

In-vitro Untersuchungen zur Effektivität von
Hämodialyse, Hämoperfusion und einer Kombination der
Verfahren zur Elimination von Metaldehyd aus caninem
Plasma

von Elisabeth Lucia Mauser

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

In-vitro Untersuchungen zur Effektivität von
Hämodialyse, Hämooperfusion und einer Kombination der
Verfahren zur Elimination von Metaldehyd aus caninem
Plasma

von Elisabeth Lucia Mauser

aus München

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Mitbetreuung durch: Dr. René Dörfelt

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer
Prof. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Metaldehyd	2
1.1.	Eigenschaften, Vorkommen und Verwendung von Metaldehyd	2
1.2.	Vergiftungen mit Metaldehyd	3
1.2.1.	Pathophysiologie	5
1.2.2.	Symptome	7
1.2.3.	Diagnose	7
1.2.4.	Therapie	8
1.2.5.	Prognose	11
1.3.	Weiterentwicklung von Präparaten	12
2.	Extrakorporale Blutreinigungsverfahren	13
2.1.	Grundlagen	13
2.2.	Verfahren	15
2.2.1.	Hämodialyse	15
2.2.2.	Hämoperfusion	16
2.2.3.	Kombiniertes Verfahren	17
III.	PUBLIKATION	19
IV.	DISKUSSION	45
V.	ZUSAMMENFASSUNG	53
VI.	SUMMARY	54
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	55
VIII.	DANKSAGUNG	61

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

GABA Gamma-Aminobuttersäure

HD Hämodialyse

HP Hämoperfusion

HD/HP kombinierte Hämodialyse und Hämoperfusion

i. m. intramuskulär

i. v. intravenös

z. B. zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Metaldehyd findet hauptsächlich in kommerziell erhältlichen Molluskiziden Anwendung, z. B. in Schneckenkorn. Diese Produkte werden als Fraß- und Kontaktgift gegen Schneckenbefall ausgelegt (BOOZE & OEHME, 1986; FIRTH, 1992a; DOLDER, 2003). Die orale Aufnahme des Giftstoffes Metaldehyd kann in Abhängigkeit von der Dosis für Mensch und Tier tödlich sein. Die Metaldehydintoxikation ist eine häufig auftretende Vergiftung beim Hund (FIRTH, 1992a; BRAUER et al., 2011; BATES et al., 2012; BUHL et al., 2013).

Im Vordergrund der klinischen Symptomatik stehen zentralnervöse Störungen wie Ataxie, Ganzkörpertremor und anhaltende Krämpfe, begleitet von Hyperthermie und metabolischer Azidose. In schweren Fällen kann die Vergiftung zu Koma und Tod des Tieres führen (YAS-NATAN et al., 2007; BATES et al., 2012). Es ist kein spezifisches Antidot bekannt, daher erfolgt die Therapie einer Metaldehydintoxikation symptomatisch mit Kontrolle der lebensbedrohlichen Krampfanfälle (FIRTH, 1992a; YAS-NATAN et al., 2007; ZIMMERMANN et al., 2010). Hämodialyse (HD) und Hämoperfusion (HP) stellen therapeutische Verfahren dar, die in einem extrakorporalen Kreislauf die Elimination bestimmter Substanzen aus dem Blut des Patienten beschleunigen (GARELLA, 1988; ELLIOTT, 2000; FISCHER et al., 2004). Für den Giftstoff Metaldehyd ist die Wirkungsweise dieser Verfahren bislang nicht untersucht. Die Effektivität extrakorporaler Verfahren hängt von den Eigenschaften der zu eliminierenden Substanz ab. Metaldehyd ist ein kleines Molekül mit einem Molekulargewicht von 176,2 Dalton und somit aufgrund der Molekülgröße ein attraktiver Kandidat für die HD (VON BURG & STOUT, 1991).

Da bislang keine spezifische Behandlung für die Metaldehydvergiftung existiert, ist die Forschung nach einer potentiellen zukünftigen Therapieoption von hoher klinischer Bedeutsamkeit. Ziel dieser Doktorarbeit war die *in-vitro*-Untersuchung der Effektivität von HD, HP und der Kombination von Hämodialyse und Hämoperfusion (HD/HP) zur Elimination von Metaldehyd aus caninem Plasma.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Metaldehyd

Metaldehyd wird als Trockenbrennstoff und als Molluskizid eingesetzt. Der Giftstoff ist in vielen kommerziell erhältlichen Schneckenkornpräparaten enthalten (FIRTH, 1992a).

1.1. Eigenschaften, Vorkommen und Verwendung von Metaldehyd

Metaldehyd ist ein zyklisches Tetramer des Acetaldehyds. Das Molekulargewicht beträgt 176,2 Dalton (VON BURG & STOUT, 1991; SAITO et al., 2008). Es ist ein farbloses oder weißes kristallines Pulver, das bei 112 °C sublimiert und seinen Schmelzpunkt in der Kapillare bei 246 °C hat. Die Substanz ist in Wasser schlecht, in Alkohol und Äther wenig und in Chloroform und Benzol gut löslich (FALBE & REGITZ, 1997). Metaldehyd ist leicht brennbar und giftig für alle Säugetiere und Vögel (BATES et al., 2012; BUHL et al., 2013).

Früher wurde der Giftstoff Metaldehyd in Form von Trockenbrennstoff eingesetzt. Dabei wurde die toxische Wirkung auf Schnecken erstmalig erkannt. Die Produkte wurden meist in Form von Brennstofftabletten vertrieben, zum Beispiel unter dem Handelsnamen Meta-Brennstoff. Die Tabletten waren in der Handhabung einfach und daher beliebte Zündmittel beim Camping oder Picknick. Sie waren kompakt, sauber, entzündeten sich nur, wenn sie mit einer Flamme in Kontakt kamen und verbrannten ohne Rauch oder Aschebildung. Heutzutage wird der auf Metaldehyd basierende Trockenbrennstoff normalerweise nicht mehr eingesetzt, da es mittlerweile weniger gefährliche Produkte auf dem Markt gibt (LEWIS et al., 1939; LONGSTRETH & PIERSON, 1982; FIRTH, 1992a; MOODY & INGLIS, 1992; SHINTANI et al., 1999).

Molluskizide mit dem Wirkstoff Metaldehyd werden weltweit vertrieben. Bei der *US Environmental Protection Agency* sind ungefähr 50 verschiedene Molluskizide registriert, die Metaldehyd enthalten. Die Präparate sind kommerziell erhältlich und werden als Fraß- oder Kontaktgift gegen Schneckenbefall angeboten. Es gibt verschiedene Formulierungen, wie Granulat, Körner, Pellets oder Flüssigkeit. In fester Form haben viele Produkte eine blaue oder grüne Färbung. In flüssiger Form sind die Produkte meist farblos und enthalten zum Teil als zusätzlichen

Inhaltsstoff Ethylenglykol. Am häufigsten werden die Köder in Form von Granulat genutzt und oft in Gärten oder neben Gehwegen ausgelegt. Die meisten Produkte enthalten Metaldehyd in Konzentrationen von 1,5 – 8 %, allerdings sind auch Produkte mit Metaldehydkonzentrationen von 20 – 50 % erhältlich. Durch Zusatz von Getreide oder Melasse locken die ausgelegten Köder nicht nur Schnecken an, sondern werden auch gerne von anderen Tieren gefressen (BOOZE & OEHME, 1986; FIRTH, 1992a; PUSCHNER, 2001; BATES et al., 2012; BUHL et al., 2013).

