DER POLL & VAN DEVENTER, 1999). HMGB-1 lässt sich erstmals 8 h nach LPS-Gabe im Serum nachweisen und steigt bis zu einem Plateau auf, das 16 bis 32 Stunden anhält (WANG et al., 2001).

Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der Zytokinausschüttung nach Infusion eines Menschen mit LPS (nach GOLDHILL et al., 2002)

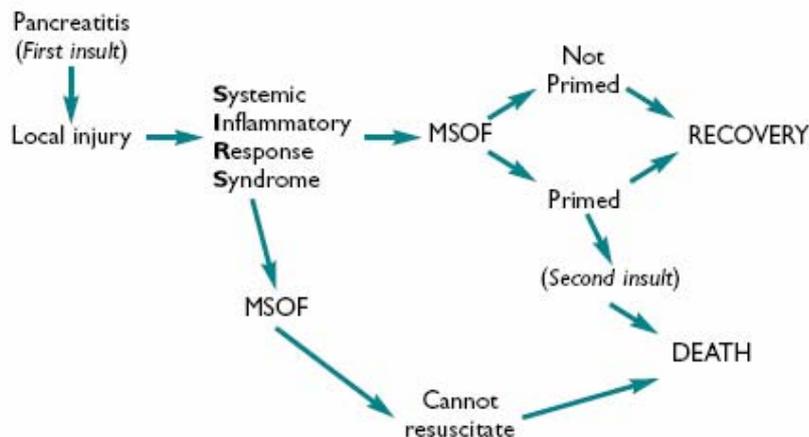


II.4.4 Wege in die Sepsis und das Multiorganversagen

II.4.4.1 Das „Two-Hit“-Modell

Der Weg von einer systemischen entzündlichen Reaktion (SIRS) bis hin zu einer manifesten Sepsis wird unter anderem mit dem so genannten „Two-Hit-Modell“ erklärt (MOORE & MOORE, 1995). Diskutiert wird das Entstehen einer schweren systemischen entzündlichen Reaktion, unabhängig von einer Infektion, durch ein massives initiales Trauma („One-Hit“-Modell). Als Alternative dazu formulieren die Autoren einen weniger massiven traumatischen Insult, der lediglich zu einer Aktivierung des Körpers führt. Später erfolgt zusätzlich eine sonst folgenlose entzündliche Einwirkung, die damit insgesamt zu einer schweren Reaktion führt („Two-Hit“-Modell). BRADY und Mitarbeiter beschreiben damit den Weg einer Pankreatitis zum Multiorganversagen (Abbildung 3).

Abbildung 3: „Two-Hit“-Modell am Beispiel einer Pankreatitis (nach BRADY et al., 1999). MSOF = Multiple System Organ Failure.



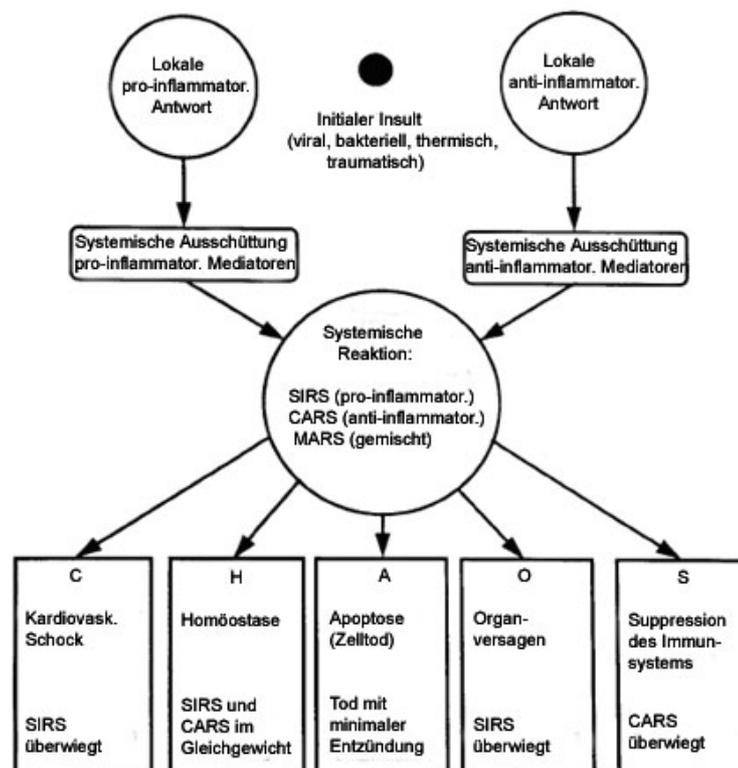
Auch die Entstehung einer Sepsis infolge bakterieller Translokation wurde anhand dieses Modells veranschaulicht: Als erster „Hit“ erfolgt ein initialer Schaden wie ein Trauma oder Schock, der zur Hypoperfusion des Darms, Ischämie und zur Aktivierung des Immunsystems und Produktion von Entzündungsmediatoren führt (frühe SIRS). Der zweite „Hit“ stellt eine bakterielle Translokation dar, die dann den Körper in eine manifeste Sepsis führt (BELLHORN & MACINTIRE, 2004).

II.4.4.2 Die immunologische Imbalanz

Wie also führt eine Sepsis nun zum Multiorganversagen? BONE und Mitarbeiter postulieren 1996 und 1997 5 Stadien bis zur Entwicklung eines Multiorganversagens: (1) lokale Reaktion am Herd der Infektion oder Verletzung, (2) initiale systemische Antwort, (3) massive systemische Entzündung, (4) eine überschießende Immunsuppression und (5) die immunologische Imbalanz. Im ersten Stadium werden nach einer Infektion oder Verletzung wie einer chirurgischen Wunde, einer starken Verbrennung oder einer Pankreatitis lokal Entzündungsmediatoren freigesetzt. Als Kompensationsmechanismus sezerniert der Körper rasch anti-entzündliche Substanzen. Eine Homöostase wird bei guten Voraussetzungen (kleine Läsion, keine zusätzlichen prädisponierenden Faktoren) schnell erreicht. Sollte dies nicht der Fall sein, so beginnt bald Stadium 2: systemischer Übertritt von Pathogenen oder Antigenen und damit Initiierung der Bildung weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren. Auch hier sollten Kompensationsmechanismen einsetzen und die entzündliche Reaktion rasch

eingedämmt werden. Klinische Anzeichen sieht man in diesem Fall kaum. Kann die Reaktion nicht unter Kontrolle gebracht werden, so entsteht eine heftige systemische Entzündung mit allen klinischen Symptomen einer SIRS (Stadium 3). Entweder ist die Menge der pro-inflammatorischer Mediatoren so groß, dass nun nachfolgende kompensatorische Mechanismen versagen, oder diese genannten Mechanismen sind überschießend). Die systemische Reaktion kann auch aus einer gemischten Immunantwort bestehen: mixed antagonists response syndrome (MARS). Ein zweiter Insult oder ein immer noch bestehender Initialherd führt ebenfalls zu einer immunologischen Imbalanz. Die überschießende anti-inflammatorische Reaktion (compensatory anti-inflammatory response syndrome CARS, Stadium 4) führt zu einer Immunsuppression und damit erhöhten Empfänglichkeit für Infektionen. Durch eine massive pro- oder anti-inflammatorische Reaktion oder „Entgleisung“ der Homöostase ist nun Stadium 5 rasch erreicht: das Multiorganversagen (multiple organ dysfunction syndrome MODS).

Abbildung 4: Pathogenetische Hypothese für die verschiedenen Reaktionen des Immunsystems (modifiziert nach BONE, 1996). SIRS = systemic inflammatory response syndrome, CARS = compensatory anti-inflammatory response syndrome, MARS = mixed antagonists response syndrome.



II.5 Auswirkungen der Sepsis

II.5.1 Kardiovaskuläres System

Die hyperdynamische Phase ist durch Tachykardie, Tachypnoe, hyperämische rote Schleimhäute, Hyperventilation und einer verkürzten kapillären Füllungszeit gekennzeichnet. Durch eine verringerte Nachlast und Stimulation des Sympathikus steigt die kardiale Auswurfleistung, und der periphere Gefäßwiderstand ist aufgrund verschiedener zytokininduzierter Mechanismen verringert (Vasodilatation) (MCANULTY, 1983; HARDIE & RAWLINGS, 1983; WEEREN & MUIR, 1992, GREEN & ADAMS, 1992). Der Sauerstoffbedarf peripheren Gewebes ist erhöht, obwohl manche Gebiete den Sauerstoff entweder schlecht aufnehmen oder verwenden können. Dies aktiviert Kompensationsmechanismen wie den beschriebenen erhöhten kardialen Output (GREEN & ADAMS, 1992).

Auf die hyperdynamische Phase kann die hypodynamische Reaktion folgen oder auch alleine auftreten. Hier stellt man eine systemische Hypotension, verringerten kardialen Output und verringerte Ejektionsfraktion, erhöhten peripheren Gefäßwiderstand und einen niedrigen zentralen Venendruck fest. Klinische Anzeichen sind eine Hypothermie, irreguläre Atmung und ein schneller aber schwacher Puls (MCANULTY, 1983; WEEREN & MUIR, 1992; GREEN & ADAMS, 1992). Für die zunehmende Dysfunktion des Herzens sind zirkulierende myokardiale Faktoren und auch TNF- α und IL-1 β verantwortlich (PARILLO et al., 1990; ASTIZ & RACKOW, 1998; BALK, 2000; TSIOTOU et al., 2005). Die kapilläre Füllungszeit ist verlängert und die Mucosalschleimhaut ist sehr blass (GAHHOS et al., 1981; GREEN & ADAMS, 1992). Der Gefäßwiderstand wird durch arterielle Vasokonstriktion erhöht, die vermutlich auf der Produktion von Thromboxan A₂ beruht (WEEREN & MUIR, 1992).

Während beider Phasen besteht eine Vasodilatation der venösen Gefäße, wodurch es zu einem venösen „Pooling“ und einer reduzierten Vorlast kommt (CUNNION & PARRILLO; 1989; PURVIS & KIRBY, 1994; ASTIZ & RACKOW, 1998). Endotoxine und Zytokine regen die Expression der induzierbaren Nitroxid-Synthetase (iNOS) in Endothelzellen, Myozyten, Makrophagen und den glatten Muskelzellen der Gefäße an. Das darauffolgend produzierte Nitroxid ist toxisch für Endothelzellen und sorgt so für eine erhöhte vaskuläre Permeabilität. Es fördert außerdem die Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat cGMP,

das ein potenter Vasodilatator ist (VALLANCE & MONCADA, 1993; LANDRY & OLIVER, 2001). Als weitere Mechanismen der refraktären Vasodilatation wird eine Aktivierung der Kaliumkanäle in den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (die daraus resultierende Hyperpolarisation verhindert den Einstrom von Kalzium und damit die Vasokonstriktion) sowie eine Defizienz des Hormons Vasopressin postuliert (LANDRY & OLIVER, 2001).

Der portale Venendruck ist im Rahmen der Sepsis erhöht und führt zu einer Ansammlung von Blut im hepatolienalen Gebiet (SZIEBERT et al., 1983). Das Blutvolumen wird weiter durch ein Abwandern von Proteinen und Flüssigkeit in den Extravasalraum reduziert (HARDIE & RAWLINGS, 1983; WEEREN & MUIR., 1992; GREEN & ADAMS, 1992). Durch diese Veränderungen folgt eine Minderdurchblutung des Gewebes, das zu ischämischen Schäden und weiteren metabolischen Entgleisungen führt. Im Bereich kleinerer Gefäße kann es durch die Hyperviskosität, die Ansammlung von Mikroaggregaten und Neutrophilen sowie eine gesteigerte Gerinnungsneigung (siehe Punkt II. 5.5) zur Obstruktion kommen und den Blutfluss weiter hemmen (BARIS et al., 1980; PURVIS & KIRBY, 1994; DAVIES & HAGEN, 1997).

Weitere häufige Manifestationen der zunehmenden kardialen Dysfunktion in der Sepsis sind Arrhythmien. Ventrikuläre und supraventrikuläre Tachykardien führen zu einer verringerten ventrikulären Füllung und reduzieren den kardialen Auswurf (HACKETT, 2001).

II.5.2 Die Niere

Durch die beschriebenen Mechanismen kommt es häufig zu einer Hypovolämie und Minderperfusion der Niere, die durch renale Vasokonstriktion in Folge erhöhter Katecholaminspiegel noch verschlimmert wird (BRADY & KING, 2000). Weitere Mechanismen können direkte toxische Schäden durch bakterielle Endotoxine oder die Ablagerung von Mikrothromben im renalen Gefäßbett sein (HARDIE & RAWLINGS, 1983; HARRIS et al., 1987; WEEREN & MUIR, 1992). Anurie und Oligurie sind erste klinische Anzeichen einer renalen Hypoperfusion. Besonders die äußere Medulla der Niere ist sehr sensitiv gegenüber einer Ischämie, da sie aufgrund der dortigen Transportaktivität einen hohen Sauerstoffbedarf hat (BRADY & KING, 2000; HACKETT, 2001). Aktivierte Neutrophile infiltrieren die Niere und sezernieren dort Zytokine, die

wiederum die renale Vasokonstriktion und die Kontraktion der Mesangialzellen fördern und zu einem verringerten Filtrationsdruck führen. Weitere zelluläre Schädigungen entstehen durch freigesetzte Proteasen und Sauerstoffradikale (BRADY & KING, 2000). Zusätzliche Faktoren, die zu einer akuten Tubulusnekrose beitragen, sind nephrotoxische Medikamente und Hypotension (BALK, 2000a und 2000b). Die renalen Auswirkungen einer Sepsis können von einer minimalen Proteinurie bis hin zu einem akuten Nierenversagen variieren (HARRIS et al., 1987).

II.5.3 Gastrointestinaltrakt

Der Gastrointestinaltrakt wird vermutlich durch eine Hypoxie des Gewebes sowie eine verminderte Organperfusion geschädigt. Im Bereich der Zotten bestehen anatomische Besonderheiten, die bei einer Minderperfusion eine selektive Ischämie begünstigt: durch Strömungsgeschwindigkeitsunterschiede innerhalb der Kapillare kommt es physiologischerweise zu einer dynamischen Hämatokriterniedrigung (Fahraeus-Effekt; BARBEE & COKELET, 1971) und das Sauerstoffangebot in den Villusspitzen wird durch funktionelle Shunts („countercurrent exchange“) eingeschränkt (HAGLUND et al., 1975).

Freiwerdende Sauerstoffradikale, beginnende Lipidperoxidation durch Nitroxid, Einwirkungen der Gallensäuren und pankreatischen Proteasen führen zum Zusammenbruch der Darmschranke (HARDIE & RAWLINGS, 1983; HARRIS et al., 1987; HASKINS, 1992; SCHLAG & REDL, 1996). Weitere Faktoren sind die Anwendung von Antibiotika im Rahmen der Sepsis, die auch zu einer Reduktion der natürlich vorhandenen Darmflora führt, und eine mangelnde Futteraufnahme mit Unterversorgung der Enterozyten und daraus resultierender lokaler Immundefizienz und Mukosaschädigung (BALK, 2000a und 2000b; MACINTIRE & BELLHORN, 2002; BELLHORN & MACINTIRE, 2004). Klinische Folgen sind Ulzerationen, Meläna und Ileus (BRADY & OTTO, 2001). Es besteht die Gefahr des Übertritts pathogener Bakterien und damit des erneuten Freiwerdens von Zytokinen und Endotoxinen (SCHLAG & REDL, 1996; BALK, 2000a und 2000b; BELLHORN & MACINTIRE, 2004; TSIOTOU et al., 2005).

II.5.4 Die Leber

Eine Hyperbilirubinämie und milde Erhöhung der Leberenzyme treten im Rahmen einer Sepsis häufig auf (BANKS et al., 1982; HARDIE & RAWLINGS, 1983; HARRIS et al., 1987; TABOADA & MEYER, 1989). Experimentell konnte herausgefunden werden, dass Hunde, im Gegensatz zu Katzen, im Blut zirkulierende Bakterien primär über die Leber und Milz herausfiltern (CROCKER et al., 1981). Dies erklärt zum einen das weniger häufige Auftreten des „Acute respiratory distress syndromes (ARDS)“ bei Hunden, und zum anderen zusätzliche Möglichkeiten für eine Leberschädigung (WEEREN & MUIR, 1992). Die Kupffer-Zellen der Leber können Chemokine freisetzen, damit Neutrophile anlocken und diese aktivieren. Nachdem diese in das Parenchym eingewandert sind, produzieren sie Sauerstoffradikale und Proteasen und können damit den Leberzellen Schaden zufügen. Zusätzlich führt dies zu mikrovaskulären Störungen, Fibrinablagerungen und zu einer weiteren Förderung der Entzündung (DHAINAUT et al., 2001).

Als Ursache für die Erhöhung des Bilirubins wird eine Inhibition der Natrium-Kalium-Pumpe durch Endotoxin beschrieben, die dadurch weniger konjugiertes Bilirubin in die Gallengänge befördern kann (GREEN et al., 1996; BOLDER et al., 1997). Zusätzlich konnte experimentell herausgefunden werden, dass TNF- α den Einbau der Pumpen und Transporter für Gallensäure in die Hepatozytenmembran um 50 – 90 % reduziert (GREEN et al., 1996).

Im Rahmen eines weiteren Leberversagens wird, neben den Gerinnungsfaktoren, auch die Albuminproduktion reduziert und trägt so, neben Verlusten über die geschädigten Gefäßwände und dem erhöhten Abbau von Proteinen zur Energiegewinnung, zur Hypalbuminämie bei (BRADY & KING, 2000).

II.5.5 Sepsis und Koagulation

Pro-inflammatorische Mediatoren wie Endotoxine, TNF- α , Lipoproteine und Wachstumsfaktoren stimulieren die Expression von Tissue Faktor (TF) auf Endothelzellen und zirkulierenden Monozyten (WEISS & RASHID, 1998; AIRD, 2003; LEVI et al., 2003; AMARAL et al., 2004; HOPPER & SHANE, 2005). TF ist der wichtigste Initiator der extrinsischen Gerinnungskaskade und bindet und aktiviert Faktor VII, der über die bekannten Wege letztlich zu einer Bildung von Thrombin führt. Diese entzündungsinduzierte Koagulation führt zur

disseminierten intravasalen Gerinnung (disseminated intravascular coagulation DIC), die zu einem Multiorganversagen beitragen kann (LEVI et al., 1997; TEN CATE, 2000). Eine Aktivierung der Gerinnung fördert wiederum auch pro-inflammatorische Zytokine und die Leukozytenfunktion; Thrombin beispielsweise induziert die Produktion von IL-6 durch Fibroblasten, Epithel- und mononukleare Zellen und hat Einfluss auf die Sekretion eines chemotaktischen Proteins für Monozyten (LEVI et al., 2003). Im Gegenzug dazu hat eine vermehrte anti-koagulatorische Umgebung auch einen anti-inflammatorischen Effekt (HOPPER & SHANE, 2005). Das fibrinolytische System wird jedoch nach einer kurzen Phase der erhöhten Aktivität durch zytokin-medierte Ausschüttung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) komplett unterdrückt (LEVI et al., 1997; WEISS & RASHID, 1998; TEN CATE, 2000; AIRD, 2003). Protein C und S werden durch eine erniedrigte Expression von Thrombomodulin an der Zelloberfläche inhibiert, und zusammen mit dem erhöhten Verbrauch von Antithrombin (AT) durch die mikrovaskuläre Gerinnung verschiebt sich das Gleichgewicht immer weiter in Richtung pro-inflammatorischer und prokoagulatorischer Systeme (LEVI et al., 1997; BRADY & OTTO, 2001; AIRD, 2003; AMARAL et al., 2004). Zusätzlich dazu aktiviert Endotoxin direkt die Plättchenaggregation und indirekt durch Zytokine den Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) (SCHLAG & REDL, 1996; WEISS & RASHID, 1998; LEVI et al., 2003). Insgesamt ist diese Hyperkoagulabilität mit etlichen bekannten negativen Effekten wie Bildung von Thromben, mikrovaskuläre Verletzungen, lokale Hypoxie und Ischämie sowie DIC mit anschließender Blutungsneigung verbunden.

II.5.6 Kohlehydratmetabolismus

Im Rahmen einer Sepsis ist der Glukoseuptake im gesamten Körper erhöht (LANG & DOBRESU, 1991; VARY et al., 1995). Dieser Effekt bleibt sogar während einer Hypoglykämie bestehen (LANG & DOBRESU, 1991) und beruht hauptsächlich auf einem nicht-insulin-abhängigen Carrier (MIZOCK, 1995). Experimentell konnte herausgefunden werden, dass TNF- α die Glukoseaufnahme in makrophagenreichen Gewebe wie Lunge, Milz, Ileum und Leber steigert (MESZAROS et al., 1987; SPOLARICS et al., 1991). Solange die Glykogenspeicher in der Leber noch gefüllt sind, kann der erhöhte Verbrauch

gedeckt werden. Gleichzeitig setzt auch eine vermehrte Glukoneogenese ein, die durch den negativen Feedback-Mechanismus freier Glukose nicht mehr beeinflussbar ist (SIEGEL et al., 1979; CERRA, 1987; WOLFE, 1997). Zusätzlich entsteht durch die Ausschüttung von Stresshormonen wie Cortisol und Wachstumshormon, Zytokinen und Nitroxid eine periphere Insulinresistenz (BERRINGER & HARWOOD-NUSS, 1985; VAN DEN BERGHE et al., 1998; AGWUNOBI et al., 2000; SUGITA et al., 2002). Die daraus resultierende Hyperglykämie beeinträchtigt die Phagozytenfunktion der Neutrophilen (HOTCHKISS & KARL, 2003). Weitere beschriebene Nebenwirkungen sind außerdem eine verstärkte Gerinnungsneigung (CARR, 2001) sowie durch eine gesteigerte Aktivierung eines Rezeptors für HMGB-1 auch eine direkte Förderung der inflammatorischen Reaktion (SCHMIDT et al., 2000).

Hält die septische Reaktion weiter an, so kommt es im Verlauf zu einer Hypoglykämie. Dies führt man auf die erschöpften Vorräte und weiteren erhöhten Verbrauch in der Peripherie zurück (RAYMOND et al., 1981; LANG & DOBRESCU, 1991; VARY et al., 1995; BRADY & KING, 2000). Diskutiert wird auch ein Schaden auf mitochondrialer Ebene der Leber, der zu einem Mangel an ATP und der Glukosevorstufe Phosphoenolpyruvat führt (RHODES, 1981; DEUTSCHMAN et al., 1993).

II.5.7 Laktatazidose

Nach Aufnahme der Glukose in die Zellen wird normalerweise durch die Glykolyse Pyruvat produziert. Dieses kann wiederum durch Oxidation in CO₂ umgewandelt oder unter anderem auch zu Laktat abgebaut werden. Die Pathophysiologie der entstehenden Laktatazidose im septischen Schock ist noch nicht ganz geklärt. Unter normalen Umständen sind Nieren und vor allem die Leber Hauptorgane des Laktatabbaus (FALL & SZERLIP, 2005). CHRUSCH und Mitarbeiter fanden durch experimentell induzierte Sepsis bei Hunden heraus, dass eine Anhäufung von Laktat sowohl durch eine Produktion in der Milz als auch durch eine verminderte Extraktion in der Leber statt findet (CHRUSCH et al., 2002). In diesem Experiment verwendete Vasopressoren hatten keinen Effekt auf die Laktatazidose. Eine Gewebshypoxie halten die Autoren als Ursache für eine Laktatazidose für eher unwahrscheinlich, geben aber einen möglichen Mangel in der Sensitivität der Messtechnik zu. MIZOCK diskutiert ebenfalls eine mögliche,

aber eher unwahrscheinliche mangelnde Oxygenierung und damit entstehende Laktatproduktion anhand von mehreren kontroversen Studien (MIZOCK, 1995). Beschrieben werden als mögliche Theorien außerdem eine erhöhte Produktion von Pyruvat (GORE et al., 1996), verringerte Aktivität der Pyruvatdehydrogenase (VARY et al., 1986), lokale Unterschiede in der Laktatproduktion (TENHUNEN et al., 2003; VALLET et al., 1994), eine Freisetzung von Laktat aus dem Lungenparenchym (BROWN et al., 1996; KELLUM et al., 1997) sowie ebenfalls eine verringerte Clearance des Laktats (FALK et al., 1985; SEVERIN et al., 2002).

II.5.8 Die Lunge

Ein akutes Atemnotsyndrom (Acute Respiratory Distress Syndrome ARDS) ist eine nicht seltene Folge der Sepsis. Durch die Freisetzung von Zytokinen, Komplementfaktoren, Sauerstoffradikalen und die Degranulation Neutrophiler und Makrophagen mit Produktion von Proteasen wird die Permeabilität der Lungenkapillaren erhöht (MCANULTY, 1983; HASKINS, 1992; PARENT et al., 1996; FEIN & CALALANG-COLUCCI, 2000; PUNEET et al., 2005). Die Alveolen werden von einem proteinreichen Exsudat regelrecht überschwemmt. Diffuse infiltrative Prozesse verringern die Compliance der Lunge und erschweren so die Atmung. Zusätzlich entsteht ein Ungleichgewicht der Ventilation/Perfusion, und das Blut versackt teilweise in nicht belüfteten Alveoli (PARENT et al., 1996; BRADY & KING, 2000). Nach der ersten exsudativen und dann proliferativen Phase beginnt eine ausgedehnte Fibrosierung mit Ablagerungen von Kollagen und damit ein weiterer Verschluss von Alveolen, Bronchien und Gefäßen (MEDURI, 1993; FEIN & CALALANG-COLUCCI, 2000). Histologische Befunde sind eine alveoläre Entzündung, Lungenödem, Hämorrhagie, nekrotische Bereiche mit der Bildung hyaliner Membranen, Gefäßstauung, interstitielle Fibrose und eine Proliferation der Alveolarzellen vom Typ II (BERRINGER & HARWOOD-NUSS, 1986; PARENT et al., 1996).

Der Sauerstoffaustausch kann durch diese pathologischen Veränderungen nicht mehr ausreichend gewährleistet werden und führt zu einer schweren Hypoxie, die durch Sauerstoffzufuhr nicht abgewendet werden kann, und damit zu einem Lungenversagen.

III Publikation

Plasma IL-6 response is predictive for severity and mortality in canine SIRS and sepsis.

Stefanie Rau

Katrin Hartmann, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

Johannes Hirschberger, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA, hon. Dipl. ECVCP

Medizinische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstrasse 13, 80539 München, Deutschland

Constance Richter

Barbara Kohn, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin, Deutschland

Nora Fenske

Helmut Küchenhoff, Prof. Dr.

Statistisches Beratungslabor, Institut für Statistik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Akademiestr.1, 80799 München, Deutschland

Stefan Härtle

Bernd Kaspers, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil.

Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstrasse 13, 80539 München, Deutschland

Veterinary Clinical Pathology, zur Veröffentlichung angenommen

Plasma IL-6 response is predictive for severity and mortality in canine SIRS and sepsis.

Running Header: IL-6 in canine SIRS and sepsis

Stefanie Rau, Barbara Kohn, Constance Richter, Nora Fenske, Helmut Küchenhoff, Katrin Hartmann, Stefan Härtle, Bernd Kaspers, Johannes Hirschberger

Abstract

Background: Sepsis is still a major cause of death in both human and veterinary medicine. Early diagnosis is essential for appropriate treatment. Identification of patients at risk for developing sepsis is already possible in human medicine through the measurement of plasma IL-6 levels. In veterinary medicine, however, this has only been investigated in canine experimental models. **Objectives:** The purpose of this study was to measure IL-6 plasma levels in dogs with naturally occurring systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis and to analyse the value of IL-6 as a predictive parameter for severity and mortality. **Methods:** Included in the study were 79 dogs that had been admitted to the small animal clinics of Munich and Berlin from July 2004 to July 2005 and which satisfied the diagnostic criteria for SIRS and sepsis as defined using established parameters. Measurement of plasma IL-6 levels on day 0, 1, and 2 was performed by the use of a colorimetric bioassay based on IL-6 dependent cell growth. **Results:** Septic foci were identified in 43 patients (septic group), and 36 patients were enrolled in the SIRS group. The frequency of positive blood cultures was 11%. The overall mortality rate was 48%. Higher IL-6 plasma levels on the day of admission were significantly correlated with a more severe degree of disease, increased mortality rates and earlier fatality. **Conclusions:** In this study we show that plasma IL-6 qualifies as an interesting and predictive laboratory parameter in canine SIRS and sepsis.

Key words: IL-6, SIRS, sepsis, dog

According to recent reports, the incidence rate for sepsis has been increasing over the past few decades, being now the tenth leading cause of death in the United States¹⁻². Unfortunately, no such information is available regarding sepsis and SIRS in dogs and cats. Data collected by the University of Pennsylvania Veterinary Teaching Hospital suggests a similar increase in the incidence of septic cases from 1 per 1000 hospital cases in 1988 to 3.5 in 1998³. This increase may of course be due to an improved clinical suspicion of sepsis with the consequence of an increased likelihood of making that diagnosis, rather than a true increased frequency of occurrence of sepsis. Mortality rates ranging from 31% to 50% have been reported in various veterinary studies⁴⁻⁹. Therapeutic intervention consists mainly of supportive care and antibiotics and of course treating the underlying cause, as specific anti-inflammatory strategies have failed in human clinical trials¹⁰⁻¹³. The only promising exception, that of drotrecogin alfa, is rapidly eliminated, has antigenic potential¹⁴ and is currently far too expensive to use in companion animals. Successful treatment depends frequently on early diagnosis. Therefore, an identification of animals at risk for sepsis is an urgent current research goal. A presumptive diagnosis of sepsis is based on the criteria for the identification of SIRS, as defined by the ACCP/SCCM (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine) consensus conference¹⁵ and modified for veterinary use^{4,16}, and either the histologic or microbiologic confirmation of infection. At the time of the initial clinical presentation and examination only the classification by the SIRS criteria⁴ is available. The analysis of the bacterial culture takes several days and false negative results are not uncommon. SIRS and Sepsis are characterized by an activation of the cytokine network. The pro-inflammatory cytokine Interleukin-6 (IL-6) has a longer plasma half-life than TNF- α or IL-1 β and has proven to be significantly elevated in septic human patients. A correlation between high levels of IL-6 on admission and mortality was evidenced in most of these studies¹⁷⁻³². IL-6 thus appears to be a good marker of the severity of systemic bacterial infection when measured at the time of admission. Canine experimental models produced by administering infusions of either live *Escherichia coli*, or lipopolysaccharide (LPS) or an artificial inflammation with turpentine oil have also shown the induction of high levels of IL-6³³⁻³⁷. However, this cytokine has to the authors' knowledge never been researched in naturally occurring septicaemia in the dog. Additionally, the experimental studies are mostly short-term (as seen in table 5) and little

information is available about IL-6 levels in dogs over several days of clinical illness. Here we provide the first evidence that plasma IL-6 levels can be used as prognostic markers in septic patients.

Materials and Methods

Patients. Included in the study were 79 dogs with clinical suspicion of sepsis that had been admitted to the small animal clinics of Munich (n = 35) and Berlin (n = 44) from July 2004 to July 2005. Criteria for the diagnosis SIRS were defined in accordance with the study from A.M. de Laforcade⁴: systemic illness was considered to be present if two or more of the following criteria were met: hypo- or hyperthermia (<37.8°C or >39.4°C), tachycardia (heart rate >140 bpm), tachypnea (respiratory rate >20 breaths/min), leukocytosis (>16,000 cells/ μ l), leukopenia (<6,000 cells/ μ l) or >3% bands. Time-point of application was either on the day of admittance or during hospitalization of the patient, when development of sepsis was suspected. Animals were subsequently classified as septic if additional histological or microbiological confirmation of infection was available. Septic patients were again divided into the subgroups sepsis, severe sepsis (sepsis associated with organ dysfunction, hypoperfusion or hypotension) and septic shock (hypotension defined by a systolic arterial pressure below 90 mmHg or a reduction in systolic blood pressure of more than 40 mmHg from baseline, despite adequate volume resuscitation) as proposed by the Consensus Conference¹⁵. Mortality was defined as death or euthanasia during hospitalisation.

Blood sampling. Blood for bacteriological cultures was obtained from the jugular vein following disinfection with povidone iodine and isopropyl alcohol. At least one culture was taken in 64 dogs, in selected cases a second culture from either the other jugular or a peripheral vein was obtained. Blood samples for CBC and IL-6 measurement were acquired on the day of admission (day 0) and the following two days (day 1 and 2) in case of survival. Whole blood anticoagulated with EDTA was used for a complete blood count in the automated analyzer Cell-Dyn® 3500 R (Abbott Diagnostics, Illinois, USA). The differential white blood cell count was performed on Wright-stained blood smears. For the measurement of IL-6, blood was collected in sodium citrate tubes (Sarstedt Monovette, Nuembrecht-Rommelsdorf, Germany) and centrifuged at 1570 g for 5 minutes. The supernatant plasma was aliquoted and stored at 70°C within 1 hour of collection until analyzed.

Assay for IL-6. The IL-6 activity in plasma was measured with the 7TD1 bioassay first described by J. Van Snick³⁸ and later modified by H. Pechumer³⁹ and K. Schneider⁴⁰. The bioactivity of canine IL-6 is expressed by its ability to stimulate

proliferation of the IL-6-dependent murine hybridoma cell line 7TD1 (kindly provided by J. Van Snick, Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium). Cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ in Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium with Glutamax (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Germany) containing 10% fetal bovine serum, 2% penicilline and streptomycine, 1 ng/ml rhuIL-6 and 0.55 mM 2-mercaptoethanol. For the assay, plasma samples were first diluted to 1:20 because our earlier measurements indicated toxicity of the canine plasma at higher concentrations which resulted in an inhibition of growth of the 7TD1 cells. A serial dilution was performed for each sample to a maximum of 1:2,560, and run in duplicates on a 96-well flat-bottomed microtiter plate (Nunc inc., Wiesbaden, Germany). The cells were then harvested and washed three times in PBS before resuspension in the same medium without IL-6, and adjusted to a density of 1×10^5 cells/ml. 100µl of the cell suspension was added to the diluted samples. For each assay, a standard curve was produced with human rIL-6 with serial twofold dilutions starting at 1 ng/ml. Medium without added IL-6 served as a negative control. Plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 4 days and proliferation was then measured using the XTT colorimetric assay⁴¹. XTT (Sigma, Taufkirchen, Germany) was diluted in RPMI 1640 medium to a final concentration of 1 mg/ml, and phenazine methosulfate was added to a final concentration of 0.025 mM. 50µl of the produced solution were applied to each well and the plates were further incubated at 37°C and 4% CO₂ for 4 hours. The plates were vigorously shaken in order to solubilize the formazan crystals formed. The optical density was measured using an ELISA reader (Tecan inc., Kirchheim, Germany) at 450 nm as test and 620 nm as reference wavelengths. The standard curve of recombinant human IL-6 was used to calculate a best-fit regression of the rising portion of the curve in the linear range. IL-6 activity of the plasma samples could then be determined by the equation for this best-fit line for each assay and expressed in pg/ml. To validate the IL-6 measurement, a control group of 12 client-owned clinically healthy dogs was selected. These dogs showed undetectable IL-6 values.

Data analysis. Associations between different variables were assessed by different statistical methods. In case of continuous and ordinal variables, respectively, the Bravais Pearson and Spearman rank correlation coefficient was computed. For binary variables the association was modelled by a logistic regression model. A Cox hazards-proportional regression model⁴² was used to

analyse the dependence between survival time and the measured levels of IL-6 on the day of admission.

The statistical software packages SPSS and R (SPSS 13.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, and R, The R Project for Statistical Computing, <http://www.r-project.org/>) were used to perform these evaluations.

Results

A total of 79 dogs were enrolled in the study, 43 patients with confirmed sepsis and 36 with SIRS. Most frequently represented breeds were Golden Retrievers (n = 7) and German Shepherd dogs (n = 6) as well as middle-sized mongrels (n = 6). Large breeds were overall overrepresented with a proportion of 61%. Weights ranged between 1.9 and 80.0 kg with a median weight of 30 kg. There were 44 male (56%) and 35 female (44%) dogs of which 10 male and 7 female were neutered (a ratio of 21% in comparison to the total number of dogs). Age at time of presentation varied between two months and 16 years, with a mean age of 7.8 years (median 9 years). Classification in age groups showed a larger fraction of older dogs (age > 5 years) 71% which fulfilled our criteria. Owners were asked for a history of pre-existing disease, which was affirmed in 34 dogs (43%), unknown in 15 (19%), no disease in 30 cases (38%). The distribution of the underlying diseases is itemized in table 1. Nine dogs had more than one disease. 27% of the dogs were reported to regularly receive medication.

The main reasons for presentation of the dogs in our clinics included gastrointestinal problems (82%), with symptoms commonly including anorexia, vomiting, and diarrhea. Non-specific signs (75%) such as weakness, polydipsia / polyuria, fever and pain were reported in 75% of cases, most dogs had symptoms of more than one group. Signs of illness were recognised by the owners for an average of 6.7 days (median 2 days, range one to 65 days) prior to admission to our clinic.

The mean hospitalisation time was 5.6 days (median five days, range one to 32 days). 43 dogs (54 %) met the criteria for sepsis as described above, whereas 36 patients (46%) were systemically ill without proof of infection (SIRS-group). The overall mortality rate was 48% (38 patients), of which 24 patients (63%) died within the first three days. 27 of these dogs were euthanized because of a fatal prognosis (71%), and 11 dogs died (29%). 16 (42%) of the non-survivors had a necropsy performed. Considering only the septic group, 20 patients survived (47%) and 23 died (53%). The distribution of mortality in the 3 different septic subgroups is specified in table 2. The most frequent clinical diagnoses are summarized and grouped in organ systems in table 3. Most dogs (53%) had more than one disease. The gastrointestinal system was most often affected (65%), followed by the cardiovascular (27%) and reproductive system (23%). Statistical correlation of each criterion for SIRS with mortality was tested. Only the

temperature on time of admission showed a significant correlation with mortality ($p=0.024$, proportional Odds-Ratio= $\exp(\beta)=0.618$): since our data for temperature below the reference range was, however, sparse, the practical use of this parameter is questionable.

The frequency of positive blood cultures in our study was 14%. 37 dogs (47%) of our study group were pre-treated with antibiotics by a practicing veterinarian, and 18 of these patients (49%) developed sepsis nevertheless with a number of four positive blood cultures on admission. An additional number of 62 samples from different localisations, e.g. urine, swab samples from wounds, abscesses or vaginal discharge, were either cultured or, in a few cases, cytologically screened for bacteria. From these samples, 74% were positive, and 7 dogs had positive results with the same bacteria from two separate samples (either blood culture and a separate sample or two samples from different locations). Distribution and species of bacteria are described in table 4. Species found in mixed infections are not further specified. The most common organism isolated was *Escherichia coli* (28%, 13 of 46 isolates). The overall distribution of infections shows a larger fraction of gram-negative bacteria. A positive result of the blood culture could not be correlated with a higher number of SIRS-criteria; correlation with mortality had a borderline value of $p=0.078$ ($\rho_{SP} = -0.128$).