1.2. Vergiftungen mit Metaldehyd

Metaldehyd ist toxisch für alle Säugetiere und für Vögel (BATES et al., 2012; BUHL et al., 2013). Der Einsatz von Schneckenkornpräparaten ist weit verbreitet und Vergiftungsfälle bei Tieren sind weltweit beschrieben. Fälle wurden unter anderem in Europa, Nordamerika, Israel und Australien dokumentiert. Zu den betroffenen Spezies zählen Hunde, Katzen, Rinder, Schafe, Pferde und Vögel. Bei Hunden kommen Intoxikationen mit Metaldehyd besonders häufig vor. In vielen Fällen erfolgt die Giftaufnahme bei Hunden durch Schneckenkornpräparate, die in eigenen Gärten von den Besitzern selbst ausgelegt worden sind. Außerdem ereignen sich Vergiftungsfälle durch inadäquate Lagerung der Köder. Hunde haben zum Teil Zugriff zu ganzen Boxen oder Containern mit Molluskiziden. Durch die Zusätze von beispielsweise Getreide werden die Produkte besonders schmackhaft und Hunde neigen dazu, die gesamte verfügbare Menge aufzunehmen (STUDDERT, 1985a; YAS-NATAN et al., 2007; BERNY et al., 2010; BRAUER et al., 2011; BATES et al., 2012; BUHL et al., 2013).

Eine retrospektive Auswertung von gesammelten Daten des *Veterinary Poisons Information Service (VPIS)* in London ergab, dass 1.912 Erkundigungen zu Metaldehydvergiftungsfällen bei Hunden in den Jahren 1985 bis 2010 eingegangen waren. Das *VPIS* ist ein 24-Stunden-Telefonservice, der Tierärzte bezüglich des Managements von Vergiftungsfällen bei Tieren berät. Die an einer Metaldehydvergiftung erkrankten Hunde waren im Schnitt vier Jahre alt und 18,3 Kilogramm schwer. Es waren mehr weibliche als männliche Tiere betroffen. Die am häufigsten vertretenen Rassen waren Labrador Retriever, Jack Russell Terrier und Cocker Spaniel (BATES et al., 2012). Zwischen 2001 und 2011 wurden an dem *National Pesticide Information Center (NPIC)* in den USA 1.285 Berichte von Metaldehyd-Expositionen bei Tieren registriert. Davon wurden 35 Todesfälle

von Hunden gezählt. Die meisten Fälle wurden an der Westküste der USA registriert, vor allem in Kalifornien, Oregon und Washington (BUHL et al., 2013). Außerdem stellten sich Metaldehydvergiftungen als die häufigste Ursache für Krämpfe in Assoziation mit Intoxikationen bei Hunden an der Kleintierklinik der Veterinärmedizinischen Universität Hannover zwischen 2004 und 2008 heraus (BRAUER et al., 2011). An der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München wurden 14 Hunde mit Status epilepticus aufgrund einer akuten Vergiftung in den Jahren von 2002 bis 2009 dokumentiert. Von den 14 vergifteten Hunden hatten drei Hunde eine Metaldehydintoxikation (ZIMMERMANN et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2010).

Die angegebene mittlere letale Dosis (LD_{50}) von Metaldehyd für Hunde variiert in der veterinärmedizinischen Literatur zwischen 60 und 1.000 mg/kg Körpergewicht. Vor allem kleine Hunde oder Welpen können bereits infolge geringer aufgenommener Mengen ernsthafte Symptome entwickeln (BOOZE & OEHME, 1986; FIRTH, 1992a; YAS-NATAN et al., 2007; BATES et al., 2012).

Auch beim Menschen kommen Metaldehydintoxikationen vor. Humanmedizinische Vergiftungsfälle durch die orale Aufnahme von Molluskiziden oder Brennstofftabletten sind in der Literatur dokumentiert (LEWIS et al., 1939; LONGSTRETH & PIERSON, 1982; SHIH et al., 2004). Auch als Mittel zum Mord wurde Metaldehyd bereits eingesetzt. Die ersten Vergiftungsfälle traten in den 1920-er Jahren durch Meta-Brennstofftabletten auf. Bei dem *Schweizer toxikologischen Informationscenter* wurden 213 Metaldehydvergiftungsfälle in den Jahren 1966 bis 1969 verzeichnet. In 20 von 24 Vergiftungsfällen bei Erwachsenen erfolgte eine vorsätzliche Aufnahme von Metaldehyd. Intoxikationen bei Erwachsenen treten meist im Zuge von Suizidversuchen auf (LEWIS et al., 1939; LUDIN, 1958; LONGSTRETH & PIERSON, 1982; SAITO et al., 2008). Eine 32 Jahre alte Lehrerin nahm absichtlich eine große Menge eines flüssigen Molluskizids zu sich. Die Patientin konnte 51 Tage nach ihrem Suizidversuch aus dem Krankenhaus entlassen werden. Während dieser Zeit befand sie sich für mehrere Tage im Koma in zum Teil sehr kritischen klinischen Zustand (LONGSTRETH & PIERSON, 1982). Ein 37 Jahre alter Mann versuchte ebenfalls, sich mit Metaldehyd in Form eines Molluskizids umzubringen. Bei Einlieferung in das Krankenhaus befand er sich in einem komatösen Zustand. Sechs Tage nach Einlieferung hatte sich der Patient

körperlich ausreichend erholt, um in eine psychiatrische Anstalt überwiesen werden zu können (MOODY & INGLIS, 1992). Von 15 untersuchten humanmedizinischen Metaldehydvergiftungsfällen durch Molluskizide in Taiwan zwischen 1991 und 2002 überlebten 14 Patienten, ein Patient verstarb (SHIH et al., 2004). Erwachsene Patienten überleben in der Regel mit entsprechender Therapie (LONGSTRETH & PIERSON, 1982; MOODY & INGLIS, 1992; SHIH et al., 2004).

Metaldehydintoxikationen bei Kindern ereignen sich normalerweise durch die versehentliche Aufnahme des Giftstoffes. Die früher weit verbreiteten Brennstofftabletten wirkten aufgrund ihrer Form und Farbe auf Kinder attraktiv. Eine ähnliche Problematik besteht durch die blaue oder grüne Färbung der Schneckenkornpräparate, die mit Süßigkeiten verwechselt werden können. Sowohl mit Brennstofftabletten als auch mit Molluskiziden sind Metaldehydvergiftungsfälle bei Kindern beschrieben (MILLER, 1928; LEWIS et al., 1939; LONGSTRETH & PIERSON, 1982; SHINTANI et al., 1999; BATES et al., 2012). Eine Publikation berichtet von einem zwei Jahre alten Jungen, der nur eine einzige auf Metaldehyd basierende Brennstofftablette zu sich genommen hat. Der Junge erzählte seinem Kindermädchen, dass die Süßigkeit nicht besonders gut geschmeckt habe. Erste Symptome zeigten sich circa eine Stunde nach Giftaufnahme. Am nächsten Tag verstarb der Junge an den Folgen der Metaldehydvergiftung (LEWIS et al., 1939).