Table 5 represents IL-6 in pg/ml in the four categories SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock as measured on day 1, 2 and 3.

An overview of the measurement of results of plasma Interleukin-6 activity is presented in figure 1. A visual inspection of the measurement of IL-6 on the day of admission showed two outliers and a skew distribution. This suggested a transformation of the variable to the log-scale: $\ln\text{-IL-6} = \ln(\text{“IL-6 day 0”} + 1)$. Therefore all further analyses were performed with the transformed variable.

Standard curves of seven different assays were combined to indicate the interassay variability and coefficient of variation was calculated to be 17%. The detectable limit of the bioassay was 1 pg/ml. During the collection of blood samples a variation in plasma color due to a higher amount of bilirubin was detected in some of the samples. This led to the question of whether or not a highly icteric plasma sample could affect the measurement of IL-6 with this viable cell based colorimetric bioassay. A highly icteric but non IL-6 containing sample was selected and mixed with human recombinant IL-6 to a final concentration of

1 ng/ml. The same was done with a non-icteric sample. This experiment showed that icteric plasma had no influence on assay performance.

Statistical analysis showed a moderate correlation between the measured level of IL-6 on the day of admission and the number of abnormal SIRS-criteria ($p = 0.015$, $\rho_{SP} = -0.274$). Examining a possible connection between each of the inclusion criteria and IL-6, a statistically significant correlation could only be found with the number of white blood cells on time of admission ($p = 0.002$, $\rho_{SP} = -0.340$). The WBC count was either lower than / or in the reference range in those cases with higher IL-6. Illustrating this with the help of a scatterplot (figure 2), the observed effect seems to be only weakly pronounced. A higher IL-6 level correlated significantly ($p = 0.006$, $\rho_{SP} = -0.308$) with severity of illness (SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock as defined groups). A logistic regression model using Sepsis or SIRS as binary response and \ln -IL-6 as covariate revealed a positive association ($p = 0.0222$; figure 3). A higher \ln -IL-6 is related to a higher proportion of sepsis and no SIRS (proportional Odds-Ratio= $\exp(\beta)$ =1.177). Figure 4 shows a logistic regression curve of mortality rate and \ln -IL-6 and demonstrates the association between higher plasma level of IL-6 on day of admission and higher probability for death. ($p=0.0549$, $OR=\exp(\beta)=1.1456$). Time of death was also significantly earlier, the higher the measured level of IL-6 on the day of admission was ($p = 0.012$, $\rho_{SP} = -0.404$).

To model the relationship between \ln -IL-6 and the survival time of the patients a Cox proportional-hazards regression was conducted. In order to deal with the many tied death times (18 event times on 76 dogs), Efron's approximation was chosen. This model detected a significant association ($p=0.025$) of \ln -IL-6 to the survival time. The calculated coefficient is the predicted proportional change in the hazard rate for a unit increase in \ln -IL-6.

Figure 5 shows the estimated survival function for the Cox regression. The curve describes the expected survival probabilities for a patient with a mean value of \ln -IL-6.

Discussion

As in human patients, SIRS and sepsis pose a major problem for patients and clinicians in small animal medicine. Of particular importance for optimal therapeutic interventions are the early diagnoses of the disease and the availability of parameters which qualify as prognostic markers. Studies in animal models and human patients have shown that the massive production of pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IL-1 and IL-6 is a hallmark of sepsis and of particular importance in the pathophysiology of the disease¹⁷⁻³⁷. Surprisingly little information is available regarding serum responses of cytokines in septic canine patients. In this study we investigated the IL-6 response in dogs diagnosed with sepsis based on established parameters and concluded that the plasma IL-6 response qualifies as an interesting laboratory marker in these patients.

We chose to analyse the plasma IL-6 response in our canine patients, since this parameter has been studied most intensively in human septic patients, was shown to be of prognostic value in several studies¹⁷⁻³² and can be measured by a well established bioassay³⁸⁻⁴⁰. In addition, the plasma IL-6 response to different inflammatory stimuli has been studied to some extent in canine sepsis models (summarized in table 6) providing the experimental basis for data analysis. From studies in human patients it appears that the plasma IL-6 concentration is both delayed and sustained in comparison to other cytokines and is therefore more easily detectable than for example TNF α , which shows peak activity early but vanishes within hours after induction²⁰. Comparable kinetics have been described in dogs which received fever-inducing doses of lipopolysaccharide where TNF α returned to baseline values within 6 hours after fever induction. In contrast, IL-6 values remained high for at least 7 hours and showed a clear dose-response³⁵, making this cytokine the preferable parameter. Unfortunately, no data are available from experimental models for IL-6 serum kinetics beyond the 7 hour values.

Patients were enrolled in this study if they fulfilled inclusion criteria previously established by de Laforcade⁴. Our general patient statistics were for the most part consistent with the limited veterinary literature available for naturally occurring sepsis cases^{4,7-9,16,43-46}. The mortality rate among our patients was in the higher range of the described rates of 31% to 50%⁴⁻⁹, which might be a consequence of many factors which could include the large number of pre-treated referred cases with severe disease and the suspected referral of many cases at a later stage than

in the US based studies, where primary accession emergency clinics are more common and hold a higher public profile. In the majority of our patients (54%) sepsis was confirmed through positive bacterial cultures in blood, urine, and vaginal discharge or tissue samples. The frequency of positive blood cultures was relatively low in comparison with other studies which reported positive results in 100%^{4,9}, 81%⁴⁶, 23%⁴⁷, 25%⁴³ and 49%⁷ of their patients. We explain this by the pre-treatment of a high percentage (47%) of our patients with antibiotics by the referring clinicians or during emergency service.

Higher IL-6 plasma levels on the day of admission were significantly correlated with a more severe degree of disease, increased mortality rates and earlier fatality. As summarized in table 5, some higher measurements in the SIRS-group may well be explained by missing confirmation of sepsis. A pneumonia as well as prostatic abscesses are surely of bacterial origin, and were probably causative of a sepsis but microbiologic cultivation was either not possible or negative. These results are in good agreement with observations made in human patients, where IL-6 has been proven to predict mortality¹⁷⁻³². However, the majority of the animals were euthanized rather than dying naturally. Even though this decision was made on clinical status and probability of survival, euthanasia is still an unavoidable source of considerable bias and may serve as a potential source of error.

We therefore conclude that routine analysis of plasma IL-6 levels may provide an important laboratory parameter in canine medicine and should be further investigated in detail. Several studies in humans have shown that IL-6 kinetics during the course of sepsis play a role in prognosis. Survivors were characterized by a fast reduction, whereas non-survivors had constantly high levels of IL-6^{17,19,21,24,31}. Measurement of IL-6 showed no detectable levels in some patients with sepsis (6 dogs) and severe sepsis (2 dogs, see table 5), which could be explained by cytokine kinetics. As confirmed by the experimental studies, peak levels of IL-6 are known to be detected after onset of the septic incident. These patients could have been sick for a longer time and IL-6 as main cytokine already been replaced. We did not perform kinetic studies in our patients as it was unclear if IL-6 would be of prognostic value at all. Interestingly, more detailed data analysis revealed that although elevated plasma IL-6 concentrations were found in both dogs with SIRS and sepsis, significantly higher levels were found in septic patients. Again, this has also been shown in human patients⁴⁹ and further supports

the hypothesis that the IL-6 response follows a highly conserved pattern in man and dogs. An interesting aspect for further studies could be the investigation of IL-6 levels in sick dogs with various illnesses, in contrast to those with sepsis.

In summary, our study establishes the basis for future work aimed at a better understanding of SIRS and sepsis in canine patients. Subsequent studies should further scrutinize both the value of plasma IL-6 quantification and IL-6 kinetics as a prognostic marker. A rapid test will have to be developed and evaluated in order to increase practicability; in fact, an ELISA canine IL-6 development kit is, unfortunately only after the conduction of this study, newly available (R&D Systems, Minneapolis, USA). This work could also help to establish the canine patient as a model for further research into the pathophysiology of SIRS and sepsis and the development and validation of new prognostic markers and therapeutic concepts.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Sonya Bettenay, BVSc (hons), MACVSc, Dipl. ECVD, for revising the manuscript and for correcting language errors.

References

1. Danai P, Martin GS. Epidemiology of sepsis: recent advances. *Curr Infect Dis Rep.* Sep 2005; 7(5):329-334.
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* Apr 17 2003; 348(16):1546-1554.
3. Otto CM. Sepsis. In: Wingfield WE, Raffe MR, eds. *The Veterinary ICU Book.* 1st ed. Jackson, WY: Teton NewMedia; 2002: 695-709.
4. de Laforcade AM, Freeman LM, Shaw SP, et al. Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *J Vet Intern Med.* Sep-Oct 2003; 17(5):674-679.
5. King LG, Wohl JS, Manning AM, et al. Evaluation of the survival prediction index as a model of risk stratification for clinical research in dogs admitted to intensive care units at four locations. *Am J Vet Res.* Jun 2001; 62(6):948-954.
6. King LG, Stevens MT, Ostro ENS, et al. A model for prediction of survival in critically ill dogs. *J Vet Emerg Crit Care.* 1994; 4(2): 85-99.
7. Dow SW, Curtis CR, Jones RL, et al. Bacterial culture of blood from critically ill dogs and cats: 100 cases (1985-1987). *J Am Vet Med Assoc.* Jul 1 1989;195(1):113-117.
8. Lanz OI, Ellison GW, Bellah JR, et al. Surgical treatment of septic peritonitis without abdominal drainage in 28 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* Jan-Feb 2001; 37(1):87-92.
9. Hardie EM, Rawlings CA, Calvert CA. Severe sepsis in selected small animal surgical patients. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1986; 22(1): 33-41.
10. Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. *Lancet.* May 16 1998;351(9114):1501-1505.
11. Tjardes T, Neugebauer E. Sepsis research in the next millennium: concentrate on the software rather than the hardware. *Shock.* Jan 2002;17(1):1-8.
12. Weigand MA, Horner C, Bardenheuer HJ, et al. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* Sep 2004;18(3):455-475.
13. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med.* May 2003;9(5):517-524.

14. Hopper KB, Shane. An updated view of hemostasis: mechanisms of hemostatic dysfunction associated with sepsis. *J Vet Emerg Crit Care*. 2005;15(2):83-91.
15. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*. Jun 1992;101(6):1481-1483.
16. Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB. Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Vet Surg*. Sep-Oct 1997;26(5):393-397.
17. Oda S, Hirasawa H, Shiga H, et al. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine*. Feb 21 2005;29(4):169-175.
18. Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*. Oct 1989;74(5):1704-1710.
19. Sullivan JS, Kilpatrick L, Costarino AT, Jr., et al. Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis. *J Pediatr*. Apr 1992;120(4 Pt 1):510-515.
20. Moscovitz H, Shofer F, Mignott H, et al. Plasma cytokine determinations in emergency department patients as a predictor of bacteremia and infectious disease severity. *Crit Care Med*. Jul 1994;22(7):1102-1107.
21. Goldie AS, Fearon KC, Ross JA, et al. Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention Group. *JAMA*. Jul 12 1995;274(2):172-177.
22. Damas P, Ledoux D, Nys M, et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg*. Apr 1992;215(4):356-362.
23. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*. Oct 15 1993;119(8):771-778.
24. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, et al. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*. Feb 1993;103(2):565-575.
25. Calandra T, Gerain J, Heumann D, et al. High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *Am J Med*. Jul 1991;91(1):23-29.

26. Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, et al. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock*. Jun 2005;23(6):488-493.
27. Kinasewitz GT, Yan SB, Basson B, et al. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism [ISRCTN74215569]. *Crit Care*. Apr 2004;8(2):R82-90.
28. Riche FC, Cholley BP, Panis YH, et al. Inflammatory cytokine response in patients with septic shock secondary to generalized peritonitis. *Crit Care Med*. Feb 2000;28(2):433-437.
29. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med*. Jan 1 1989;169(1):333-338.
30. Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE, et al. Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit Care Med*. Nov 2004;32(11):2173-2182.
31. Spittler A, Razenberger M, Kupper H, et al. Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. *Clin Infect Dis*. Dec 2000;31(6):1338-1342.
32. Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, et al. Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit Care Med*. Jan 2005;33(1):89-97; discussion 242-243.
33. Coran AG, Drongowski RA, Paik JJ, et al. Ibuprofen intervention in canine septic shock: reduction of pathophysiology without decreased cytokines. *J Surg Res*. Sep 1992;53(3):272-279.
34. Miyamoto T, Fujinaga T, Yamashita K, et al. Changes of serum cytokine activities and other parameters in dogs with experimentally induced endotoxic shock. *Jpn J Vet Res*. Aug 1996;44(2):107-118.
35. LeMay DR, LeMay LG, Kluger MJ, et al. Plasma profiles of IL-6 and TNF with fever-inducing doses of lipopolysaccharide in dogs. *Am J Physiol*. Jul 1990;259(1 Pt 2):R126-132.

36. Yamashita K, Fujinaga T, Hagio M, et al. Bioassay for interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-like activities in canine sera. *J Vet Med Sci.* Feb 1994;56(1):103-107.
37. Yamashita K, Fujinaga T, Miyamoto T, et al. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J Vet Med Sci.* Jun 1994;56(3):487-492.
38. Van Snick J, Cayphas S, Vink A, et al. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1986;83(24):9679-9683.
39. Pechumer H, Leinisch E, Bender-Gotze C, et al. Recovery of monocytes after bone marrow transplantation--rapid reappearance of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production. *Transplantation.* Oct 1991;52(4):698-704.
40. Schneider K, Klaas R, Kaspers B, et al. Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *Eur J Biochem.* Aug 2001;268(15):4200-4206.
41. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* Sep 1 1988;48(17):4827-4833.
42. Fox, John. Cox Proportional-Hazards Regression for Survival Data, Appendix to An R and S-PLUS Companion to Applied Regression, Available as <http://cran.r-project.org/doc/contrib/Fox-Companion/appendix-cox-regression.pdf>, Feb 2002.
43. Calvert CA, Greene CE. Bacteremia in dogs: diagnosis, treatment, and prognosis. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1986; 8(3): 179-186. 1986.
44. Hosgood G, Salisbury SK. Generalized peritonitis in dogs: 50 cases (1975-1986). *J Am Vet Med Assoc.* Dec 1 1988;193(11):1448-1450.
45. King LG. Postoperative complications and prognostic indicators in dogs and cats with septic peritonitis: 23 cases (1989-1992). *J Am Vet Med Assoc.* Feb 1 1994;204(3):407-414.
46. Calvert CA. Valvular bacterial endocarditis in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* May 1 1982;180(9):1080-1084.
47. Hirsh DC, Jang SS, Biberstein EL. Blood culture of the canine patient. *J Am Vet Med Assoc.* Jan 15 1984;184(2):175-178.

48. Okano S, Yoshida M, Fukushima U, et al. Usefulness of systemic inflammatory response syndrome criteria as an index for prognosis judgement. *Vet Rec.* Feb 23 2002;150(8):245-246.
49. Selberg O, Hecker H, Martin M, et al. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med.* Aug 2000;28(8):2793-2798.

Tables and Figures

Table 1: Distribution of owner-reported pre-existing diseases in 34 of the 79 dogs. 9 dogs were reported to have more than one complaint. 30 dogs were said to have no illnesses before study entry; in 15 dogs no information was available.

Pre-existing diseases (absolute number)	%
Musculoskeletal (15)	44%
Cardiovascular (9)	26%
Neoplasia (5)	15%
Dermatologic disease (5)	15%
Nervous system (4)	12%
Endocrine (2)	6%
Ocular (1)	3%
Immune mediated disease (1)	3%
Others: infections (2), recurrent fever (1), undefined (2)	15%

Table 2: Distribution of mortality in subgroups. 38 of 79 patients died overall (48%), of which 24 patients (63%) died within the first three days. The survivors (defined as discharged from the clinic) were 41 dogs (51%).

	SIRS without confirmed sepsis		SIRS with confirmed sepsis					
	SIRS	%	Sepsis	%	Severe Sepsis	%	Septic Shock	%
Survivors	21	58	15	75	5	24	0	0
Non-survivors	15	42	5	25	16	76	2	100
Total	36	100	20	100	21	100	2	100

Table 3: The most frequent final clinical and pathological diagnoses. Most dogs (53%) had more than one disease. Some could not be further specified due to diagnostic limits set by the owner, such as hepatopathy or neoplasia of the spleen. A necropsy for establishing a definitive diagnosis was only available in 16 of the dogs.

System affected	Total number of cases (n)	%	Clinical and pathological diagnoses
Gastrointestinal	51	65	Intestinal or gastric perforation (6), pancreatitis (5), parvovirus (4), gastrointestinal foreign body (3)
Reproductive	19	24	Pyometra (10), prostatic abscess (6)
Skin	11	14	Phlegmon (5), abscesses (3)
Respiratory	11	14	Pneumonia (9), necrotising pulmonary carcinoma (1), pulmonary hemorrhage (1)

Table 4: Isolated organisms divided in origin and Gram staining. Mixed infections include two or more species found in the same sample and are not separately listed.

	Blood culture	Respiratory system	Reproductive System	Urinary System	Wound Swab	Abscess	Gastrointestinal System
Grampositive: Total number 14 (30%)							
Staphylococcus sp. (Epidermidis-group)	1						
Staphylococcus sp. (Staph. intermedius)			1		1		
Staphylococcus sp.(β -hemolysing Staph. intermedius)	1				2	1	
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)	1						
Streptococcus canis			1		1		
Streptococcus sp. (β -hemolysing Strep.)						1	
Streptococcus sp. (α -hemolysing Strep.)		1					
Cocoid (unspecified)			1		1		
Gramnegative: Total number 19 (41%)							
Escherichia coli	4	1	6	2			
Salmonella enterica ssp. enterica Group B (S. typhimurium)	1						
Acinetobacter baumannii	1				1		
Prevotella sp.						1	
Klebsiella sp.			1				
Proteus mirabilis				1			
Mixed Infection: Total number 13 (28%)		2	1	1	6	1	2

Table 5: IL-6 in pg/ml in the four categories SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock as measured on day 1, 2 and 3. Outcome and main diagnoses are added. Blanks represent missing blood samples, either due to death of patient, or, in some cases, clinical reasons e.g. anaemia.