1.2.1. Pathophysiologie

Es wird angenommen, dass Metaldehyd bei Schnecken durch Dehydratation und Lähmung zum Tod führt (BOOZE & OEHME, 1986). Die genaue Wirkungsweise von oral aufgenommenem Metaldehyd bei Säugetieren ist derzeit noch nicht vollständig erschlossen (BOOZE & OEHME, 1986; FIRTH, 1992b). Früher wurde angenommen, dass das toxische Prinzip von Metaldehyd auf dem entstehenden Abbauprodukt Acetaldehyd basiert. Nach aktuelleren Studien ist davon auszugehen, dass Metaldehyd selbst entweder allein oder zumindest zum Großteil für das Auftreten der klinischen Symptome verantwortlich ist. Ein Beitrag von Acetaldehyd zur Entstehung der Symptome kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist anzunehmen, dass im Magen eine säureabhängige partielle Hydrolyse von Metaldehyd zu Acetaldehyd stattfindet, der Großteil des oral aufgenommenen Metaldehyds allerdings unverändert aus dem

Gastrointestinaltrakt absorbiert wird (SPARKS et al., 1996).

In experimentellen Studien mit Mäusen, denen oral entweder Acetaldehyd oder Metaldehyd zugeführt wurde, konnten weder die auftretenden Symptome noch die Analyse von entnommenen Gewebeproben die frühere Annahme unterstützen, dass Acetaldehyd für das Auftreten der klinischen Symptome hauptverantwortlich sei. Nach oraler Gabe von Metaldehyd war kein Acetaldehyd im Gehirn der Tiere messbar. Metaldehyd dagegen konnte in Gehirn, Leber und Blut nachgewiesen werden (SPARKS et al., 1996). In einer weiteren experimentellen Studie wurde Ratten oral Metaldehyd verabreicht. Die Analyse von Serumproben der Ratten ergab den Nachweis für Metaldehyd, jedoch nicht für Acetaldehyd (SHINTANI et al., 1999). Ebenso konnte bei *in-vivo*-Studien mit Hunden, denen oral Metaldehyd eingegeben wurde, Acetaldehyd weder im Plasma noch im Urin der Tiere nachgewiesen werden. Metaldehyd dagegen war in dem Plasma und in dem Urin messbar (BOOZE & OEHME, 1986).

In einer experimentellen Studie bei Hunden lag die Ausscheidung von Metaldehyd über den Urin bei unter 1 % der oralen Dosis (BOOZE & OEHME, 1986). Bei Mäusen wurden 8 % der oralen Dosis unverändert über Urin und Kot ausgeschieden (SPARKS et al., 1996). In einem humanmedizinischen Fallbericht wird eine Eliminationshalbwertszeit von 26,9 Stunden angegeben (MOODY & INGLIS, 1992). Genaue Informationen über die Eliminationskinetik bei Tieren sind nicht verfügbar (PUSCHNER, 2001).

Mittlerweile ist bekannt, dass Metaldehyd die Blut-Hirn-Schranke passiert und zu einer erhöhten Aktivität der Monoaminoxidase (MAO) führt. Des Weiteren wurden erniedrigte Konzentrationen von Serotonin (5-HT), Norepinephrin (NE) und des inhibitorischen Neurotransmitters Gamma-Aminobuttersäure (GABA) festgestellt. Die Abnahme dieser Neurotransmitter führt zu einer Reduzierung der Krampfschwelle, zu neuronalen Exzitationen und kann in dem Auftreten von tonisch-klonischen Krämpfen resultieren (KILIAN & FREY, 1973; HOMEIDA & COOKE, 1982a, 1982b; PUSCHNER, 2001). Als Ursache für eine erniedrigte GABA-Konzentration im Gehirn durch Metaldehyd wurde die Hemmung der Glutamat-Decarboxylase (GAD) diskutiert. Diese Annahme konnte in der Studie jedoch nicht bestätigt werden. Der genaue Mechanismus ist bislang nicht bekannt (SPARKS et al., 1996).

1.2.2. Symptome

Der Großteil der von einer Metaldehydvergiftung betroffenen Hunde entwickelt klinische Symptome und benötigt eine entsprechende Therapie. Vergiftungsanzeichen treten in der Regel innerhalb von drei Stunden nach Giftaufnahme auf. Erste systemische Effekte zeigen sich häufig in Form von gastrointestinalen Symptomen wie Salivation, Vomitus und Diarrhö sowie erhöhter Muskelaktivität, die sich meist durch Tremor oder Krämpfe äußert. Die Ausprägung und Entwicklung der klinischen Symptomatik ist abhängig von der aufgenommenen Dosis (FIRTH, 1992b; YAS-NATAN et al., 2007; BATES et al., 2012). Die Hunde zeigen Ataxie, Ganzkörpertremor, Krämpfe, Hypersalivation, Vomitus, Diarrhö, Hyperästhesie, Hyperthermie und entwickeln eine metabolische Azidose. Durch das Auftreten der charakteristischen klinischen Symptome wie anhaltende Krämpfe und eine erhöhte Körpertemperatur wird eine Metaldehydvergiftung auch als „shake and bake syndrome“ bezeichnet. Weitere beschriebene Symptome sind Tachykardie oder Bradykardie, Tachypnoe, Dyspnoe, Nystagmus, Mydriasis oder Miosis und Opisthotonus. In schweren Fällen kann die Vergiftung zu Koma und Tod des Tieres führen (PUSCHNER, 2001; YAS-NATAN et al., 2007; BATES et al., 2012).

Eine vorliegende hochgradige metabolische Azidose könnte zu einer Depression des Zentralnervensystems beitragen. Die erhöhte Muskelaktivität der Patienten trägt vermutlich maßgeblich zu dem Anstieg der inneren Körpertemperatur bei. Patienten entwickeln zum Teil eine hochgradige Hyperthermie von bis zu 43 °C. Ab einer Körpertemperatur von 42 °C erfolgt Zelluntergang und Organversagen (FIRTH, 1992b; PUSCHNER, 2001; YAS-NATAN et al., 2007; BATES et al., 2012). Zu den in der Literatur beschriebenen Komplikationen zählen Aspirationspneumonie, Lungenödem, Leberzirrhose, disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), Thromboembolie, vorübergehende Blindheit und Multiorganversagen (BISHOP, 1975; STUDDERT, 1985b; PUSCHNER, 2001; YAS-NATAN et al., 2007; BATES et al., 2012).