Category	IL-6			Survival	Diagnosis
	Day 1	Day 2	Day 3		
SIRS	19,192.17			Nonsurvivor	Pneumonia
SIRS	7,204.15	5,788.06	2,261.17	Nonsurvivor	Uroabdomen, Peritonitis
SIRS	6,837.45	605.76	0	Survivor	Prostatic abscess
SIRS	2,235.25	0		Survivor	Hemorrhagic gastroenteritis
SIRS	1,151.86	53.24	0	Survivor	Prostatic abscess
SIRS	1,069.49	2,048.13	504.99	Survivor	Parvovirosis
SIRS	925.35			Nonsurvivor	Fever of Unknown Origin
SIRS	711.95			Nonsurvivor	Renal insufficiency
SIRS	668.45	4436.32	583.37	Nonsurvivor	Pancreatitis
SIRS	660.91			Nonsurvivor	Foreign body, Giardiasis
SIRS	653.37			Nonsurvivor	Heart failure
SIRS	616.21	305.2	335.37	Nonsurvivor	Splenic neoplasia
SIRS	537.31	1174.84		Nonsurvivor	Pneumonia
SIRS	486.23	0	0	Survivor	Mesenteric infarct
SIRS	448.49			Nonsurvivor	Heart failure
SIRS	404.98	108.51	353.1	Survivor	Gall bladder rupture, Peritonitis
SIRS	348.78	0	0	Survivor	Parvovirosis
SIRS	295.64	0	0	Survivor	Pyelonephritis
SIRS	246.01	0	168.35	Nonsurvivor	Pancreatitis
SIRS	202.46	0	0	Survivor	Fever of Unknown Origin
SIRS	113.9	0	0	Survivor	Phlegmon
SIRS	0	0	0	Survivor	Hemometra
SIRS	0			Survivor	Fever of Unknown Origin
SIRS	0	0	0	Survivor	Parvovirosis

Category	IL-6			Survival	Diagnosis
	Day 1	Day 2	Day 3		
SIRS	0	681.71	467.74	Survivor	Aspiration pneumonia
SIRS	0			Nonsurvivor	Lymphosarcoma
SIRS	0	0	0	Survivor	Gastric bleeding
SIRS	0			Nonsurvivor	Gastric ulceration
SIRS	0	0	0	Survivor	Gastric bleeding
SIRS	0	0	0	Survivor	Discospondylitis, Myositis
SIRS	0	0	0	Survivor	Foreign body
SIRS	0	0		Nonsurvivor	Heart failure, Pancreatitis
SIRS	0	0	0	Survivor	Steroid-responsive meningoencephalitis
SIRS	0	0	0	Nonsurvivor	Phlegmon
SIRS	0	953.3		Survivor	Juvenile cellulitis
SIRS	0	0	9,495.83	Survivor	Heat stroke
Sepsis	2,723.08	0	0	Survivor	Pyometra
Sepsis	2,339.49			Nonsurvivor	Pyometra
Sepsis	1,190.51	79.5	0	Survivor	Mastitis
Sepsis	953.99	0	0	Survivor	Pyometra
Sepsis	918.36	358.78	0	Survivor	Perianal abscess
Sepsis	805.94	2,578.55	0	Survivor	Prostatic abscess
Sepsis	582.38			Nonsurvivor	Volvolus
Sepsis	543.65	103.33	0	Survivor	Necrotising tonsillitis
Sepsis	536.13	344.08	199.6	Survivor	Intraarticular empyema, Discospondylitis
Sepsis	457.53	0	133.4	Survivor	Pyometra
Sepsis	452.05	0	0	Survivor	Abscess neck
Sepsis	428.79	18.61	0	Survivor	Foreign body with intestinal perforation
Sepsis	370.37	191.07	0	Survivor	Pyometra
Sepsis	91.31	184.11	2.12	Nonsurvivor	Lymphosarcoma with intestinal perforation, Peritonitis

Category	IL-6			Survival	Diagnosis
	Day 1	Day 2	Day 3		
Sepsis	0	54.31	0	Survivor	Fever of Unknown Origin
Sepsis	0	0	0	Nonsurvivor	Salmonellosis
Sepsis	0			Survivor	Foreign body, Cystitis
Sepsis	0	0		Survivor	Limb abscess
Sepsis	0	0	0	Survivor	Pyometra
Sepsis	0	0		Nonsurvivor	Necrotising pulmonary carcinoma
Severe Sepsis	46,404.70	644.88	109.28	Nonsurvivor	Pyometra
Severe Sepsis	12,403.21			Nonsurvivor	Gastric perforation, Peritonitis
Severe Sepsis	4,816.84	4,265.44		Nonsurvivor	Aspiration pneumonia
Severe Sepsis	4,320.72	3,909.02	314.87	Survivor	Prostatic abscess, Peritonitis
Severe Sepsis	3,919.75			Nonsurvivor	Intestinal perforation, Peritonitis
Severe Sepsis	3,025.77	4,2911.9		Nonsurvivor	Pulmonary hemorrhage
Severe Sepsis	3,016.39	2,342.14	1,213.61	Nonsurvivor	Parvovirosis
Severe Sepsis	2,215.03	0	0	Survivor	Pneumonia
Severe Sepsis	1,940.25	7,155.85	0	Nonsurvivor	Aspiration pneumonia, Pyodermatitis
Severe Sepsis	710.35	61.64	0	Survivor	Pyometra
Severe Sepsis	593.75	1,402.49	297.99	Nonsurvivor	Intestinal bleeding, Maggot infestation
Severe Sepsis	429.79	437.73		Nonsurvivor	Phlegmon

Category	IL-6			Survival	Diagnosis
	Day 1	Day 2	Day 3		
Severe Sepsis	354.21	89.41	65.38	Nonsurvivor	Prostatic abscess
Severe Sepsis	349.05	0	32.22	Nonsurvivor	Aspiration pneumonia
Severe Sepsis	348.18	0	0	Survivor	Pyometra
Severe Sepsis	302.32	301.33	183.22	Nonsurvivor	Peritonitis, Protein-Losing Enteropathy
Severe Sepsis	190.88	0		Survivor	Foreign body with intestinal perforation, Peritonitis
Severe Sepsis	100.77	133.49	0	Nonsurvivor	Pyometra
Severe Sepsis	60.2	106.01	608.56	Nonsurvivor	Foreign body with intestinal perforation, Peritonitis
Severe Sepsis	0	0	0	Nonsurvivor	Intraabdominal abscess, Peritonitis
Severe Sepsis	0			Nonsurvivor	Prostatic abscess
Septic shock	127,471.2			Nonsurvivor	Aspiration pneumonia
Septic shock	4,240.33			Nonsurvivor	Phlegmon

Figure 1: Boxplots of measurement of IL-6 divided in subgroups SIRS and sepsis during day 0 to 2. Kinetics of plasma IL-6 is evident as a return to baseline levels that can be seen on day 2.

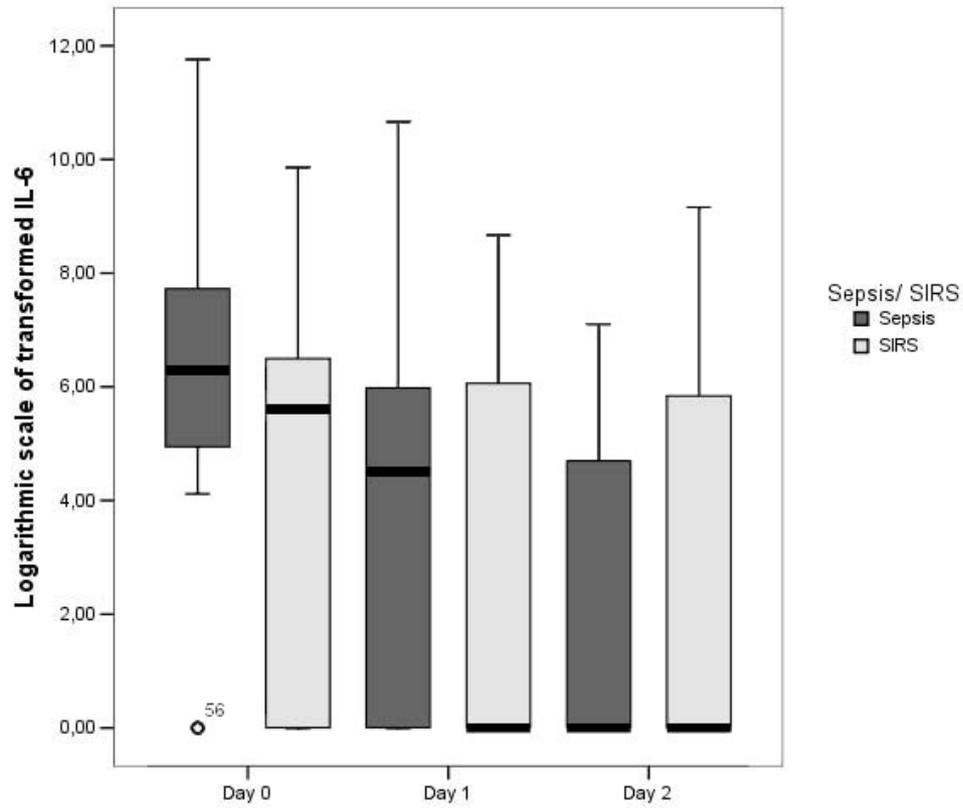


Figure 2: Scatterplot: correlation between IL-6 and white blood cell count on day of admission. Lines are drawn at 16 G/l and 6 G/l to show the reference range for leukocyte count. However, the observed effect seems to be only weakly pronounced.

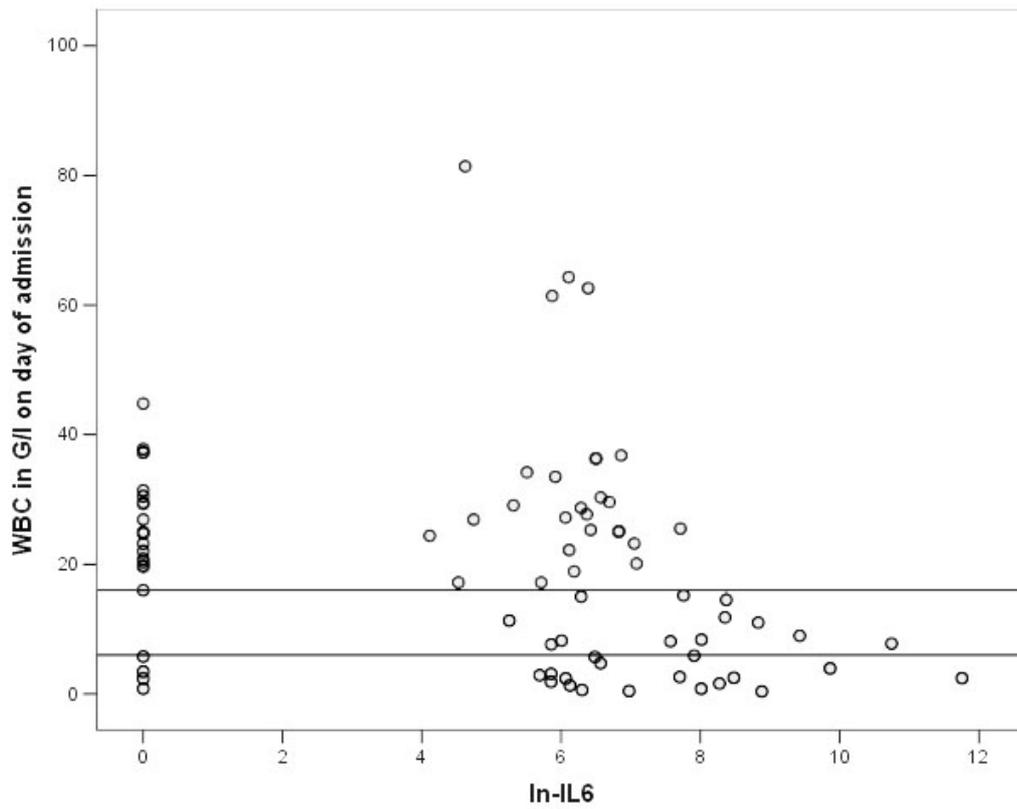


Figure 3: Logistic regression curve of probability for sepsis and ln-IL-6. “1” (100%) is defined as the event “sepsis”, “0” as “no sepsis”, e.g. SIRS. A higher ln-IL-6 is related to a higher proportion of sepsis and no SIRS.

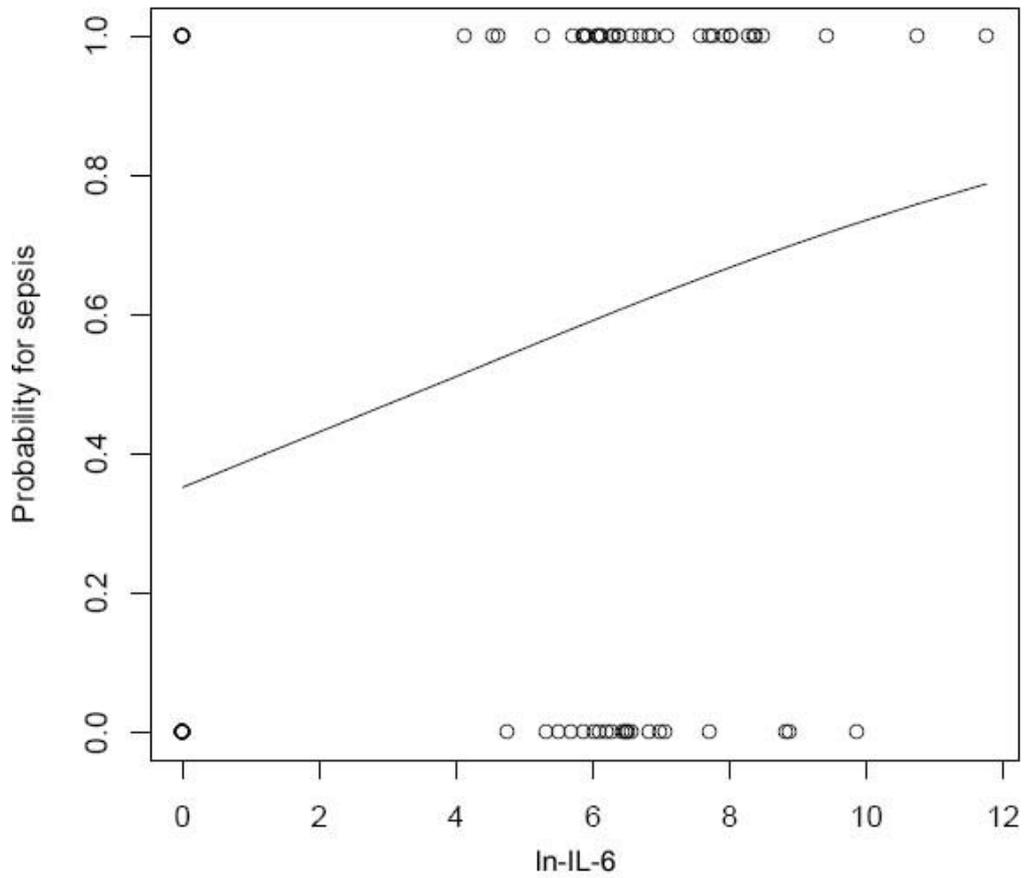


Figure 4: Logistic regression curve of mortality rate and ln-IL-6. A higher plasma IL-6 on day of admission is correlated with a higher probability for death.

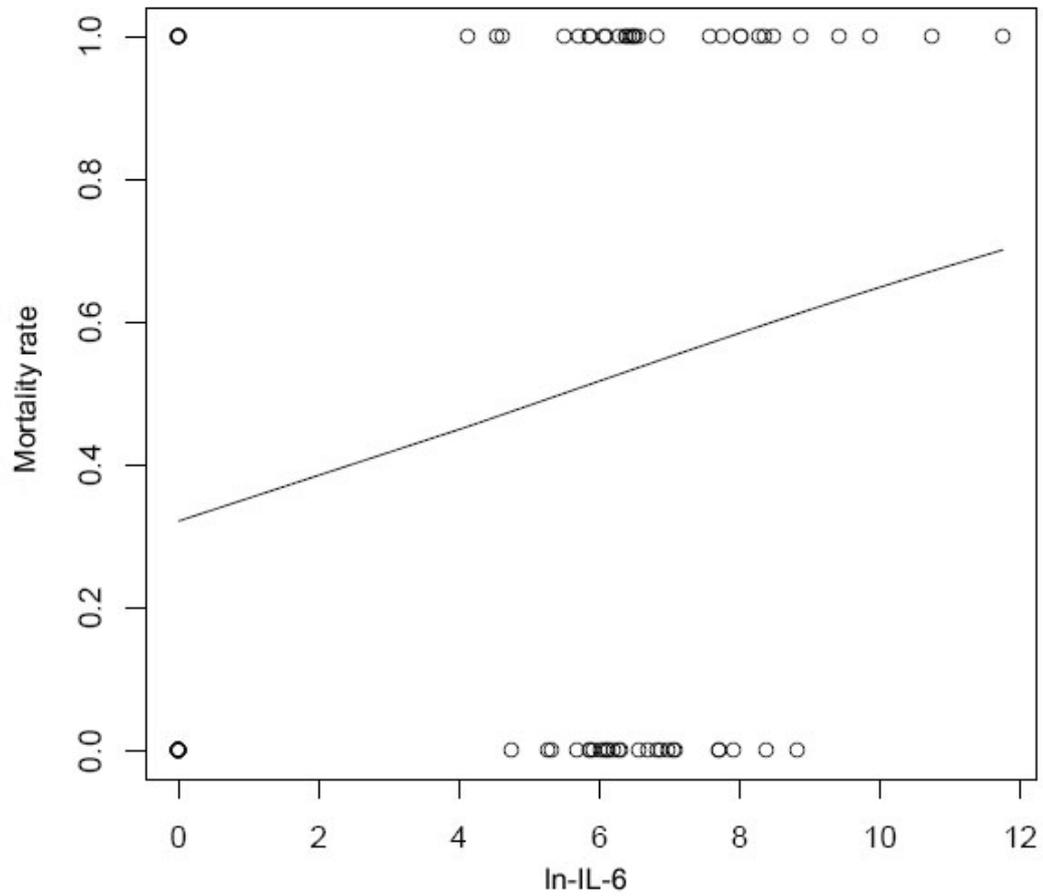


Figure 5: Survival function for a Cox proportional-hazards regression. The curve describes the expected survival probabilities for a patient with a mean value of ln-IL-6.

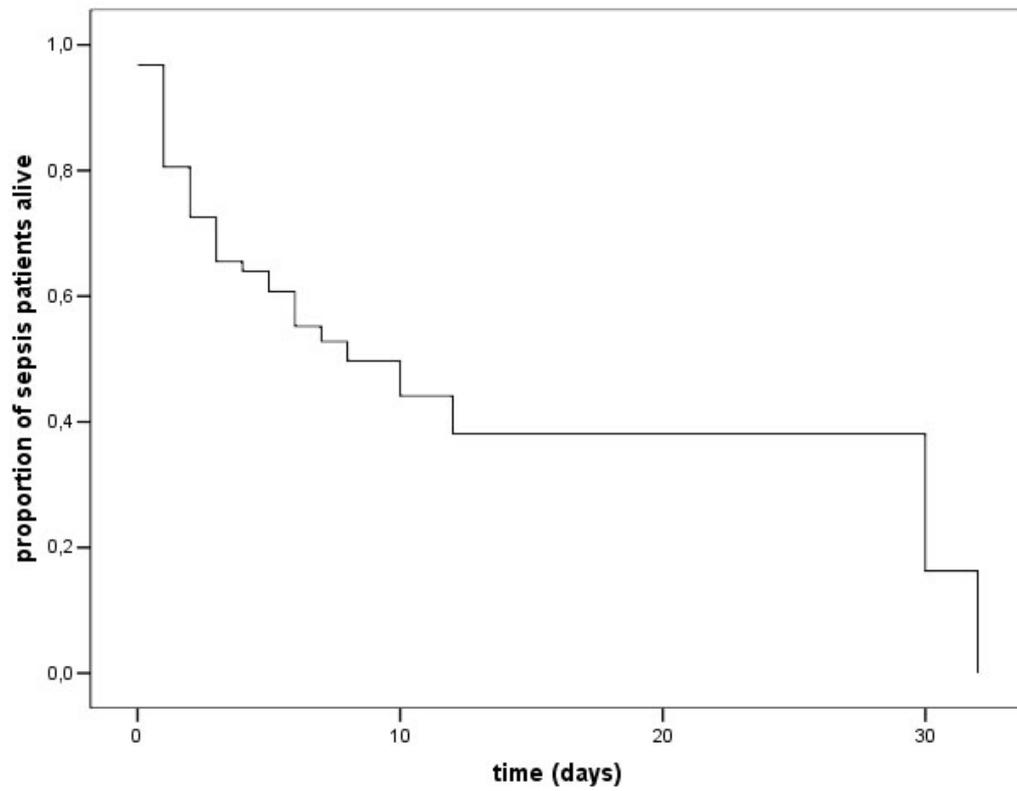


Table 6: Comparison of IL-6 measurement in dogs after experimentally induced sepsis. Full titles of papers can be found in the references list. Methods of measurement and cells used varied, as well as the chosen denomination of plasma levels. *One unit (U) was defined to equal the amount that caused half-maximal proliferation in the standard curve.