1.2.3. Diagnose

Die Verdachtsdiagnose Metaldehydvergiftung wird in den meisten Fällen durch eine Kombination der klinischen Symptomatik und entsprechender Anamnese gestellt. Häufig beobachten Besitzer bei ihren Hunden die Aufnahme von Schneckenkornködern oder finden eine leere Verpackung vor. Im Zuge einer

symptomatischen Therapie mit Magen- und Darmspülung sowie in Erbrochenem oder Diarrhö des Patienten können blaue oder grüne Köderpellets festgestellt werden. Außerdem weist der Magen- und Darminhalt meist eine blaue oder grüne Verfärbung auf und es kann ein charakteristischer Geruch im Mageninhalt wahrnehmbar sein (STUDDERT, 1985b; FIRTH, 1992b, 1992a; PUSCHNER, 2001; YAS-NATAN et al., 2007).

Zur Diagnosesicherung und zur Abgrenzung möglicher Differentialdiagnosen bieten einige Labore die Bestimmung von Metaldehyd an. Mögliche zu untersuchende Körperflüssigkeiten oder Gewebeprobe sind Mageninhalt, Serum, Urin oder Lebergewebe. Die Proben müssen dafür in gefrorenem Zustand gelagert und versandt werden. Auch Schneckenkornköder selbst können auf Metaldehyd untersucht werden (PUSCHNER, 2001).

Auch in post-mortem-Untersuchungen werden zum Teil Schneckenkornköder im Magendarmtrakt vorgefunden. Häufig wird eine Kongestion von Leber-, Nieren- und Lungengewebe festgestellt. Die Mukosa des Gastrointestinaltraktes kann petechiale oder eckchymotische Blutungen aufweisen. Am Herzen sind subepikardiale oder subendokardiale Blutungen beschrieben. Es können interstitielle Blutungen im Lungengewebe bestehen oder es kann ein Lungenödem vorliegen. Eine Degeneration des Lebergewebes und auch eine Degeneration der Ganglienzellen im Gehirn sind möglich (PUSCHNER, 2001; BATES et al., 2012).

1.2.4. Therapie

Nahezu alle Hunde, die Metaldehyd aufgenommen haben, entwickeln klinische Symptome. Bei einem Großteil der Fälle ist ein stationärer Aufenthalt mit entsprechender Therapie und Überwachung nötig. Vergiftungen bei kleinen Hunden erfordern sofortiges therapeutisches Handeln, da bereits die Aufnahme weniger Köderpellets schwerwiegende Vergiftungsanzeichen hervorrufen kann (FIRTH, 1992a, 1992b; YAS-NATAN et al., 2007). Bisher ist kein spezifisches Antidot bekannt (FIRTH, 1992a; BATES et al., 2012). Es gibt bislang auch keine Möglichkeit einer schnellen Elimination von Metaldehyd aus dem Blut. Daher richtet sich die herkömmliche Therapie einer Metaldehydintoxikation nach den allgemeinen Prinzipien zur Behandlung von Vergiftungen mit Dekontamination durch Magen- und Darmspülung und einer unterstützenden symptomatischen

Therapie. Sollten die Tiere bei Vorstellung noch keine Symptome aufweisen, kann ein Antiemetikum verabreicht werden. Häufig wird zusätzlich Aktivkohle oral verabreicht mit dem Ziel die gastrointestinale Absorption von Metaldehyd zu reduzieren (FIRTH, 1992b; YAS-NATAN et al., 2007; BATES et al., 2012). In einer experimentellen Studie mit Ratten konnte die Absorption von Metaldehyd durch die orale Gabe von Aktivkohle um 45 % reduziert werden (SHINTANI et al., 1999). Auch die Durchführung wiederholter Magenspülungen kann nützlich sein. Durch eine zweite Spülung nach 36 Stunden konnten bei einigen Hunden erneut Schneckenkornreste aus dem Magen entfernt werden (FIRTH, 1992b; YAS-NATAN et al., 2007).

Im Vordergrund der symptomatischen Therapie steht die Kontrolle der lebensbedrohlichen Krampfanfälle. Dazu werden Muskelrelaxantien, Sedativa und Anästhetika eingesetzt. Am häufigsten finden Benzodiazepine und Barbiturate Anwendung. Neben Diazepam (0,5 – 5 mg/kg i. v.), Phenobarbital (6 mg/kg i. v., i. m.) und Pentobarbital (3 – 15 mg/kg i. v., 1 – 6 mg/kg/Stunde i. v.) werden auch Acepromazin, Ketamin und Propofol zur Behandlung einer Metaldehydintoxikation verwendet. Außerdem ist der Einsatz der zentralen Muskelrelaxantien Methocarbamol (150 mg/kg i. v.) und Guaifenesin (100 mg/kg i. v.) beschrieben. Meist reicht ein Medikament alleine zur Kontrolle der Krampfanfälle der Patienten nicht aus. Es werden häufig Kombinationen dieser Medikamente angewendet (FIRTH, 1992b; PUSCHNER, 2001; YAS-NATAN et al., 2007; ZIMMERMANN et al., 2010; BATES et al., 2012). Wenn bei schweren Vergiftungen die Anfälle durch den Einsatz antikonvulsiver Medikamente nicht zu unterbinden sind, muss eine Allgemeinanästhesie über Dauertropfinfusion oder Inhalationsanästhesie durchgeführt werden. Die Tiere müssen dann zum Teil maschinell beatmet werden. Dies erfordert ein umfangreiches und aufwändiges intensivmedizinisches Management und beinhaltet ein zusätzliches Anästhesierisiko für den Patienten. In einer retrospektiven Studie über 26 Metaldehydvergiftungsfälle bei Hunden wurde am häufigsten Diazepam und Ketamin verwendet. Diazepam wurde in einer Dosierung von 2 – 5 mg/kg i. v. verabreicht, gefolgt von einer Kombination aus 0,25 mg/kg Diazepam und 5 mg/kg Ketamin i. v. und nach Bedarf weiteren Bolusgaben von Diazepam und Ketamin. Weniger häufig wurde Xylazin, Methocarbamol und Guaifenesin angewendet. Bei der Kombination aus Diazepam und Ketamin traten keine

gravierenden Nebenwirkungen auf. Alle 26 Hunde mit Metaldehydvergiftung überlebten (FIRTH, 1992b).

Eine weitere retrospektive Studie zu Metaldehydvergiftungsfällen bei Hunden gibt an, dass von 772 betroffenen Tieren über 64 % Sedativa erhalten haben. In über 50 % wurden Benzodiazepine verwendet. Barbiturate erhielten knapp 30 %, Propofol 11,6 % und Acepromazin 9 % der Hunde. Weniger häufig wurden Isofluran, Methocarbamol und Ketamin angewendet. Bei 45,8 % der Hunde, die Sedativa erhielten, war der Einsatz von mehr als einem sedativen oder anästhetischen Medikament nötig. In 18 Vergiftungsfällen waren Informationen über die Dauer der Sedation vorhanden. Diese lag durchschnittlich bei 33,7 Stunden, mit einer Spannweite von vier bis 120 Stunden (BATES et al., 2012).

In einer retrospektiven Datenauswertung von 18 Metaldehydvergiftungsfällen bei Hunden in Jerusalem wurde am häufigsten Diazepam (0,28 – 6,3 mg/kg i. v.) als antikonvulsive Therapie eingesetzt. Außerdem fanden Phenobarbital (2,1 – 4,8 mg/kg i. m.) und Pentobarbital (0,4 – 3,4 mg/kg i. v.) Anwendung. Zehn der 18 Hunde benötigten zwei der drei beschriebenen Medikamente, zwei der 18 Hunde benötigten eine Kombination aller drei Medikamente. Bei neun Hunden wurde eine Allgemeinanästhesie mit Isofluran durchgeführt. Bei acht dieser neun Hunde wurde vor Einleitung der Allgemeinanästhesie erfolglos versucht, die neurologischen Symptome mit antikonvulsiven Medikamenten ohne Allgemeinanästhesie zu kontrollieren. Die Anästhesiezeit belief sich auf fünf bis 24 Stunden (YAS-NATAN et al., 2007).

Die nötige Dauer einer Allgemeinanästhesie variiert in Abhängigkeit vom Schweregrad der Symptome. In der veterinärmedizinischen Literatur ist die Dauer einer allgemeinen Inhalationsanästhesie beim Hund in Zusammenhang mit einer Metaldehydvergiftung mit bis zu 72 Stunden beschrieben (ZIMMERMANN et al., 2010).

Zur symptomatischen Therapie gehört außerdem die Gabe von Sauerstoff und intravenöser Infusion. Patienten mit einer starken Hyperthermie können aktiv gekühlt werden. Bäder mit kaltem Wasser, nasse Handtücher und kalte Luft sind beschrieben. Bei aktiven Maßnahmen zur Kühlung sollten diese rechtzeitig abgebrochen werden, um eine Unterkühlung der Tiere zu vermeiden. Zeitgleich ist zur Regulierung der inneren Körpertemperatur die Kontrolle von

Muskeltremor und Krämpfen wichtig. Nach initialer Stabilisierung und bei Patienten in Allgemeinanästhesie müssen die Tiere häufig wieder aktiv gewärmt werden, um eine Unterkühlung zu verhindern.

Weitere therapeutische Maßnahmen beinhalten die Korrektur von Elektrolyt- und Säure-Basen-Abweichungen. Durch die Verabreichung einer intravenösen Infusion, z. B. Ringer-Laktat-Lösung, und die Gewährleistung einer adäquaten Gewebepfusion lassen sich diese Abweichungen in der Regel korrigieren. In Fällen einer schweren metabolischen Azidose kann Natriumbikarbonat verabreicht werden, sofern eine adäquate Abatmung gewährleistet ist.

Nach der initialen Notfalltherapie sollten die Tiere weiterhin kontinuierlich klinisch und wenn möglich apparativ überwacht werden, um eine potentielle Verschlechterung des Zustandes rechtzeitig zu erfassen und entsprechende Maßnahmen ergreifen zu können. Um das Risiko einer Aspiration von Speichel oder Mageninhalt gering zu halten, sollten Kopf- und Schulterbereich des Patienten erhöht gelagert werden (FIRTH, 1992b; YAS-NATAN et al., 2007; BATES et al., 2012).

1.2.5. Prognose

Die Angaben zur Mortalitätsrate für die Schneckenkornvergiftung beim Hund variieren in der veterinärmedizinischen Literatur von 0 % bis 23 %. Häufig sind keine Angaben über die genaue Todesursache verfügbar (STUDDERT, 1985b; FIRTH, 1992b; CAMPBELL, 2000; YAS-NATAN et al., 2007; BATES et al., 2012).

Überlebende Patienten genesen meist innerhalb weniger Tage vollständig (FIRTH, 1992b; YAS-NATAN et al., 2007). Der Zeitraum von Giftaufnahme bis zur vollständigen Erholung lag in einer retrospektiven Studie von 61 dokumentierten Fällen bei durchschnittlich 39 Stunden, mit einer Spannweite von ein bis 120 Stunden (BATES et al., 2012). In einer weiteren Studie mit 18 Hunden lag die mittlere Klinikaufenthaltsdauer bei zwei Tagen, mit einer Spannweite von ein bis fünf Tagen (YAS-NATAN et al., 2007). In schweren Vergiftungsfällen oder durch die Entwicklung von Komplikationen kann die Genesungszeit bis zu einigen Wochen dauern (PUSCHNER, 2001).

Neben einem schweren Krankheitsverlauf kann auch eine vorübergehend auftretende Blindheit der Patienten eine längere Erholungsphase erfordern

(BISHOP, 1975; STUDDERT, 1985b; BATES et al., 2012). BISHOP berichtet über eine drei Monate alte Labrador-Hündin, die mit schweren neurologischen Symptomen auf Grund einer Metaldehydintoxikation vorgestellt wurde. Sie überlebte mit symptomatischer Therapie, war aber auf beiden Augen blind. Ansonsten fielen keine Veränderungen in der klinischen Untersuchung auf. Eine ophthalmoskopische Untersuchung beider Augen ergab keine Auffälligkeiten. Der Pupillarreflex war beidseits vorhanden. Es wurde eine zentral vorliegende Problematik vermutet, möglicherweise eine Blutung, die Druck auf das Sehzentrum verursache. Die Hündin erlangte ihr Sehvermögen mit normalem Visus drei Wochen nach Giftexposition langsam wieder zurück. Die genaue Ursache der vorübergehenden Blindheit ist unbekannt (BISHOP, 1975). In einer retrospektiven Studie zu Metaldehydvergiftungsfällen bei Hunden wurde bei zehn von 597 Patienten eine Blindheit dokumentiert. Es stehen keine Informationen über die Dauer, die Entwicklung oder die Ursache der Blindheit zur Verfügung. Acht der zehn betroffenen Hunde litten auch an Krampfanfällen, zwei Hunde hatten Muskelzuckungen. Es wird vermutet, dass die Blindheit der Tiere eher aus den Anfällen resultierte als ein toxischer Effekt des Giftstoffs Metaldehyd zu sein (BATES et al., 2012).

Außerdem wiesen einige Hunde mit Metaldehydintoxikation erhöhte Leberwerte sowie anhaltend erhöhte Bilirubinwerte auf. Nach scheinbarer Genesung ist ein verspätet auftretendes Leberversagen zwei bis drei Tage nach Exposition möglich. Als weitere Todesursache wird ein mögliches Versagen des Atmungsorganes angegeben (STUDDERT, 1985b; PUSCHNER, 2001; YAS-NATAN et al., 2007; BATES et al., 2012).

1.3. Weiterentwicklung von Präparaten

Durch neue Produktrichtlinien wurde in den USA, Australien, Neuseeland, England und Belgien bereits versucht, die Anzahl der Vergiftungsfälle durch Molluskizide bei Haustieren zu reduzieren. Die Regelungen betreffen vor allem die Beschriftung und Zusammensetzung von Schneckenkornpräparaten (KITCHELL et al., 1978; STUDDERT, 1985b; FIRTH, 1992a; PUSCHNER, 2001; VAN PELT & MOSTIN, 2010; BATES et al., 2012; BUHL et al., 2013).