Author and Title of Paper	Method of inducing Inflammation	Measured Levels of IL-6	Measured Point of max. Level	Method for Measurement of IL-6
Yamashita: Canine Acute Phase Response... ³⁷	1 ml Turpentine oil i.m.	148.9 +/- 55,5 U*/ml	12 Hours	Bioassay with MH60.BSF2 (murine hybridoma clone)
Coran: Ibuprofen Intervention in Canine Septic Shock... ³³	10 ⁹ Organisms/kg live E.coli (B15:0125) i.v. over 10 min	110 000 pg/ml	Last Measurement after 180 min	Bioassay with B9
Miyamoto: Changes of Serum Cytokine Activities... ³⁴	500 µg/kg LPS (E.coli O55:B5) i.v.	1.6 Optical Density at 540 nm	2 Hours	Bioassay with MH60.BSF2 (murine hybridoma clone)
LeMay: Plasma Profiles of IL-6 and TNF... ³⁵	40, 10, 1 µg/kg LPS (E.coli O111:B4) i.v.	over 1 000 000 U/ml with highest dose	2 Hours	Bioassay with B9
Yamashita: Bioassay for Interleukin-1, Interleukin-6... ³⁶	1 ml Turpentine oil i.m./ 40 µg/kg LPS (E.coli O55:B5)	17 545.5 +/- 5 545.5 cpm	2 Hours	Bioassay with MH60.BSF2 (murine hybridoma clone)

IV Diskussion

IV.1 Aufbau der Studie

Für die vorliegende Arbeit wurden im Zeitraum von Juli 2004 bis Juli 2005 prospektiv alle Hunde eingeschlossen, die in den Kleintierkliniken der Universität München und der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der freien Universität Berlin zur Untersuchung vorgestellt wurden und bei denen der Verdacht auf eine Sepsis bestand sowie für diagnostische Zwecke Blut entnommen wurde. Bedingung für die Aufnahme in die Studie war die Erfüllung zweier oder mehr der SIRS-Kriterien, die nach DE LAFORCADE und Mitarbeiter (2003) formuliert wurden. Am Tag der Aufnahme wurde, wenn möglich, vor der antibiotischen Behandlung Blut aus der zentralen Halsvene für eine Blutkultur, aus den peripheren Beinvenen für ein großes Blutbild sowie eine klinisch-chemische Blutanalyse und weitere Untersuchungen abgenommen. Das Plasma wurde mit Zitrat gerinnungsgehemmt, abzentrifugiert und innerhalb zwei Stunden bei -70°C eingefroren. Weitere Abnahmen erfolgten an Tag 1 und Tag 2. Vom Bereich eines klinisch vermuteten Infektionsherdes wurden, sofern möglich, zusätzliche Tupferproben abgenommen oder bakterielle Kulturen angelegt. Die klinische Untersuchung wurde hauptsächlich durch den jeweiligen Doktoranden der Universitäten München und Berlin vorgenommen, jedoch wurden vereinzelt im Nachtdienst Proben entnommen und die Ergebnisse der klinischen Untersuchung des jeweiligen Tierarztes übernommen. Die Behandlung und Therapie der Patienten war nicht standardisiert und wurde nach der jeweiligen Entscheidung der betreuenden Tierärzte der verschiedenen Kliniken eingeleitet.

Parallel zum Sammeln der Proben wurden die benötigten Zellen für den Bioassay kultiviert und vorbereitet. Die Messung der Plasma-Interleukin-6-Konzentration erfolgte im Ganzen nach dem abgeschlossenen Sammeln der Patientenproben. Proben aus Berlin wurden mit Hilfe von Trockeneis nach München gesandt und dort im Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Ludwig-Maximilians-Universität gemessen.

Ein großer Vorteil im Aufbau der Studie liegt in der Kooperation mit einer anderen Klinik und dadurch einem zusätzlichen Gewinn neuer Patienten als auch einem geringeren Zeitaufwand. Dieser Vorteil stellt natürlich auch einen Nachteil dar, da so die Beurteilung und klinische Einschätzung bei mehreren Personen

ruht. Subjektive Merkmale können so unterschiedlich eingeschätzt werden. Die Definition eindeutiger Kriterien für die Aufnahme und uniforme Einteilung in Schweregrade hilft, die Studie zu objektivieren. Die Messung der Plasma-IL-6-Konzentration und das Handling der Zellkulturen oblagen der gleichen Person, so dass hier mögliche Fehler, z.B. in der Einschätzung des Zellwachstums, nur einer individuellen Variation unterliegen.

IV.2 Patientendaten

IV.2.1 Allgemeine Daten

Die allgemeine deskriptive Patientenstatistik gleicht den Ergebnissen der wenigen verfügbaren Literatur über natürlich infizierte Sepsispatienten in der Veterinärmedizin.

Gewichtsangaben bei septischen Patienten lagen in der Literatur bei einem Median von 23 bis 32 kg (CALVERT & GREENE, 1986; KING, 1994). Dies deckt sich mit dem Ergebnis unserer Studie mit einem Median von 30 kg. Diese Gewichtsangaben deuten natürlich auf einen höheren Anteil größerer und damit schwererer Hunderassen hin; die großen Hunderassen waren in der vorliegenden Arbeit mit 61 % tatsächlich überrepräsentiert. Ein Vergleich mit der gesamten Patientenpopulation der Klinik liegt leider nicht vor, jedoch ist aufgrund der Gewichtsangaben anderer Studien der Medizinischen Kleintierklinik auch von größeren Rassen auszugehen. In unserem Patientengut waren der Golden Retriever mit 7 Tieren und der Deutsche Schäferhund mit 6 Tieren am häufigsten vertreten. Auch DE LAFORCADE und Mitarbeiter berichten vom Labrador, Deutschen Schäferhund und dem Golden Retriever als häufigste Hunderasse in ihrer Studie. Diese Rassen sind auch in einer weiteren Studie nach den Mischlingen am häufigsten vertreten (KING, 1994). Eine Aussage hinsichtlich der Bedeutung dieser Befunde zu treffen ist naturgemäß schwer, da eine erhöhte Beliebtheit dieser Rassen als Familienhunde auch eine Erhöhung in der Patientenstatistik bedeutet. Klinisch lassen sich keine Gründe für eine vermehrte Anfälligkeit hinsichtlich einer Sepsis ableiten.

CALVERT und GREENE, HARDIE und Mitarbeiter, sowie HOSGOOD und SALISBURY fanden in ihren Studien ein mittleres Alter von 5 bis 5,7 Jahren bei Hunden mit einer Bakteriämie heraus, während DE LAFORCADE, KING, LANZ

und Mitarbeiter ein geringfügig höheres Alter im Bereich von 6,02 bis 6,75 Jahren ansetzten. In unserer Studie kalkulierten wir ein mittleres Alter von 7,8 Jahren, und der Anteil an Hunden > 5 Jahre war deutlich höher als der < 5 Jahren (71 %).

IV.2.2 Prädisponierende Faktoren

Das beschriebene höhere Alter der betroffenen Tiere gehört zu bekannten Faktoren, die eine Sepsis begünstigen. HARDIE und Mitarbeiter verbinden dies mit einer verringerten Fähigkeit, einer Infektion zu widerstehen und vermuten als Grund ein geschwächtes Immunsystem.

Weitere Faktoren sind eine schlechte Ernährung, Dehydratation, intravenöse Katheter oder andere Arten von Kathetern, die Gabe immunsuppressiver Medikamente oder das Vorliegen einer immunsuppressiven oder sonstigen schwerwiegenden Erkrankung sowie vorausgegangene Operationen (MCANULTY, 1982; HARDIE & RAWLINGS, 1983b; HARDIE et al., 1986; CALVERT et al., 1985; CALVERT & GREENE, 1986; BRADY & KING, 2000; BRADY & OTTO, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Befragung des Besitzers bei den erkrankten Hunden ein Anteil von 43 % mit einer Vorerkrankung festgestellt werden. Die Werte bei den Septikern und an SIRS erkrankten Hunden differieren nicht stark (49 % versus 36 %). Nur 37 % der Nicht-Überlebenden hatten vorberichtlich eine Grunderkrankung (32 % keine, 32 % nicht bekannt). Eine Vorerkrankung scheint also in dieser Studie keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer Sepsis oder auf die Mortalität zu haben. Der Ernährungszustand konnte hier ebenfalls nicht als Faktor identifiziert werden: nur jeweils 3 Hunde der Gruppen Sepsis/SIRS oder im Vergleich auch jeweils 3 Überlebende/Nicht-Überlebende waren unterdurchschnittlich gut ernährt. Venenkatheter wurden im Zuge des Klinikaufenthalts gelegt, hatten jedoch aufgrund einer bereits vorhandenen Sepsis für deren Entstehung keine Bedeutung. Die Gabe immunsuppressiver Medikamente wurde nicht explizit erfragt, dies hätte bei jedem Sepsis-verdächtigen Tier erfolgen sollen und kann nun retrospektiv nicht mehr nachgeholt werden.

IV.2.3 SIRS-Kriterien

Abbildung 5 zeigt Median und Minimal- /Maximalwerte der einzelnen Gruppen. Hierbei wird deutlich, dass die einzelnen Gruppen ähnliche Werte besitzen und somit rein von den SIRS-Kriterien her nicht zu unterscheiden sind. Dies verdeutlicht wieder die frühe Notwendigkeit einer Schweregradeinteilung bzw. Erkennung einer manifesten Sepsis, um gezielte Therapiemaßnahmen einleiten zu können.

Abbildung 5: Durchschnittliche Werte der SIRS-Kriterien bei Patienten mit SIRS oder Sepsis, bzw. bei Überlebenden oder Nicht-Überlebenden

Einschlusskriterium	Sepsis (n = 43)		SIRS (n = 36)	
	Median	Min - Max	Median	Min - Max
Temperatur (°C)	39,8	35,8 - 41,5	39,6	36,5 - 41,0
Herzfrequenz (Schläge/min)	140	80 - 200	140	80 - 240
Atemfrequenz (Atemzüge/min)	48	20 - 200	45	16 - 200
WBC (/µl)	17200	604 - 62600	24000	382 - 64300
Stabkernige (%)	5	0 - 70	2	0 - 80

Einschlusskriterium	Überlebende (n = 20)		Nicht-Überlebende (n = 23)	
	Median	Min - Max	Median	Min - Max
Temperatur (°C)	40,0	38,3 - 41,5	39,6	35,8 - 41,3
Herzfrequenz (Schläge/min)	142	80 - 200	132	80 - 190
Atemfrequenz (Atemzüge/min)	66	20 - 200	44	20 - 200
WBC (/µl)	21450	604 - 37300	15200	811 - 62600
Stabkernige (%)	4	0 - 21	5	1 - 70

IV.2.4 Klinische und pathologische Diagnosen

Wenn auch bei einigen der Patienten der Infektionsherd eindeutig zu bestimmen war, so ist er doch bei manchen anderen nicht klar zu erkennen. Oft ist der ursprüngliche Eintrittsort nicht mehr identifizierbar, und selbst eine Sektion mit histopathologische Untersuchung ergibt keine neuen Ergebnisse. In Abbildung 6 werden die klinischen und pathologischen Diagnosen nach Organsystemen gruppiert zusammengefasst.

Abbildung 6: Klinische und pathologische Diagnosen der Patientenpopulation, zusammengefasst nach Organsystemen

Betroffenes Organsystem	Anzahl der Fälle	%	Diagnostizierte Erkrankung
Gastrointestinaltrakt	28	35%	Darmperforation und Peritonitis (5), Parvovirose (4), Pankreatitis (4), Magenblutung (2°), PLE mit Peritonitis (1), intraabdominaler Abszess mit Peritonitis* (1), Magenperforation mit Peritonitis (1), Volvulus (1), Rupturierte Harnblase mit Peritonitis (1), nekrotisierende Tonsillitis (1), Salmonellose (1), Gallenblasenruptur mit Peritonitis (1), Mesenterialinfarkt (1), Magenulcus (1), Giardienbefall (1), Fremdkörper (1), Madenbefall und Meläna(1)
Reproduktionsorgane	18	23%	Pyometra (10), Mastitis (1), Prostataabszess (6), Hämometra (1)
Respirationstrakt	8	10%	Pneumonie (7), Pneumonie mit Pankreatitis, Pyodermie, Pannikulitis und Steatitis (1)
Haut	7	9%	Abszess (3), Phlegmone (3), juvenile Cellulitis (1)
Verschiedenes	6	8%	Fieber unklarer Genese (5), Hitzschlag (1)
Bewegungsapparat	3	4%	Gelenkempyem mit Diskospondylitis und Phlegmone (1), Diskospondylitis mit Myositis (1), offene Femurfraktur (1)
Neoplasie	3	4%	Milztumor (1), nekrotisierende Lungenkarzinome (1)
Keine Ursache erkennbar	3	4%	Niereninsuffizienz (1), Herzinsuffizienz mit Thoraxerguss (1), intraabdominale Lymphadenopathie mit Herzinsuffizienz (1)
Harntrakt	2	3%	Pyelonephritis (1), Cystitis [#] (1)
Nervensystem	1	1%	Steroid-responsive Meningitis-Arteriitis (1)

79 100%

°eine mit Tarsitis
 *plus Pneumonie
 #plus Fremdkörper

Hier ist natürlich schwierig zu entscheiden, welche Erkrankung ein Zufallsbefund oder sekundäre Erscheinung darstellt, und welche den Infektionsherd an sich darstellt. So ist ein Fliegenmadenbefall sicherlich sekundär zu einer primären Erkrankung, zum Beispiel Durchfall, zu sehen, kann aber ohne vorherige Sepsis durch bakterielle Infektion, Schädigung der Schleimhaut und Wundbildung zu einer solchen führen.

Der Hauptanteil der Diagnosen und damit der am häufigsten auftretende Infektionsherd stellt der Gastrointestinaltrakt dar. Auch DE LAFORCADE und Mitarbeiter finden in einer prospektiven Studie bei Hunden mit Sepsis als größten Anteil abdominale Herde. Zu seinen häufigsten Diagnosen gehören intestinale Perforationen mit konsekutiver septischer Peritonitis; auch in der vorliegenden Studie ist dies eine häufige Diagnose. Als zweithäufigstes betroffenes Organsystem werden von DE LAFORCADE und Mitarbeiter ebenfalls das Reproduktionssystem mit 25 % genannt, mit 20 % folgt der Respirationstrakt und mit je 10 % der Harntrakt und andere wie z.B. eine septische Arthritis. HAUPTMAN und Mitarbeiter bestätigen eine Peritonitis als häufigste Ursache mit 37 %, gefolgt vom Reproduktionstrakt mit 23 %. Bei HARDIE und Mitarbeiter wird zunächst das Reproduktionssystem mit 53 % angegeben, dann der Gastrointestinaltrakt mit 33 %. Hier war allerdings das Patientengut vorselektiert, da es sich nur um chirurgische Patienten handelte.

IV.2.5 Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen

Bei fast allen Patienten konnten Blutkulturen angelegt werden, beim fehlenden Teil von 15 Hunden beruhte dies entweder auf der mangelnden Möglichkeit, weiteres Blut zu entnehmen (zu kleines Blutvolumen aufgrund der Größe des Patienten oder einer Anämie), oder auf einer bereits begonnenen antibiotischen Behandlung. Insgesamt lag der Anteil an positiven Blutkulturen bei 14 %. Bei weiteren Tupferproben von Operationsgebieten, Haut, Kulturen von Urin und Abszessen sowie einer mikroskopischen Beurteilung eines Abklatschpräparates konnte ein Anteil von 74 % als positiv bewertet werden. Die beschriebenen 5 Hunde mit positiven Proben zweier Lokalisationen hatten jeweils die gleichen Erreger an verschiedenen Gebieten, so waren bei 4 Hunden die Blutkulturen sowie ein Tupfer oder eine Kultur von Urin oder Kot (*Salmonella enterica*) positiv. Bei einem weiteren Hund waren die Proben ein Wundtupfer der Prostata

sowie eine Urinkultur. Der am häufigsten nachgewiesene Erreger in unserer Arbeit war *Escherichia coli* (28 %, 13 von 46 Isolaten). Dieses Ergebnis deckt sich mit Befunden anderer Studien (siehe Punkt II.4.4.1, Beteiligte Erreger). Der größere Anteil an gram-negativen Bakterien kann ebenfalls in der Literatur bestätigt werden (CALVERT & GREENE, 1986; DOW et al., 1989; DOW, 1995). In einer Blutkultur wurde *Staphylococcus epidermidis* gefunden, diesen Keim findet man als Besiedler der natürlichen Hautflora. Eine Kontamination hätte durch die Entnahme mehrerer Blutkulturen ausgeschlossen werden können; die Isolation desselben Erregers aus mindestens zwei verschiedenen Blutkulturen ist laut DOW beweisend (DOW, 1995).

Statistisch konnte nur ein grenzwertiger Zusammenhang zwischen einer positiven Blutkultur und einer erhöhten Mortalität festgestellt werden. Dies könnte jedoch auch mit dem insgesamt niedrigen Anteil an positiven Kulturen zusammenhängen, eine größere Anzahl hätte vielleicht ein signifikantes Ergebnis erbracht. DOW und Mitarbeiter stellten bei ihren Untersuchungen fest, dass eine Bakteriämie die Mortalität bei schwer erkrankten Tieren um das 10fache ansteigen lässt.

IV.3 Nachweismethoden für Interleukin-6

IV.3.1 Bioassay versus Immunoassay

Der Nachweis von IL-6 kann entweder mittels eines Immuno- oder eines Bioassays erfolgen.

Immunoassays verwenden einen Antikörper, der das zu messende Zytokin spezifisch erkennt und bindet. Die Detektion erfolgt dann in selteneren Fällen mittels Radioaktivität (Radioimmunoassay, RIA) oder inzwischen häufig durch ein Enzymsystem (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA).

Der Vorteil eines Immunoassays liegt klar auf der Hand: gekauft wird ein komplettes Kit, die beim Bioassay notwendige Anzucht und Versorgung von Zellkulturen sowie Anmischen von Substraten und Reagentien entfällt. Das Detektionssystem mit einem Antikörper birgt jedoch auch einige Nachteile, so wird nur ein kleiner Teil des Zytokins erkannt und der Immunoassay misst ebenso biologisch inaktive Bruchstücke und an Inhibitoren gebundene Proteine (REMICK, 1995; PARK et al., 2001). Eine Unterscheidung zwischen biologisch aktivem und inaktivem Material ist somit, im Gegensatz zu einem Bioassay, nicht

möglich. Während der Entzündungsreaktion des Körpers scheint nur biologisch aktives Zytokin wichtig zu sein, über den Nutzen der Messung des gesamten ausgeschütteten Proteins ist man sich noch uneinig (REMICK, 1995). Aufgrund der späteren Ausschüttung von Inhibitoren mag die Erkennung auch des gebundenen Materials nützlich sein.

Für diese Studie wurde ein Bioassay gewählt. Gründe hierfür liegen in den experimentell bereits evaluierten Bioassays bei Hunden (LEMAY et al., 1990; CORAN et al., 1992; YAMASHITA et al., 1994a und 1994b; MIYAMOTO et al., 1996) und der zu dieser Zeit mangelnden Verfügbarkeit eines spezifischen caninen ELISA. Vorteile eines Bioassays sind, wie bereits erwähnt, außerdem die Messung nur biologisch aktiven Materials. Des Weiteren kann durch die Verwendung besonderer Zellreihen eine sehr gute Spezifität und Sensitivität erreicht werden (VAN SNICK, 1990). Ein Nachteil bei neu entdeckten Zytokinen besteht natürlich in der mangelnden Verfügbarkeit spezifischer Zelllinien; dies trifft allerdings auch für spezifische Antikörper für des ELISA zu (REMICK, 1995).