In Kalifornien erfolgten 1975 Bemühungen, die Molluskizide weniger schmackhaft für Haustiere zu gestalten. Ursprüngliche Produkte, wie die früher

verwendeten Meta-Brennstofftabletten, enthielten keine getreidehaltigen Zusätze wie die heute gebräuchlichen Molluskizide und wirkten dennoch attraktiv auf Nacktschnecken. Hersteller von Schneckenkornpräparaten in Kalifornien führten in gemeinsamer Kooperation mit der *University of California* und dem *California Department of Food and Agriculture* Studien zur Schmackhaftigkeit von Schneckenkornpräparaten durch. Die Hersteller wurden angehalten nur Produkte zu vertreiben, die von Hunden nicht gerne aufgenommen werden. In Kalifornien konnte anschließend ein Rückgang der Metaldehydvergiftungsfälle bei Hunden verzeichnet werden (KITCHELL et al., 1978; FIRTH, 1992a; PUSCHNER, 2001). Des Weiteren wurden den Produkten in den USA ab dem Jahr 2003 Bitterstoffe zugefügt, um die Produkte weniger attraktiv zur oralen Aufnahme für Haustiere und Kinder zu gestalten. Diese Maßnahme zeigte jedoch keinen nachweisbaren Effekt. Die *US Environmental Protection Agency* forderte 2006 außerdem eine neue Kennzeichnung von Metaldehydprodukten. Diese sollte auch graphische Darstellungen im Sinne von Gefahrensymbolen mit Kindern und Haustieren enthalten. Dem *National Pesticide Information Center (NPIC)* zufolge wurde in den USA ab dem Jahr 2006 ein stetiger Abfall von Metaldehydvergiftungsfällen bei Tieren registriert. Ob dieser Trend auf die neue Kennzeichnungsregelung zurückzuführen ist, ist nicht mit Sicherheit zu sagen (BUHL et al., 2013).

In Belgien wurden im Jahr 2007 und in England im Jahr 2011 ebenfalls neue Kennzeichnungsrichtlinien festgelegt. Dazu zählen unter anderem die Kennzeichnung durch Gefahrensymbole, genaue Anwendungshinweise, der Zusatz von Bitterstoffen und ein Sicherheitsverschluss zum Schutz von Kindern. In Belgien zeigten die 2007 eingeführten Vorgaben keinen nachweisbaren positiven Effekt bezüglich der Vergiftungsfälle bei Hunden (VAN PELT & MOSTIN, 2010; BATES et al., 2012).

2. Extrakorporale Blutreinigungsverfahren

Extrakorporale Blutreinigungsverfahren finden in der Humanmedizin und in der Tiermedizin Anwendung. Die Hämodialyse (HD) stellt die meist gewählte Therapieform dar (HOLUBEK et al., 2008; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013).

2.1. Grundlagen

Die HD wurde in der Tiermedizin erstmalig 1990 an dem *Veterinary Medical*

Teaching Hospital der *University of California* in Davis, USA eingesetzt und ist seitdem der Veterinärmedizin als therapeutische Option verfügbar (FISCHER et al., 2004). Für die tiermedizinischen Patienten wird das Equipment der neonatalen Hämodialyse des Menschen verwendet (ELLIOTT, 2000). Der Einsatz extrakorporaler Blutreinigungsverfahren gewinnt in der Veterinärmedizin bei Hunden und Katzen stetig an Bedeutung. Sowohl bei Tierärzten als auch bei Besitzern steigt das Interesse und Bewusstsein für diese therapeutische Option (FISCHER et al., 2004; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013). Entsprechende Einrichtungen für Tiere sind mittlerweile weltweit verfügbar (<http://queenofthenephron.net>). In Deutschland gibt es derzeit sechs Dialysezentren für Tiere (<http://www.tierdialyse.com/>).

Hämodialyse und Hämoperfusion (HP) sind extrakorporale Blutreinigungsverfahren, die vor allem in der Intensivmedizin Einsatz finden. Das Blut wird aus dem Körper des Patienten geleitet, fließt über ein Schlauchsystem durch eine extrakorporale Filtereinheit und wird dem Patienten dann zurückgeführt. In der Filtereinheit werden bestimmte Stoffe aus dem Blut entfernt (ELLIOTT, 2000; BORKAN, 2002; FISCHER et al., 2004). Um die erforderlichen Blutflüsse erreichen zu können, wird ein großlumiger Gefäßzugang benötigt. In der Veterinärmedizin wird hierfür ein doppellumiger zentraler Venenkatheter in die *Vena jugularis* gelegt, wodurch ein kontinuierlicher Blutfluss vom Patienten zu der extrakorporalen Filtereinheit und zum Patienten zurück gewährleistet werden kann. Damit das Blut in dem Schlauchsystem nicht gerinnt, ist eine Antikoagulation erforderlich. Zur Durchführung extrakorporaler Techniken beim Kleintier ist ein Mindestkörpergewicht von 1,5 Kilogramm notwendig, da sich während der Verfahren ein gewisser Blutanteil des Tieres außerhalb des Körpers befindet. Bei kleinen oder hämodynamisch instabilen Patienten ist es mitunter nötig, das Schlauchsystem mit kolloidalen Lösungen oder Blutprodukten vorzufüllen (ELLIOTT, 2000; FISCHER et al., 2004; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013).

Sowohl die HD als auch die HP wurden in der Tiermedizin bereits bei Medikamentenüberdosierungen oder Vergiftungen erfolgreich angewendet. Für einige Giftstoffe, darunter Metaldehyd, ist die Effektivität extrakorporaler Verfahren noch nicht untersucht. Ob eine extrakorporale Entfernung von Giftstoffen möglich und effektiv ist, hängt von den Eigenschaften der zu

eliminierenden Substanz und der Extraktionstechnik ab (DE PONT, 2007; KIM & GOLDFARB, 2010). Die Molekülgröße, der Proteinbindungsgrad und das Verteilungsvolumen der Substanz stellen dabei die Hauptkriterien dar. Bezüglich Molekülgröße und Proteinbindungsgrad unterscheiden sich die Voraussetzungen der HD und der HP. Mittels HP können auch größere und stärker Protein-gebundene Moleküle entfernt werden. Das relative Verteilungsvolumen der Substanz im Körper des Patienten sollte für die erfolgreiche Anwendung aller extrakorporalen Blutreinigungsverfahren möglichst niedrig sein und zumindest unter 1 l/kg liegen (BORKAN, 2002; KENO & LANGSTON, 2011).

2.2. Verfahren

Verschiedene Methoden zur extrakorporalen Blutreinigung stehen zur Verfügung. Dazu zählen die Verfahren HD, HP und die kombinierte Hämodialyse und Hämo-perfusion (HD/HP) (BORKAN, 2002).

2.2.1. Hämodialyse

Durch die HD erfolgt die Entfernung gelöster Substanzen und Flüssigkeit aus dem extrakorporal zirkulierenden Blut des Patienten. Das Prinzip der HD beruht auf Diffusion über eine semipermeable Membran. Das Blut wird dabei über ein Schlauchsystem in den Dialysator geleitet. In dem Dialysator fließt das Blut im Gegenstromprinzip zu dem Dialysat, getrennt durch eine Membran mit Poren bestimmter Größe. Entsprechend den Konzentrationsgradienten erfolgt ein Stoffaustausch über die semipermeable Membran zwischen dem Blut und dem Dialysat, wodurch dialysierbare Substanzen aus dem Blutkreislauf des Patienten eliminiert werden können (ELLIOTT, 2000; FISCHER et al., 2004; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013).

Die Effektivität der HD wird von den Eigenschaften der zu eliminierenden Substanz beeinflusst. Ein wichtiges Kriterium stellt die Molekülgröße dar. Diese sollte für den erfolgreichen Einsatz der HD unter 500 Dalton liegen. Außerdem ist ein geringer Proteinbindungsgrad (< 80 %) Voraussetzung für die erfolgreiche Elimination mittels HD (ELLIOTT, 2000; DE PONT, 2007; KENO & LANGSTON, 2011; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013). Durch den Einsatz neuerer High-Flux-Dialysatoren können heutzutage auch größere Moleküle mittels HD entfernt werden. In Abhängigkeit von der Porengröße der semipermeablen Membran ist die Elimination von Substanzen einer Molekülgröße

bis zu 1.000 – 5.000 Dalton möglich (MATZKE, 2002; FISCHER et al., 2004; GOODMAN & GOLDFARB, 2006; DE PONT, 2007; KIM & GOLDFARB, 2010). Metaldehyd weist ein Molekulargewicht von 176,2 Dalton auf (VON BURG & STOUT, 1991). Damit erfüllt Metaldehyd die Voraussetzung bezüglich der Molekülgröße zur erfolgreichen Elimination mittels HD. Über das Verteilungsvolumen und den Grad der Proteinbindung von Metaldehyd im Organismus stehen keine genauen Angaben zur Verfügung.

Mittels HD können metabolische Stoffwechselendprodukte aus dem Blut eliminiert, bestimmte Giftstoffe entfernt und auch der Hydratationszustand des Patienten ausgeglichen werden. Durch die Möglichkeit der variablen Zusammensetzung des Dialysats ist außerdem ein Ausgleich von Elektrolyt- und Säure-Basen-Veränderungen möglich (ELLIOTT, 2000; FISCHER et al., 2004).

Das Haupteinsatzgebiet der HD bei Hund und Katze ist das akute Nierenversagen. Patienten im akuten Nierenversagen leiden unter den Auswirkungen der zum Teil hochgradigen Urämie und können durch den Einsatz der HD eine metabolische Stabilität und deutliche Verbesserung des Allgemeinbefindens erlangen. Des Weiteren ist in der Kleintiermedizin die HD zur Behandlung bestimmter Vergiftungen und Medikamentenüberdosierungen bereits etabliert und erfolgreich eingesetzt worden. Bei passenden Eigenschaften der zu eliminierenden Substanz reicht meist eine einzige Dialysebehandlung aus, um den Giftstoffgehalt im Körper ausreichend zu reduzieren, dass keine klinischen Auswirkungen auftreten. Die HD wurde bereits bei Vergiftungen mit Ethylenglycol und toxischen Alkoholen, wie Ethanol oder Methanol, erfolgreich eingesetzt. Als weitere Indikationen für die HD werden in der Literatur Intoxikationen mit Lithium, Salicylaten, Metformin, Valproinsäure und Carbamazepin angegeben (ELLIOTT, 2000; FISCHER et al., 2004; DE PONT, 2007; HOLUBEK et al., 2008; KIM & GOLDFARB, 2010; COWGILL, 2011; KENO & LANGSTON, 2011).

2.2.2. Hämo-perfusion

Die HP stellt ein extrakorporales Adsorptionsverfahren dar. Adsorption beruht auf dem Prinzip der molekularen Bindung eines gelösten Stoffes an ein bestimmtes Oberflächenmaterial, das Adsorptionsmedium. Wie bei der HD wird auch bei der HP das Blut über ein Schlauchsystem in eine Filtereinheit geleitet. Die Filtereinheit ist eine Hämo-perfusionskartusche, die ein Adsorptionsmedium

enthält. Bei der HD erfolgt ein Stoffaustausch über eine physikalische Barriere, der semipermeablen Membran zwischen Blut und Dialysat. Bei der HP ist keine physikalische Barriere vorhanden und das Blut steht in direktem Kontakt zu dem Adsorptionsmedium. Bestimmte Giftstoffe können so durch die Bindung an die in der Kartusche enthaltenen Adsorbentien aus dem Blut des Patienten entfernt werden. Das Adsorptionsmedium sollte eine hohe Bindungsaffinität zu der zu eliminierenden Substanz aufweisen und eine geringe Affinität zu normalen Blutkomponenten besitzen, ungiftig und Blut-kompatibel sein sowie steril und frei von Endotoxinen. Das früher verwendete Anionenaustauschharz führte zu einem hohen Aufkommen an Komplikationen, wie beispielsweise Hämolyse oder Thrombozytopenie, und wird üblicherweise nicht mehr eingesetzt. Aktivkohle ist das am häufigsten verwendete Adsorptionsmedium zur Behandlung von Vergiftungen. Die Adsorptionsfähigkeit der Aktivkohle hängt zu einem großen Teil von der zugänglichen Oberfläche ab, die sich bei hundert Gramm auf mehrere Tausend Quadratmeter beläuft (GARELLA, 1988; CHANDY & SHARMA, 1998; DE PONT, 2007; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013).

Voraussetzung für eine effektive Giftstoffelimination mittels HP ist vor allem eine hohe Bindungsaffinität des Giftstoffes zu dem in der Hämoperfusionskartusche enthaltenem Adsorptionsmedium. Im Gegensatz zu der HD können durch die HP auch Moleküle mit einem höheren Molekulargewicht, einer stärkeren Proteinbindung oder höherer Lipidlöslichkeit eliminiert werden (GARELLA, 1988; SHALKHAM et al., 2006; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013).

Das Einsatzgebiet der HP sind verschiedene akute Vergiftungen. Anwendung findet dieses Verfahren hauptsächlich bei Giftstoffen, die über eine HD nicht ausreichend aus dem Körper eliminiert werden können (COWGILL & GUILLAUMIN, 2013). Hämoperfusion ist das Blutreinigungsverfahren der Wahl zur Therapie von Vergiftungen mit Theophyllin, Barbituraten und Paraquat (GARELLA, 1988; SHALKHAM et al., 2006; DE PONT, 2007; HOLUBEK et al., 2008; GIL et al., 2010; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013).