IV.3.2 Zelllinie

Für die Messung von IL-6 wird eine Zelllinie benötigt, die dieses Zytokin obligatorisch zum Wachstum benötigt. Als Auswahl stehen dafür zwei murine B-Zell Hybridomzelllinien zur Verfügung, und zwar zum einen B9 und zum anderen 7TD1 (VAN SNICK, 1990). Besondere Vor- oder Nachteile der Zelllinien bestehen nicht; so wurde die 7TD1-Zelllinie ausgewählt.

IV.4 Interleukin-6

IV.4.1 Wahl des Zytokins

Die Auswahl von IL-6 als zu messendes Interleukin beruht auf der bereits erfolgreichen Anwendung als Biomarker in der Humanmedizin (HACK et al., 1989; WAAGE et al., 1989; CALANDRA et al., 1991; SULLIVAN et al., 1992; DAMAS et al., 1992; CASEY et al., 1993; PINSKY et al., 1993; MOSCOVITZ et al., 1994; GOLDIE et al., 1995; RICHE et al., 2000; SPITTLER et al., 2000; KINASEWITZ et al., 2004; PANACEK et al., 2004; OBERHOLZER et al., 2005; ODA et al., 2005; WATANABE et al., 2005). Außerdem existieren bereits

experimentelle Daten zum Plasmaspiegel von IL-6 bei Hunden (LEMAY et al., 1990; CORAN et al., 1992; YAMASHITA et al., 1994a und 1994b; MIYAMOTO et al., 1996).

IV.4.2 Interleukin-6 und die SIRS-Kriterien

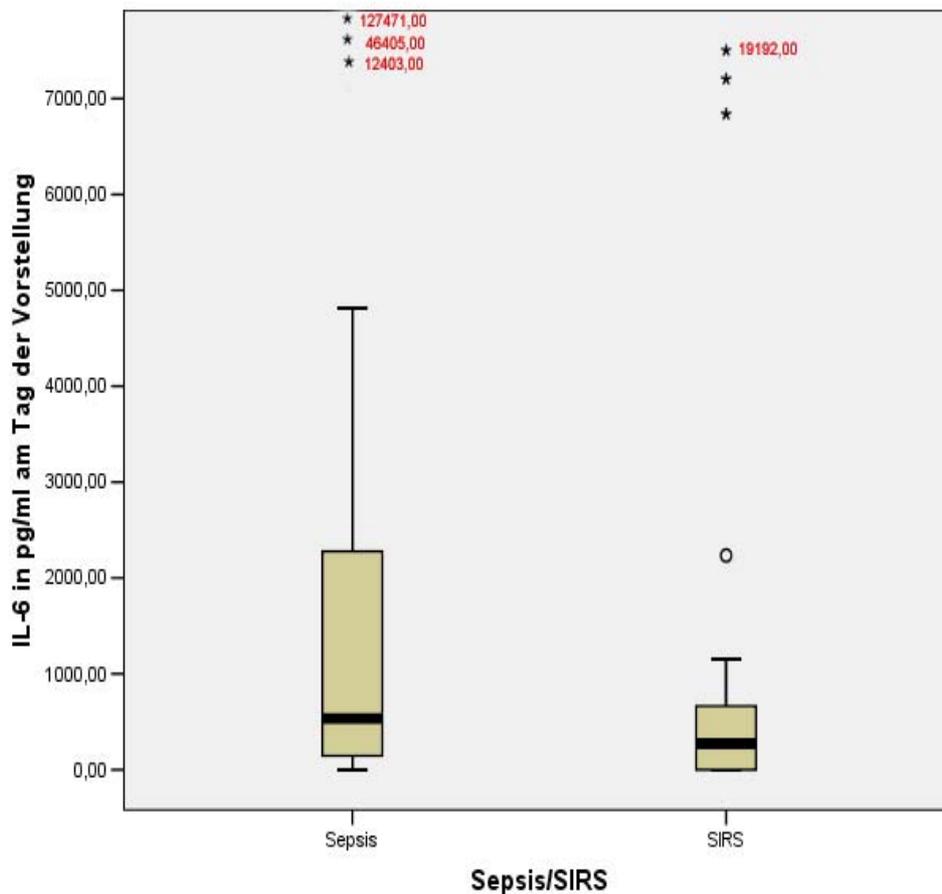
In unserer Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl veränderter SIRS-Parameter und einem erhöhten Plasmaspiegel von IL-6 festgestellt werden ($p = 0,015$). Eine Untersuchung der einzelnen Kriterien in Korrelation mit IL-6 erbrachte jedoch nur einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit den Leukozytenzahlen zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme ($p = 0,002$). Je höher der gemessene Spiegel an IL-6 war, desto niedriger waren die Leukozytenzahlen. Man bemerkt jedoch anhand der Abbildung 2 (siehe Kapitel III Publikation), dass sich diese Zahlen immer noch weitestgehend im unteren Teil des Referenzbereichs bewegen, und die verfügbaren Datenpunkte bei sehr hohen IL-6 Spiegeln spärlich werden. DAMAS und Mitarbeiter finden eine negative Korrelation zwischen Leukozytenzahlen und der Plasma-IL-6-Konzentration ($p < 0,001$), gehen jedoch nicht näher auf den Bereich der Datenpunkte ein. SPITTLER und Mitarbeiter bestätigen ein solches Ergebnis ebenfalls, der Median liegt, wie in unserer Arbeit, ebenfalls im Referenzbereich. HACK und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie jedoch keine Korrelation zwischen Leukozytenzahlen und der Plasma-IL-6-Konzentration aufzeigen, ebenso stellten OBERHOFFER und Mitarbeiter keinen prädiktiven Wert einer Leukopenie für hohe IL-6-Werte fest. Ob der in unserer Studie erbrachte Zusammenhang nun klinisch signifikant ist, bleibt anzuzweifeln. Jedoch lässt sich eine niedrige Anzahl an Leukozyten durch sehr starken Verbrauch erklären und damit auch logisch in Zusammenhang mit einem erhöhten Schweregrad der Erkrankung und somit erhöhten Spiegeln an IL-6 bringen.

IV.4.3 Interleukin-6 und Sepsis

Wir konnten statistisch einen Zusammenhang zwischen IL-6 und Sepsis herausfinden ($p = 0,022$). Höhere Plasmaspiegel des Zytokins korrelierten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer Sepsis. Dies ist eine Angabe, die in der Literatur bestätigt wird. SELBERG und Mitarbeiter finden ebenfalls höhere

Spiegel bei Patienten mit Sepsis im Vergleich zu solchen mit SIRS, wobei sich IL-6 als Parameter besser eignete als C-reaktives Protein (CRP). Auch CASEY sowie SULLIVAN und Mitarbeiter bestätigen höhere Spiegel bei Sepsispatienten. IL-6 konnte in einer Studie als einziger Parameter eine Bakteriämie vorhersagen (MOSCOVITZ et al., 1994).

Abbildung 7: Darstellung der unterschiedlichen Messwerte der Gruppen Sepsis und SIRS. Drei Ausreißer in der Sepsis-Gruppe und einer in der SIRS-Gruppe sind separat eingezeichnet (Werte in Rot daneben).



IV.4.4 Interleukin-6 und der Schweregrad

In unserer Studie korrelierten höhere Spiegel von IL-6 signifikant mit der Schwere der Erkrankung ($p = 0,006$), als Einteilung wurde nach den Definitionskriterien der ACCP-SCCM Konferenz SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock zu Grunde gelegt (BONE et al., 1992). Eine Korrelation von IL-6 zu verschiedenen Scoring-Systemen wie dem Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score, dem Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE) score oder dem Multiple Organ Dysfunction (MOD)

score ist in vielen Studien in der Humanmedizin evident geworden (DAMAS et al., 1992; GOLDIE et al., 1995; GEPPERT et al., 2002; KINASEWITZ et al., 2004; PANACEK et al., 2004; OBERHOLZER et al., 2005; ODA et al., 2005; SUNDEN-CULLBERG et al., 2005; WATANABE et al., 2005). Eine erhöhte Punktzahl in solchen Scoring-Systemen bedeutet auch einen erhöhten Schweregrad der Erkrankung. Eine ähnlich objektivierte Einteilung ist in der Veterinärmedizin bisher nicht entwickelt worden, so dass die Evaluierung des Schweregrads hauptsächlich auf subjektiven Einschätzungen beruht (DE LAFORCADE et al., 2003). Dies stellt in der Beurteilung und in den Korrelationen mit prädiktiven Parametern natürlich ein erhebliches Manko dar. Ein nicht ganz ähnliches, jedoch zu gebrauchendes System stellt der Survival Prediction Index (SPI) dar, der 1994 entwickelt und 2001 evaluiert und weiter bearbeitet wurde (KING et al., 1994; KING et al., 2001). Dieser Index beruht auf dem APACHE Score in der Humanmedizin und erlaubt eine Beurteilung des Schweregrads anhand der errechneten Überlebenschance.

Ein statistischer Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anzahl an SIRS-Parametern und einer schwereren Erkrankung konnte in unserer Arbeit nicht erbracht werden, auch steigt damit nicht die Wahrscheinlichkeit einer Sepsis. Dies gibt wiederum Hinweise darauf, dass die SIRS-Kriterien zur Beurteilung des Schweregrads der Sepsis nicht geeignet sind.

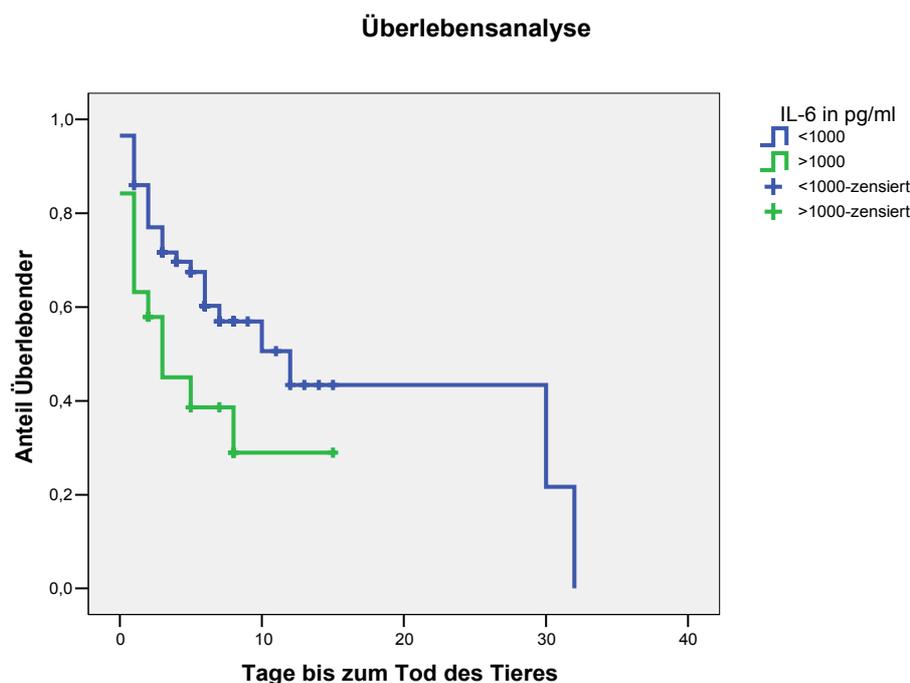
Wurde ein Vergleich zwischen Patienten im septischen Schock und Sepsis ohne Schock angestellt, so konnten auch in Studien der Humanmedizin erhöhte Serumspiegel von IL-6 im Schock gefunden werden (HACK et al., 1989; DAMAS et al., 1992; ENDO et al., 1992; GOLDIE et al., 1995; GOGOS et al., 2000; PANACEK et al., 2004; OBERHOLZER et al., 2005; ODA et al., 2005; SUNDEN-CULLBERG et al., 2005). CALANDRA und Mitarbeiter finden zwar keinen statistischen Zusammenhang zwischen IL-6 und dem Schweregrad, berichten aber von den höchsten Plasmaspiegeln bei den Patienten, die an einem schweren Schock schnell verstarben.

IV.4.5 Interleukin-6 und die Mortalität

In unserer Patientenpopulation konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einem höheren Plasmaspiegel von IL-6 am Tag der Einlieferung und einer höheren Wahrscheinlichkeit für den Tod nachgewiesen werden. Auch trat

der Tod umso früher ein, je höher der Spiegel war. In der Humanmedizin finden sich zahlreiche Belege für die Korrelation mit der Mortalität (HACK et al., 1989; WAAGE et al., 1989; CALANDRA et al., 1991; SULLIVAN et al., 1992; CASEY et al., 1993; OBERHOFFER et al., 1999; RICHE et al., 2000; KINASEWITZ et al., 2004; PANACEK et al., 2004; OBERHOLZER et al., 2005; WATANABE et al., 2005). Einige Autoren konnten zwar keine statistisch signifikante Korrelation feststellen, zeigten jedoch im Zeitverlauf ein deutliches Absinken der IL-6-Werte bei den Überlebenden und konstant hohe Werte bei den Nicht-Überlebenden (GOLDIE et al., 1995; SPITTLER et al., 2000; ODA et al., 2005; SUNDEN-CULLBERG et al., 2005). DAMAS und Mitarbeiter definierten einen Grenzwert von 1 000 pg/ml, nach dem sich die Mortalitätsrate von 21% auf über 50% steigerte. Auch ODA und Mitarbeiter kalkulieren denselben Wert, über dem die IL-6-Werte Nicht-Überlebende im Zeitverlauf blieben. Setzen wir denselben Grenzwert an, so lässt sich auch in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ein Unterschied feststellen (Abbildung 8).

Abbildung 8: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier, gewählter Grenzwert von 1000 pg/ml, Patienten mit IL-6 > 1000 pg/ml und mit IL-6 < 1000 pg/ml dargestellt.



Zur Kinetik finden sich in der Literatur übereinstimmende Angaben. SPITTLER und Mitarbeiter fanden ein Abfall des IL-6 Plasmaspiegels um 88 % innerhalb der ersten drei Tage bei den Überlebenden, während andere Autoren ein Absinken innerhalb 24 bis 48 Stunden erkennen (WAAGE et al., 1989; CALANDRA et al., 1991; DAMAS et al., 1992; MARTIN et al., 1994; GOLDIE et al., 1995; RICHE et al., 2000). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein Absinken der Werte innerhalb der gemessenen drei Tage beobachtet werden (siehe Kapitel III Publikation, Abbildung 1)

OKANO und Mitarbeiter finden eine erhöhte Mortalitätsrate mit einem Ansteigen der erfüllten SIRS-Kriterien, was hier nicht nachvollzogen werden konnte. Wir hatten jedoch keine weitere Kontrollgruppe ohne SIRS. Da ein Einschluss in jedem Fall eine Erkrankung bedeutet, kann dies einen Einfluss auf die Statistik nehmen.

In der Veterinärmedizin ist in der Beurteilung der Mortalitätsrate sicherlich noch der Faktor der Euthanasie einzubeziehen. Die Patienten werden natürlich hauptsächlich aufgrund einer schlechten Prognose und schlechtem Allgemeinbefinden euthanasiert, jedoch spielen auch monetäre Aspekte eine große Rolle. Welcher der 27 eingeschlaferten Hunde (71 % der Nicht-Überlebenden) nun wann gestorben wäre, ist nicht einschätzbar. Dies muss bei Aussagen über die Sterberate und Todestage, besonders im Vergleich zu humanmedizinischen Studien in Betracht gezogen werden.

IV.4.6 Individuelle Maximalwerte

In neuester Zeit gibt es in der Humanmedizin einige Untersuchungen bezüglich sehr hoher Maximalwerte von Zytokinen bei einigen Patienten. WATANABE und Mitarbeiter fanden heraus, dass Patienten mit Werten $\geq 10\ 000$ pg/ml eine höhere Frequenz an Tandem-Repeat-Polymorphismen im Bereich der Allele für TNF- α und IL-1 β haben. Diese Individuen hatten auch lang anhaltend hohe IL-6 Spiegel und eine niedrigere Überlebensrate (WATANABE et al., 2005). Auch WILSON und Mitarbeiter fanden vorher an derselben kodierenden Stelle für TNF- α Veränderungen, die mit einem höheren Spiegel an TNF- α und einer erhöhten Mortalität einhergingen (WILSON et al., 1997). Dies und das Allel IL-1 β für wird an anderen Stellen ebenfalls mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht (MA et al., 2002; O'KEEFE et al., 2002). In unserer Patientenpopulation

konnten vier Hunde mit extrem hohen IL-6-Werten identifiziert werden: In der Sepsis-Gruppe waren Werte von 127 471 pg/ml, 46 405 pg/ml, und 12 403 pg/ml zu finden und in der SIRS-Gruppe 19 192 pg/ml. Drei der vier Patienten wurden aufgrund des schlechten Allgemeinzustands gleich am ersten Tag euthanasiert, und derjenige mit 46 405 pg/ml am 5. Tag. Die Patienten mit Sepsis hatten entweder bereits eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock.

IV.5 Bewertung von Interleukin-6 als Biomarker der caninen Sepsis

In unserer Studie konnte anhand der IL-6-Messung eine Sepsis von SIRS unterschieden und die prognostische Bedeutung der Plasma-IL-6-Konzentration beim Hund nachgewiesen werden. Es konnte bei Hunden mit einer nicht experimentell hervorgerufenen Entzündung die gleichen Ergebnisse erzielt werden, die in der Humanmedizin schon länger bekannt sind. Die Messung mittels eines Bioassays ist aus den oben genannten Gründen vorteilhaft. Für die Anwendung in der Praxis sollte jedoch ein Schnelltest etabliert werden. In der Humanmedizin sind solche ELISA-Systeme bereits in Verwendung (NOVOTNY et al., 2005). Seit einiger Zeit ist ein solches System auch spezifisch für den Hund erhältlich (Canines IL-6 DuoSet, DY1609, R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, Großbritannien). Dieser Schnelltest sollte an einer vergleichbaren Patientenpopulation evaluiert werden, um letztlich zur zukünftigen Anwendung in der Praxis beizutragen.

V Zusammenfassung

Stefanie Rau

Sepsis beim Hund: Interleukin-6 als prognostischer Parameter

Wie auch in der Humanmedizin stellen Sepsis und SIRS den behandelnden Arzt in der Veterinärmedizin vor eine große Herausforderung. Eine optimale therapeutische Intervention setzt besonders die Früherkennung dieser Erkrankungen und damit auch die Verfügbarkeit von prognostischen Parametern voraus. Humanmedizinische klinische Studien und experimentelle Studien an Tiermodellen haben bereits erwiesen, dass eine massive Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und IL-6 eine große Rolle bei der Pathophysiologie der Sepsis spielen und als Marker dienen können. Bei natürlich erkrankten Hunden sind jedoch bezüglich der Zytokinausschüttung keine Informationen vorhanden. Ziel dieser prospektiven Arbeit war eine Erforschung des Nutzens von caninem IL-6 als Biomarker und prognostischem Parameter in der Sepsis.

Für die vorliegende Arbeit wurden im Zeitraum von Juli 2004 bis Juli 2005 prospektiv alle Hunde, die in der Medizinischen Kleintierklinik der Universität München und der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der freien Universität Berlin mit zur Untersuchung vorgestellt wurden und bei denen der Verdacht auf eine Sepsis bestand, untersucht und für diagnostische Zwecke Blut entnommen. Bedingung für die Aufnahme in die Studie war die Erfüllung der SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome)-Kriterien. Eine Einstufung in die Gruppe „Sepsis“ erfolgte, wenn zusätzlich ein histologischer, zytologischer oder mikrobiologischer Nachweis der Infektion möglich war. Des Weiteren wurden septische Patienten in die Untergruppen „Sepsis“, „schwere Sepsis“ und „septischer Schock“ unterteilt. Am Tag der Aufnahme oder Entwicklung der Entzündung (Tag 0) wurde eine Blutkultur aus der zentralen Halsvene abgenommen; in Einzelfällen erfolgte auch eine zweite Kultur. Die Bestimmung der Aktivität von Interleukin-6 an Tag 0, 1 und 2 wurde mit Hilfe eines auf Zellwachstum basierenden kolorimetrischen Bioassays durchgeführt.

Bei 43 von 79 Patienten konnte ein Infektionsherd nachgewiesen werden (Sepsis-Gruppe), 36 Patienten gingen in die SIRS-Gruppe ein. Eine Besitzerbefragung nach Vorerkrankungen des Patienten konnte dies in 34 Patienten (43 %)

bestätigen, bei 30 Fällen lagen keine Erkrankungen zugrunde (38 %) und unbekannt war dies bei 15 Hunden (19 %). Der Hauptgrund für die Vorstellung des Tieres an den Kliniken waren gastrointestinale Probleme (82 %), die sich durch Anorexie, Erbrechen und Durchfall äußerten. Die Hospitalisierungszeit lag im Mittel bei 6 Tagen. 38 Patienten (48 %) starben oder wurden aufgrund der schlechten Prognose euthanasiert, wobei eine auffällige Mortalitätsrate innerhalb der ersten drei Tage erreicht wurde ($n=24$, 63 %). Die häufigsten klinischen Diagnosen konnten dem Gastrointestinaltrakt zugeordnet werden (65 %), gefolgt vom Reproduktionssystem (24 %).

Der Anteil an positiven Blutkulturen lag bei 9/64 (14 %). Weitere 62 Proben (Urinkulturen, Tupferproben von Abszessen, Wunden oder Vaginalausfluss) wurden mikrobiologisch untersucht und eine bakterielle Besiedelung konnte bei 46 der 62 Proben (74 %) nachgewiesen werden. Das am häufigsten isolierte Bakterium war *Escherichia coli* mit einem Nachweis in 13 von 46 Isolaten (28 %). *Staphylococcus spp.* wurden in 8 von 46 Proben gefunden (17 %). Insgesamt lag der Anteil an gramnegativen Bakterien bei 19 von 62 Proben (41 %) und war damit am stärksten vertreten.

Eine Korrelation zwischen der Höhe von IL-6 am Tag der Aufnahme und der Anzahl an erfüllten SIRS-Kriterien konnte statistisch mit einem p-Wert von 0,015 nachgewiesen werden. Bezüglich des Schweregrades der Erkrankung mit SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock als definierte Grade konnte eine signifikante Korrelation zu hohen IL-6 Spiegeln im Blut festgestellt werden ($p=0,006$). Durch ein logistisches Regressionsmodell wurde eine positive Assoziation zwischen IL-6 und Sepsis bzw. SIRS dargestellt ($p=0,022$): ein höherer Anteil an IL-6 Plasmaaktivität war mit einer höheren Wahrscheinlichkeit, an einer nachgewiesenen Sepsis zu erkranken, verbunden (Odds Ratio = 1,177). Eine Korrelation zwischen höheren IL-6-Werten zum Zeitpunkt der Aufnahme und einer höheren Todeswahrscheinlichkeit konnte nachgewiesen werden (Odds Ratio = 1,146). Der Zeitpunkt des Todes war signifikant früher, je höher die gemessenen Plasmaaktivitäten von IL-6 an Tag 0 waren ($p=0,012$).

Schlussfolgernd zeigt diese Arbeit erstmals, dass die Messung des Interleukin-6 in der caninen Sepsis ebenso wie in der Humanmedizin als prognostischer Parameter genutzt werden kann.

VI Summary

Stefanie Rau

Canine Sepsis: The Use of Interleukin-6 as a Prognostic Parameter

Just like in human medicine, sepsis and SIRS poses a great challenge for the treating veterinarian. Adequate therapeutic intervention is for the most part dependent on early diagnosis of these conditions and thereby requires availability of prognostic parameters. Studies in human medicine and experimental animal models have already shown that the massive production of inflammatory cytokines like TNF- α , IL-1 and IL-6 play a huge role in pathophysiology of sepsis and can serve as biomarkers. No information is however available regarding cytokine responses in dogs with naturally occurring sepsis. Goal of this prospective work was to research the use of IL-6 as biomarker and prognostic parameter in canine sepsis.

For this study all dogs with clinical suspicion of sepsis that had been admitted to the Clinic of Small Animal Medicine of the Universities of Munich and Berlin from July 2004 to July 2005 were examined and blood for diagnostic purposes was taken. Inclusion requirement was completion of the SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) criteria. Animals were subsequently classified as septic if additional histological or microbiological confirmation of infection was available. Septic patients were again divided into the subgroups sepsis, severe sepsis and septic shock. Blood for bacteriological cultures was obtained from the jugular vein on the day of admission or development of infection (day 0); in selected cases a second culture was taken. Measurement of IL-6 plasma activity on day 0, 1 and 2 was done with the use of a colorimetric bioassay based on cell growth.

In 43 of 9 patients a source of infection had been proven (sepsis-group), 36 patients were enrolled in the SIRS-group. Owners were asked for a history of pre-existing disease, which was affirmed in 34 dogs (43 %), no disease in 30 cases (38 %) and unknown in 15 (19 %). The main reasons for presentation of the dogs in the clinics included gastrointestinal problems (82 %), with symptoms commonly including anorexia, vomiting, and diarrhea. The mean hospitalisation time was 6 days. 38 patients (48 %) died or were euthanized because of a fatal prognosis, whereas a conspicuous mortality rate was noted within the first three

days (n = 24, 63 %). Regarding clinical diagnoses, the gastrointestinal system was most often affected (65 %), followed by the reproductive system (24 %).

The frequency of positive blood cultures in our study was 9/64 (14 %). An additional number of 62 samples from different localisations, e.g. urine, swab samples from wounds, abscesses or vaginal discharge, were microbiologically screened and a bacterial colonisation was evidenced in 46 of the 62 samples (74 %). The most common organism isolated was *Escherichia coli* in 13 of 46 isolates (28 %). *Staphylococcus spp.* were found in 8 of 46 samples (17 %). The proportion of gram-negative bacteria overall was 19 of 62 samples (41 %) and therefore represents the largest fraction.

A correlation between the measured level of IL-6 on the day of admission and the number of abnormal SIRS-criteria could statistically be proven with $p = 0.015$. A higher IL-6 level correlated significantly ($p = 0.006$) with severity of illness (SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock as defined groups). A logistic regression model revealed a positive association between IL-6 and Sepsis or SIRS ($p = 0.022$); a higher level of IL-6 plasma activity is related to a higher chance of falling ill to confirmed sepsis (proportional Odds-Ratio = 1.177). A correlation between higher plasma level of IL-6 on day of admission and a higher probability for death could be evidenced (proportional Odds-Ratio = 1.146). Time of death was also significantly earlier, the higher the measured level of IL-6 on the day of admission was ($p = 0.012$).

In conclusion, this study shows for the first time that measurement of interleukin-6 may well be used as a prognostic parameter in canine sepsis, similarly to human medicine.

VII Literaturverzeichnis

Agwunobi AO, Reid C, Maycock P, Little RA, Carlson GL. Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct 2000;85(10):3770-3778.

Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* May 15 2003;101(10):3765-3777.

Amaral A, Opal SM, Vincent JL. Coagulation in sepsis. *Intensive Care Med.* Jun 2004;30(6):1032-1040.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* Jul 2001;29(7):1303-1310.

Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. *Lancet.* May 16 1998;351(9114):1501-1505.

Balk RA. Pathogenesis and management of multiple organ dysfunction or failure in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Clin.* Apr 2000a;16(2):337-352, vii.

Balk RA. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin.* Apr 2000b;16(2):179-192.

Banks JG, Foulis AK, Ledingham IM, Macsween RN. Liver function in septic shock. *J Clin Pathol.* Nov 1982;35(11):1249-1252.

Barbee JH, Cokelet GR. The Fahraeus effect. *Microvascular research.* 1971 Jan;3(1):6-16.

Baris C, Guest MM, Frazer ME. Direct effects of endotoxin on the microcirculation. *Adv Shock Res.* 1980;4:153-160.

Bellhorn-T S, Macintire DK. Bacterial translocation. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 2004, 26: 3, 229-236; 55 ref. 2004.

Berringer R, Harwood-Nuss AL. Septic shock (Part 1). *J Emerg Med.* 1985;3(6):475-483.

Berringer R, Harwood-Nuss AL. Septic shock (Part 2). *J Emerg Med.* 1986;4(1):49-56.

Beutler BA, Milsark IW, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immunol.* Dec 1985;135(6):3972-3977.

Billiau A. BSF-2 is not just a differentiation factor. *Nature.* Dec 4-10 1986;324(6096):415.

Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth.* Jul 1996;77(1):110-117.

Bloos F. Die Geschichte der Sepsis. Juni 2006: <http://webanae.med.uni-jena.de/WebObjects/DSGPortal.woa/WebServerResources/sepsis/geschichte.html>

Bolder U, Ton-Nu HT, Scheingart CD, Frick E, Hofmann AF. Hepatocyte transport of bile acids and organic anions in endotoxemic rats: impaired uptake and secretion. *Gastroenterology.* Jan 1997;112(1):214-225.

Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med.* Sep 15 1991a;115(6):457-469.

Bone RC. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann Intern Med.* Feb 15 1991b;114(4):332-333.

Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest.* Jun 1992;101(6):1481-1483.

Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med.* Oct 15 1996;125(8):680-687.

Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* Jul 1997;112(1):235-243.

Brady CA, King LG. Postoperative management of the emergency surgery small animal patient. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* May 2000;30(3):681-698, viii.

Brady CA, Otto CM. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and multiple organ dysfunction. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* Nov 2001;31(6):1147-1162, v-vi.

Brady M, Christmas S, Sutton R, Neoptolemos J, Slavin J. Cytokines and acute pancreatitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* Jul 1999;13(2):265-289.

Brakenhoff JP, de Groot ER, Evers RF, Pannekoek H, Aarden LA. Molecular cloning and expression of hybridoma growth factor in *Escherichia coli*. *J Immunol.* Dec 15 1987;139(12):4116-4121.

Brown SD, Clark C, Gutierrez G. Pulmonary lactate release in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *J Crit Care.* Mar 1996;11(1):2-8.

Brunkhorst FM. [Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2006 Jan;41(1):43-4.

Budelmann G. [Hugo Schottmuller, 1867-1936. The problem of sepsis]. *Internist (Berl).* Mar 1969;10(3):92-101.

Calandra T, Gerain J, Heumann D, Baumgartner JD, Glauser MP. High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during

sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *Am J Med.* Jul 1991;91(1):23-29.

Calvert CA. Valvular bacterial endocarditis in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1982 May 1;180(9):1080-4.

Calvert CA, Greene CE, Hardie EM. Cardiovascular infections in dogs: epizootiology, clinical manifestations, and prognosis. *J Am Vet Med Assoc.* Sep 15 1985;187(6):612-616.

Calvert CA, Greene CE. Bacteremia in dogs: diagnosis, treatment, and prognosis. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1986; 8(3): 179-186. 1986.

Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications.* Jan-Feb 2001;15(1):44-54.

Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med.* Oct 15 1993;119(8):771-778.

Cerra FB. Hypermetabolism, organ failure, and metabolic support. *Surgery.* Jan 1987;101(1):1-14.

Chrusch C, Bautista E, Jacobs HK, et al. Blood pH level modulates organ metabolism of lactate in septic shock in dogs. *J Crit Care.* Sep 2002;17(3):188-202.

Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today.* Dec 1994;15(12):562-566.

Content J, De Wit L, Pierard D, Derynck R, De Clercq E, Fiers W. Secretory proteins induced in human fibroblasts under conditions used for the production of interferon beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 1982;79(9):2768-2772.

Coran AG, Drongowski RA, Paik JJ, Remick DG. Ibuprofen intervention in canine septic shock: reduction of pathophysiology without decreased cytokines. *J Surg Res.* Sep 1992;53(3):272-279.

Crocker SH, Eddy DO, Obenauf RN, Wismar BL, Lowery BD. Bacteremia: host-specific lung clearance and pulmonary failure. *J Trauma.* Mar 1981;21(3):215-220.

Cunnion RE, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin.* Jan 1989;5(1):99-118.

Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med.* Oct 1989;17(10):975-978.

Damas P, Ledoux D, Nys M, et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg.* Apr 1992;215(4):356-362.

Danai P, Martin GS. Epidemiology of sepsis: recent advances. *Curr Infect Dis Rep.* Sep 2005;7(5):329-334.

Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg.* Jul 1997;84(7):920-935.

de Laforcade AM, Freeman LM, Shaw SP, Brooks MB, Rozanski EA, Rush JE. Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *J Vet Intern Med.* Sep-Oct 2003;17(5):674-679.

Deutschman CS, De Maio A, Buchman TG, Clemens MG. Sepsis-induced alterations in phosphoenolpyruvate carboxykinase expression: the role of insulin and glucagon. *Circ Shock.* Aug 1993;40(4):295-302.

Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med.* Jul 2001;29(7 Suppl):S42-47.

Dow SW. Diagnosis of bacteremia in critically ill dogs and cats. In: Kirk RW, ed. *Kirk's Current Veterinary Therapy XII*. Philadelphia, PA: W. B. Saunders; 1995: 137-139.

Dow SW, Curtis CR, Jones RL, Wingfield WE. Bacterial culture of blood from critically ill dogs and cats: 100 cases (1985-1987). *J Am Vet Med Assoc*. Jul 1 1989;195(1):113-117.

Dow SW, Jones RL. Bacteremia: pathogenesis and diagnosis. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1989; 11(4): 432-443. 1989.

Endo S, Inada K, Inoue Y, et al. Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and endotoxin. *Circ Shock*. Dec 1992;38(4):264-274.

Falk JL, Rackow EC, Leavy J, Astiz ME, Weil MH. Delayed lactate clearance in patients surviving circulatory shock. *Acute Care*. 1985;11(3-4):212-215.

Fall PJ, Szerlip HM. Lactic acidosis: from sour milk to septic shock. *J Intensive Care Med*. Sep-Oct 2005;20(5):255-271.

Fein AM, Calalang-Colucci MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin*. Apr 2000;16(2):289-317.

Fox, J. Cox Proportional-Hazards Regression for Survival Data, Appendix to An R and S-PLUS Companion to Applied Regression, Available as <http://cran.r-project.org/doc/contrib/Fox-Companion/appendix-cox-regression.pdf>, Feb 2002.

Gahhos FN, Chiu RC, Bethune D, Dion Y, Hinchey EJ, Richards GK. Hemodynamic responses to sepsis: hypodynamic versus hyperdynamic states. *J Surg Res*. Dec 1981;31(6):475-481.

Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 1987;84(20):7251-7255.

Gennari R, Alexander JW. Anti-interleukin-6 antibody treatment improves survival during gut-derived sepsis in a time-dependent manner by enhancing host defense. *Crit Care Med.* Dec 1995;23(12):1945-1953.

Geppert A, Steiner A, Zorn G, et al. Multiple organ failure in patients with cardiogenic shock is associated with high plasma levels of interleukin-6. *Crit Care Med.* Sep 2002;30(9):1987-1994.

Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis.* Jan 2000;181(1):176-180.

Goldhill, J and colleagues. Improved approaches to infectious diseases: Novel approaches to controlling toxic shock and viral infection. Juni 2006: <http://www.leaddiscovery.co.uk/dossiers/0602/0602.htm>

Goldie AS, Fearon KC, Ross JA, et al. Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention Group. *Jama.* Jul 12 1995;274(2):172-177.

Gore DC, Jahoor F, Hibbert JM, DeMaria EJ. Lactic acidosis during sepsis is related to increased pyruvate production, not deficits in tissue oxygen availability. *Ann Surg.* Jul 1996;224(1):97-102.

Green EM, Adams HR. New perspectives in circulatory shock: pathophysiologic mediators of the mammalian response to endotoxemia and sepsis. *J Am Vet Med Assoc.* Jun 15 1992;200(12):1834-1841.

Green RM, Beier D, Gollan JL. Regulation of hepatocyte bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents. *Gastroenterology.* Jul 1996;111(1):193-198.

Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood.* Oct 1989;74(5):1704-1710.

Hackett T. Multiorgan Failure. In: Wingfield WE, Raffae MR, eds. *The Veterinary ICU Book*. 1st ed. Jackson, WY: Teton NewMedia; 2002: 685-694.

Haegeman G, Content J, Volckaert G, Derynck R, Tavernier J, Fiers W. Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *Eur J Biochem*. Sep 15 1986;159(3):625-632.

Haglund U, Hulten L, Ahren C, Lundgren O. Mucosal lesions in the human small intestine in shock. *Gut*. 1975 Dec;16(12):979-84.

Hardie EM. Life-threatening bacterial infection. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1995; 17(6): 763-778.

Hardie EM, Rawlings CA. Septic shock. I. Pathophysiology. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1983a; 5(5): 369-376, 378.

Hardie EM, Rawlings CA. Septic shock. II. Prevention, recognition, and treatment. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1983b; 5(6): 483-489, 492.

Hardie EM, Rawlings CA, Calvert CA. Severe sepsis in selected small animal surgical patients. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1986; 22(1): 33-41. 1986.

Harris RL, Musher DM, Bloom K, et al. Manifestations of sepsis. *Arch Intern Med*. Nov 1987;147(11):1895-1906.

Haskins SC. Management of septic shock. *J Am Vet Med Assoc*. Jun 15 1992;200(12):1915-1924.

Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB. Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Vet Surg*. Sep-Oct 1997;26(5):393-397.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. Feb 1 1990;265(3):621-636.

Hirano T, Teranishi T, Lin B, Onoue K. Human helper T cell factor(s). IV. Demonstration of a human late-acting B cell differentiation factor acting on Staphylococcus aureus Cowan I-stimulated B cells. *J Immunol.* Aug 1984;133(2):798-802.

Hirsh DC, Jang SS, Biberstein EL. Blood culture of the canine patient. *J Am Vet Med Assoc.* Jan 15 1984;184(2):175-178.

Hopper KB, Shane. An updated view of hemostasis: mechanisms of hemostatic dysfunction associated with sepsis. *J Vet Emerg Crit Care.* 2005;15(2):83-91.

Hosgood G, Salisbury SK. Generalized peritonitis in dogs: 50 cases (1975-1986). *J Am Vet Med Assoc.* Dec 1 1988;193(11):1448-1450.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* Jan 9 2003;348(2):138-150.

Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1987;84(24):9035-9039.

Kellum JA, Kramer DJ, Lee K, Mankad S, Bellomo R, Pinsky MR. Release of lactate by the lung in acute lung injury. *Chest.* May 1997;111(5):1301-1305.

Kinasewitz GT, Yan SB, Basson B, et al. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism [ISRCTN74215569]. *Crit Care.* Apr 2004;8(2):R82-90.

King LG, Stevens MT, Ostro ENS, Diserens D, Shankar JR. A model for prediction of survival in critically ill dogs *J Vet Emerg Crit Care.* 1994a; 4(2): 85-99.

King LG. Postoperative complications and prognostic indicators in dogs and cats with septic peritonitis: 23 cases (1989-1992). *J Am Vet Med Assoc.* Feb 1 1994b;204(3):407-414.

King LG, Wohl JS, Manning AM, Hackner SG, Raffae MR, Maislin G. Evaluation of the survival prediction index as a model of risk stratification for clinical research in dogs admitted to intensive care units at four locations. *Am J Vet Res.* Jun 2001;62(6):948-954.

Kitoh K, Katoh H, Kitagawa H, Sasaki Y. Comparison of heartworm extract-induced shock and endotoxin-induced shock in dogs by determination of serum tumor necrosis factor concentrations. *Am J Vet Res.* May 2001;62(5):765-769.

Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med.* Aug 23 2001;345(8):588-595.

Lang CH, Dobrescu C. Sepsis-induced increases in glucose uptake by macrophage-rich tissues persist during hypoglycemia. *Metabolism.* Jun 1991;40(6):585-593.

Lanz OI, Ellison GW, Bellah JR, Weichman G, VanGilder J. Surgical treatment of septic peritonitis without abdominal drainage in 28 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* Jan-Feb 2001;37(1):87-92.

LeMay DR, LeMay LG, Kluger MJ, D'Alecy LG. Plasma profiles of IL-6 and TNF with fever-inducing doses of lipopolysaccharide in dogs. *Am J Physiol.* Jul 1990;259(1 Pt 2):R126-132.

Leon LR, White AA, Kluger MJ. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *Am J Physiol.* Jul 1998;275(1 Pt 2):R269-277.

Levi M, van der Poll T, ten Cate H, van Deventer SJ. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *Eur J Clin Invest.* Jan 1997;27(1):3-9.

Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res.* Oct 15 2003;60(1):26-39.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* Apr 2003;31(4):1250-1256.

Martin C, Saux P, Mege JL, Perrin G, Papazian L, Gouin F. Prognostic values of serum cytokines in septic shock. *Intensive Care Med.* 1994;20(4):272-277.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003 Apr 17; 348(16):1546-54.

McAnulty, J.F. 1983. Septic shock in the dog: a review. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1983; 19: 827-836.

Meduri GU. Late adult respiratory distress syndrome. *New Horiz.* Nov 1993;1(4):563-577.

Meisner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Curr Opin Crit Care.* Oct 2005;11(5):473-480.

Meszaros K, Lang CH, Bagby GJ, Spitzer JJ. Tumor necrosis factor increases in vivo glucose utilization of macrophage-rich tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 30 1987;149(1):1-6.

Miyamoto T, Fujinaga T, Yamashita K, Hagio M. Changes of serum cytokine activities and other parameters in dogs with experimentally induced endotoxic shock. *Jpn J Vet Res.* Aug 1996;44(2):107-118.

Mizock BA. Alterations in carbohydrate metabolism during stress: a review of the literature. *Am J Med.* Jan 1995;98(1):75-84.

Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ. The toll of innate immunity on microbial pathogens. *N Engl J Med.* Jun 10 1999;340(23):1834-1835.

Modur V, Li Y, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J Clin Invest.* Dec 1 1997;100(11):2752-2756.

Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am.* Apr 1995;75(2):257-277.

Moscovitz H, Shofer F, Mignott H, Behrman A, Kilpatrick L. Plasma cytokine determinations in emergency department patients as a predictor of bacteremia and infectious disease severity. *Crit Care Med.* Jul 1994;22(7):1102-1107.

Nordan RP, Pumphrey JG, Rudikoff S. Purification and NH₂-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1. *J Immunol.* Aug 1 1987;139(3):813-817.

Novotny A, Emmanuel K, Bartels H, Siewert JR, Holzmann B. [Indicators for early prediction of outcome in sepsis.]. *Chirurg.* Sep 2005;76(9):837-844.

Oberhoffer M, Karzai W, Meier-Hellmann A, Bogel D, Fassbinder J, Reinhart K. Sensitivity and specificity of various markers of inflammation for the prediction of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with sepsis. *Crit Care Med.* Sep 1999;27(9):1814-1818.

Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, et al. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock.* Jun 2005;23(6):488-493.

Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Nakanishi K, Matsuda K, Nakamura M. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine.* Feb 21 2005;29(4):169-175.

Okano S, Yoshida M, Fukushima U, Higuchi S, Takase K, Hagio M. Usefulness of systemic inflammatory response syndrome criteria as an index for prognosis judgement. *Vet Rec.* Feb 23 2002;150(8):245-246.

O'Reilly M, Newcomb DE, Remick D. Endotoxin, sepsis, and the primrose path. *Shock*. Dec 1999;12(6):411-420.

Otto CM. Sepsis. In: Wingfield WE, Raffe MR, eds. *The Veterinary ICU Book*. 1st ed. Jackson, WY: Teton NewMedia; 2002: 695-709.

Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE, et al. Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit Care Med*. Nov 2004;32(11):2173-2182.

Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. Nov 15 2001;164(10 Pt 1):1896-1903.

Parent C, King LG, Walker LM, Van Winkle TJ. Clinical and clinicopathologic findings in dogs with acute respiratory distress syndrome: 19 cases (1985-1993). *J Am Vet Med Assoc*. May 1 1996;208(9):1419-1427.

Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med*. Aug 1 1990;113(3):227-242.

Pechumer H, Leinisch E, Bender-Gotze C, Ziegler-Heitbrock HW. Recovery of monocytes after bone marrow transplantation--rapid reappearance of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production. *Transplantation*. 1991 Oct;52(4):698-704.

Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*. Feb 1993;103(2):565-575.

Puneet P, Moochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Jan 2005;288(1):L3-15.

Purvis D, Kirby R. Systemic inflammatory response syndrome: septic shock. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* Nov 1994;24(6):1225-1247.

Raymond RM, Harkema JM, Emerson TE, Jr. Mechanism of increased glucose uptake by skeletal muscle during E coli endotoxin shock in the dog. *Circ Shock.* 1981;8(1):77-93.

Remick DG. Applied molecular biology of sepsis. *J Crit Care.* Dec 1995;10(4):198-212.

Remick DG, Bolgos G, Copeland S, Siddiqui J. Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. *Infect Immun.* May 2005;73(5):2751-2757.

Rhodes RS. Impaired mitochondrial function and gluconeogenesis in late shock. *J Surg Res.* Apr 1981;30(4):325-330.

Riche FC, Cholley BP, Panis YH, et al. Inflammatory cytokine response in patients with septic shock secondary to generalized peritonitis. *Crit Care Med.* Feb 2000;28(2):433-437.

Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, et al. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J Immunol.* Jan 1 2003a;170(1):503-507.

Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med.* 2003b;9(5):517-24.

Schlag G, Redl H. Mediators of injury and inflammation. *World J Surg.* May 1996;20(4):406-410.

Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta.* Dec 20 2000;1498(2-3):99-111.

Schneider K, Klaas R, Kaspers B, Staeheli P. Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *Eur J Biochem.* 2001 Aug;268(15):4200-6.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988 Sep 1;48(17):4827-33.

Selberg O, Hecker H, Martin M, Klos A, Bautsch W, Kohl J. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med.* Aug 2000;28(8):2793-2798.

Severin PN, Uhing MR, Beno DW, Kimura RE. Endotoxin-induced hyperlactatemia results from decreased lactate clearance in hemodynamically stable rats. *Crit Care Med.* Nov 2002;30(11):2509-2514.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* Jun 7 1999;189(11):1777-1782.

Siegel JH, Cerra FB, Coleman B, et al. Physiological and metabolic correlations in human sepsis. Invited commentary. *Surgery.* Aug 1979;86(2):163-193.

Spittler A, Razenberger M, Kupper H, et al. Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. *Clin Infect Dis.* Dec 2000;31(6):1338-1342.

Spolarics Z, Schuler A, Bagby GJ, Lang CH, Meszaros K, Spitzer JJ. Tumor necrosis factor increases in vivo glucose uptake in hepatic nonparenchymal cells. *J Leukoc Biol.* Mar 1991;49(3):309-312.

Sugita H, Kaneki M, Tokunaga E, et al. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Feb 2002;282(2):E386-394.

Sullivan JS, Kilpatrick L, Costarino AT, Jr., Lee SC, Harris MC. Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis. *J Pediatr.* Apr 1992;120(4 Pt 1):510-515.

Sunden-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, et al. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* Mar 2005;33(3):564-573.

Sziebert L, Thomson PD, Jinkins J, et al. Effect of naloxone treatment on the cardiopulmonary response to endotoxin in sheep. *Adv Shock Res.* 1983;10:121-128.

Taboada J, Meyer DJ. Cholestasis associated with extrahepatic bacterial infection in five dogs. *J Vet Intern Med.* Oct-Dec 1989;3(4):216-221.

Takai Y, Wong GG, Clark SC, Burakoff SJ, Herrmann SH. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* Jan 15 1988;140(2):508-512.

Ten Cate H. Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Crit Care Med.* Sep 2000;28(9 Suppl):S9-11.

Tenhunen JJ, Uusaro A, Karja V, Oksala N, Jakob SM, Ruokonen E. Apparent heterogeneity of regional blood flow and metabolic changes within splanchnic tissues during experimental endotoxin shock. *Anesth Analg.* Aug 2003;97(2):555-563, table of contents.

Teranishi T, Hirano T, Arima N, Onoue K. Human helper T cell factor(s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell-replacing factor- (TRF) like factor(s). *J Immunol.* Apr 1982;128(4):1903-1908.

Thijs LG, Hack CE. Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensive Care Med.* Nov 1995;21 Suppl 2:S258-263.

Tizard IR, Schubot RM. *Veterinary Immunology: An Introduction*, 7th ed. Philadelphia: Saunders 2004: 10-13, 111.

Tjardes T, Neugebauer E. Sepsis research in the next millennium: concentrate on the software rather than the hardware. *Shock.* Jan 2002;17(1):1-8.

Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit.* Mar 2005;11(3):RA76-85.

Vallance P, Moncada S. Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horiz.* Feb 1993;1(1):77-86.

Vallet B, Lund N, Curtis SE, Kelly D, Cain SM. Gut and muscle tissue PO₂ in endotoxemic dogs during shock and resuscitation. *J Appl Physiol.* Feb 1994;76(2):793-800.

Van Damme J, Cayphas S, Opdenakker G, Billiau A, Van Snick J. Interleukin 1 and poly(rI).poly(rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblasts. *Eur J Immunol.* Jan 1987a;17(1):1-7.

Van Damme J, Opdenakker G, Simpson RJ, et al. Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med.* Mar 1 1987b;165(3):914-919.

Van Damme J, Cayphas S, Van Snick J, et al. Purification and characterization of human fibroblast-derived hybridoma growth factor identical to T-cell-derived B-cell stimulatory factor-2 (interleukin-6). *Eur J Biochem.* Nov 2 1987c;168(3):543-550.

Van den Berghe G, de Zegher F, Bouillon R. Clinical review 95: Acute and prolonged critical illness as different neuroendocrine paradigms. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun 1998;83(6):1827-1834.

Van der Poll T, van Deventer SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am.* Jun 1999;13(2):413-426, ix.

Van Snick J, Cayphas S, Vink A, et al. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1986;83(24):9679-9683.

Van Snick J, Cayphas S, Szikora JP, et al. cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6. *Eur J Immunol.* Feb 1988;18(2):193-197.

Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:253-278.

Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 1 1992;89(11):4845-4849.

Vary TC, Siegel JH, Nakatani T, Sato T, Aoyama H. Effect of sepsis on activity of pyruvate dehydrogenase complex in skeletal muscle and liver. *Am J Physiol.* Jun 1986;250(6 Pt 1):E634-640.

Vary TC, Drnevich D, Jurasinski C, Brennan WA, Jr. Mechanisms regulating skeletal muscle glucose metabolism in sepsis. *Shock.* Jun 1995;3(6):403-410.

Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med.* Jan 1 1989;169(1):333-338.

Wang H, Yang H, Czura CJ, Sama AE, Tracey KJ. HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. Nov 15 2001;164(10 Pt 1):1768-1773.

Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, Matsuda K, Hatano M, Tokuhisa T. Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit Care Med*. Jan 2005;33(1):89-97; discussion 242-243.

Weeren FR, Muir WW, 3rd. Clinical aspects of septic shock and comprehensive approaches to treatment in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*. Jun 15 1992;200(12):1859-1870.

Weigand MA, Horner C, Bardenheuer HJ, Bouchon A. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. Sep 2004;18(3):455-475.

Weiss DJ, Rashid J. The sepsis-coagulant axis: a review. *J Vet Intern Med*. Sep-Oct 1998;12(5):317-324.

Weissenbach J, Chernajovsky Y, Zeevi M, et al. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1980;77(12):7152-7156.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 1 1997;94(7):3195-3199.

Wolfe RR. Substrate utilization/insulin resistance in sepsis/trauma. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. Dec 1997;11(4):645-657.

Wong GG, Witek-Giannotti JS, Temple PA, et al. Stimulation of murine hemopoietic colony formation by human IL-6. *J Immunol*. May 1 1988;140(9):3040-3044.

Yamashita K, Fujinaga T, Hagio M, Miyamoto T, Izumisawa Y, Kotani T. Bioassay for interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-like activities in canine sera. *J Vet Med Sci.* Feb 1994a;56(1):103-107.

Yamashita K, Fujinaga T, Miyamoto T, Hagio M, Izumisawa Y, Kotani T. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J Vet Med Sci.* 1994b;56(3):487-92.

Zilberstein A, Ruggieri R, Korn JH, Revel M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *Embo J.* Oct 1986;5(10):2529-2537.

VIII Anhang**VIII.1 Einschlusskriterien:**

EINSCHLUSSKRITERIEN

Patientennummer: _____

Tag der Einstellung: _____

1. Mit Infektion → SEPSIS a) und b)
2. Ohne Infektion b)

a)

Infektion

 Mikrobiologischer Nachweis (Blutkultur positiv) Infektionsherd nachgewiesen Zytologisch Mikrobiologisch

b)

Mehr als zwei der folgenden Parameter:

Hypothermie: große Hunde $<37,8^{\circ}\text{C}$
kleine Hunde $<38,0^{\circ}\text{C}$

Hyperthermie: große Hunde $>39,3^{\circ}\text{C}$
kleine Hunde $>39,4^{\circ}\text{C}$

 Tachycardie (Herzfrequenz $>140/\text{min}$) Tachypnoe ($>20/\text{min}$)

Gemessener Wert:

<input type="checkbox"/> Leukozytose (> 16 000 / μ l)	
<input type="checkbox"/> Leukopenie (<6 000 / μ l)	
<input type="checkbox"/> Normaler WBC mit >3% Stabkernigen	

VIII.2 Anamneseblatt:

ANAMNESE

Patientennummer: _____

Tag der Einstellung: _____

Besitzer:

Name: _____

Vorname: _____

Anschrift: _____

Telefon: _____

Patient:

Name des Hundes: _____

Rasse: _____

Alter: _____

Kastriert:

Geschlecht: _____

Kastriert:

 Ja Nein

Ernährungszustand: _____

Gewicht: _____

Impfstatus: _____ Entwurmungsstatus: _____

Andere Tiere im Haushalt: _____ Gesundheitszustand: _____

Bekannte Grunderkrankungen:

Vorbestehende/
Chronische Erkrankung (Welche): _____

Tumorerkrankung: _____ Sonstiges: _____

Regelmäßige
Medikamentengabe: _____ Medikamente: _____

Patientennummer: _____
Tag der Einstellung: _____

Grund der heutigen
Vorstellung: _____

Seit wann Symptome: _____

Etwaige Vorbehandlung: _____

Medikamente: _____

Diagnose bzw.

Verdachtsdiagnose: _____

VIII.3 Klinische und hämatologische Parameter:**Klinische und hämatologische Parameter**

Patientennummer: _____

Parameter	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Allgemeinuntersuchung			
Verhalten			
Temperatur °C			
Schleimhautfarbe			
KFZ in s			
Pulsfrequenz, -qualität			
Herzfrequenz /min			
Atemfrequenz /min			
Blutdruck in mmHg			
Harnabsatz (ml/kg/h)			
Blutbild (EDTA)			
WBC / μ l			
Thrombozyten / μ l			
Differentialblutbild			
Monozyten %			
Lymphozyten %			
Eosinophile Granulozyten %			
Basophile Granulozyten %			
Segmentkernige Neutrophile Granulozyten %			
Stabkernige Neutrophile Granulozyten %			
Jugendliche Neutrophile Granulozyten %			
Morphologie Neutrophile			
Vorläuferzellen			
Schistozyten			

Gerinnung (Citrat)			
PT in s			
aPTT in s			
D-Dimere $\mu\text{g/ml}$			
Fibrinogen (g/l)			
Antithrombin III in %			
	0 h	6 h	
Plasma (Citrat, -20°C, 3 x 0,5 ml)			
TNF- α pg/ml			
HMGB-1			
IL-6 pg/ml			
Klinische Chemie (Serum, Rest asservieren für CRP nach Berlin)			
Protein (g/l)			
Albumin (g/l)			
Glucose (mmol/l)			
ALT (U/l)			
AP (U/l)			
Gesamtbilirubin ($\mu\text{mol/l}$)			
Harnstoff (mmol/l)			
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)			
C-reaktives Protein			

IX Lebenslauf

Name:	Stefanie Maria Rau geb. Weber
Geburtsdatum:	29.04.1979 in Ehingen a. D.
01.01.2007 - 30.04.2006	Gründungsmitglied des Projekts AVIAN LABORATORY DIAGNOSTICS, gefördert durch Exist-Seed
01.01.2006 - 31.12. 2006	Internship in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Seit 01.05.2004	Promotionsstudium an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, mit tierärztlicher Tätigkeit
26.05.2004	Approbation als Tierärztin durch die Regierung von Oberbayern
01.10.1998 - 26.04.2004	Beginn und Abschluss des Studiums der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Bestehen des 3. Teils der Tierärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,88)
01.08.1990 - 31.06.1991	Briarlake Elementary School in Atlanta, Georgia (USA)
12.09.1989 - 26.06.1998	Holbein Gymnasium Augsburg mit Schulabschluss Allgemeine Hochschulreife (Gesamtnote 1,8)
17.09.1985 - 26.07.1989	Grundschule Stadtbergen

Publikationen

Tierärztliche Praxis, zur Veröffentlichung angenommen (Erstautor)	Schilddrüsenwerterhöhungen bei einem Hund infolge eines Dachsbisses – ein Fallbericht
Veterinary Clinical Pathology, zur Veröffentlichung angenommen (Erstautor)	Plasma IL-6 is predictive for severity and mortality in canine SIRS and sepsis

Präsentationen

12. – 14.05.2006, Vortrag mit dem Titel: „Messung der
14. Jahrestagung der Fachgruppe Interleukin-6 Aktivität im Plasma von 79
„Innere Medizin und Klinische an SIRS erkrankten Hunden“
Labordiagnostik“ (InnLab),
München
14. – 16.10.2006, Posterpräsentation mit dem Titel „Plasma
European College of Veterinary IL-6 response is predictive for severity
Internal Medicine – Companion and mortality in canine SIRS and sepsis”,
Animals (ECVIM-CA) Kongreß, 1. Preis für Poster Abstract Presentation
Amsterdam

X Danksagung

Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann danke ich für die Möglichkeit, Patientengut und die Laboreinrichtungen der Medizinischen Kleintierklinik München nutzen zu dürfen.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Johannes Hirschberger danke ich für die Überlassung des fantastischen Themas und die gute Betreuung während der Arbeit.

Meinen Mitdoktoranden möchte ich besonders danken: Constance Richter für die sorgfältige Arbeit und ihren Teil der Proben, und Stefan Härtle für seine geduldigen Laboreinführungen und die moralische Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Barbara Kohn möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin herzlich danken.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Mitarbeiter der Medizinischen Kleintierklinik München, insbesondere an Isa Zenker, für die Benachrichtigung bei interessanten Patienten und die Hilfe bei der Probennahme.

Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers danke ich für die Möglichkeit, die Laboreinrichtungen des Instituts für Tierphysiologie benutzen zu dürfen und außerdem für die theoretische und praktische Unterstützung bei der Arbeit.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Helmut Küchenhoff und besonders bei Frau Nora Fenske bedanken.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für die finanzielle und ideelle Unterstützung zur Erfüllung meiner Ziele.

Besonderer Dank an meinen Mann, Carsten Rau, der mich in allen Lebenslagen immer bestätigt und gestützt hat.