2.2.3. Kombiniertes Verfahren

Die Kombination von Hämodialyse und Hämoperfusion (HD/HP) ist die effektivste Methode zur größtmöglichen Giftstoffentfernung in kürzester Zeit und vereint die diffusiven Eigenschaften der HD und die adsorptiven Eigenschaften

der HP. Zur Installation wird das Schlauchsystem modifiziert, um die beiden Filtereinheiten nacheinander schalten zu können. Die Anwendung wird zum Beispiel bei einer Theophyllinintoxikation empfohlen. Das Verfahren wurde bereits erfolgreich zur Therapie einer Thalliumvergiftung beim Menschen und einer Baclofenvergiftung beim Hund eingesetzt (DE BACKER et al., 1982; BORKAN, 2002; SCOTT et al., 2007; KIM & GOLDFARB, 2010).

III. PUBLIKATION

Evaluation of the in vitro efficacy of hemodialysis, hemoperfusion, and the combined approach on the removal of metaldehyde from canine plasma

Elisabeth L. Mauser, DVM; Birgit Puschner, DVM, PhD, DABVT; Sven Reese, Dr. med. vet.; Katrin Hartmann, Dr. med. vet. habil., DECVIM and René Doerfelt, Dr. med. vet., DECVAA

From the Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich 80539, Germany (Mauser, Hartmann, Doerfelt), Institute of Veterinary Anatomy, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-University, Munich 80539, Germany (Reese), and the Department of Molecular Biosciences, California Animal Health and Food Safety Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA (Puschner).

This study was supported by the Morris Animal Foundation (Grant ID # D14CA-812; Denver, Colorado 80231, USA).

The authors declare no conflicts of interest.

Presented in part at the 13th EVECCS congress 2014 in Prague, Czech Republic.

Address correspondence and reprint requests to

Dr. René Doerfelt, Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Veterinärstr. 13, Munich 80539, Germany. Email: r.doerfelt@medizinische-kleintierklinik.de

Running title: Metaldehyde removal by extracorporeal techniques

Abbreviations

GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry
HD	hemodialysis
HD/HP	in series hemodialysis and charcoal hemoperfusion
HP	charcoal hemoperfusion
RSD	relative standard deviation
SP	sampling point

Abstract

Objective – To evaluate the effect of hemodialysis, hemoperfusion, and a combined approach on the removal of metaldehyde from canine plasma.

Design – In vitro study.

Setting – University Veterinary Teaching Hospital Laboratory.

Animals – None.

Interventions – None.

Measurements and Main Results – Metaldehyde-fortified canine plasma was prepared. Hemodialysis (HD), charcoal hemoperfusion (HP), and in-series hemodialysis and charcoal hemoperfusion (HD/HP) were applied in triplicate to eliminate metaldehyde from plasma. Plasma samples were obtained before starting the procedure and subsequently after every processed total plasma volume until plasma had been processed 10 times. Plasma metaldehyde concentration was quantitatively assayed by gas chromatography-mass spectrometry. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, repeated measures ANOVA, and Bonferroni post hoc test, and by calculating the coefficient of variation from duplicate measurements, binomial distribution, and by Bland-Altman analysis. Statistically significant reduction in metaldehyde concentration was reached by all 3 techniques. Reduction of metaldehyde concentration of more than 95% was achieved after processing the plasma volume 4 times applying HD, 8 times applying HP, and 2 times applying HD/HP. Efficacy in reduction of metaldehyde concentration differed significantly between the 3 procedures ($P < 0.001$). In-series hemodialysis and charcoal hemoperfusion was more effective in metaldehyde removal than HD ($P = 0.003$) and HP ($P < 0.001$), and HD was more effective than HP ($P = 0.002$).

Conclusions – Metaldehyde was effectively removed by all applied extracorporeal blood purification techniques in vitro. However, the combination of both techniques was more effective than HD or HP alone. Further clinical studies are warranted to confirm therapeutic benefits in patients.

Keywords: decontamination, dialysis, dog, extracorporeal blood purification,

molluscicide, snail bait

Introduction

Metaldehyde, a molluscicide widely used for the control of snails and slugs, is toxic to mammals and birds.^{1,2} Incidents of metaldehyde poisoning in dogs have been reported worldwide.¹⁻⁵ Between 1985 and 2010, the Veterinary Poisons Information Service in London reported 1,912 metaldehyde inquiries affecting dogs.¹ Between 2004 and 2008, metaldehyde poisoning was the most common cause of seizures associated with intoxications in dogs at the University of Veterinary Medicine in Hannover, Germany.⁴ In the US, the National Pesticide Information Center registered 1,285 metaldehyde exposure incidents in animals including 35 canine deaths between 2001 and 2011.²

Clinical signs of metaldehyde poisoning include vomiting, muscle tremors, twitching, ataxia, seizures, severe hyperthermia, metabolic acidosis, coma, and death.^{1,5} Treatment consists of seizure control, standard decontamination procedures, and symptomatic and supportive care. No specific antidote is available.⁶ Intensive treatment and anticonvulsant agents are frequently required to control seizures in affected dogs, and in severe cases of intoxication even general anesthesia may be indicated.^{1,5,7} Adverse sequelae to intoxication include respiratory failure, hepatic damage, and temporary blindness.^{1,5,8,9} Clinical recovery in surviving patients typically requires 2–3 days, but can be prolonged to a few weeks in cases with complications.^{1,5,9-11} In the veterinary literature, mortality rates are reported to be 0%–23%, but detailed information about the cause of death is often not available.^{1,5,8,11,12}

Hemodialysis (HD) and charcoal hemoperfusion (HP) are methods to

accelerate the elimination of different substances from a patient's blood. Both methods are proven to be effective at removing certain drugs and toxicants from circulating blood. For a compound to be effectively removed by extracorporeal techniques, it must have a low volume of distribution.^{13,14} The principle of HD is removal by diffusion across a semipermeable membrane, following the concentration gradient between blood and dialysate.^{15,16} Besides the removal of uremic toxins in severely uremic patients, HD is successfully used to treat acute drug overdose and poisoning in dogs, such as ethylene glycol and ethanol intoxications.¹⁴⁻¹⁷ For a substance to be an ideal candidate for removal by HD, it must be small in size and have low plasma protein binding.^{14,15,18} Metaldehyde has a molecular weight of 176.2 Da, making it eligible to cross dialyzer membrane pores and, therefore, a viable candidate for HD.¹⁹ Interestingly, the volume of distribution and plasma protein binding properties for metaldehyde have not been published. Thus, prediction of blood purification is difficult to make. The principle of HP is removal of the toxicant by direct adsorption on activated charcoal.^{18,20} Unlike HD, HP can also effectively remove high-molecular weight, protein-bound compounds. For example, HP is the preferred method for removal of theophylline and barbiturates.²⁰⁻²² In-series hemodialysis and charcoal hemoperfusion (HD/HP) has successfully been applied in a dog with baclofen intoxication.²³

The objective of this *in vitro* study was to evaluate the efficacy of high-flux HD, HP, and a combined approach on the removal of metaldehyde from canine plasma. We hypothesized that all techniques would reduce plasma metaldehyde concentrations in excess of 95%.

Materials and Methods

Preparation of metaldehyde-fortified canine plasma

Frozen canine plasma (3,600 mL) was obtained from the in-house veterinary blood bank. The plasma was a mixture of plasma samples collected from healthy dogs during voluntary routine blood donations between 2010 and 2012. A stock solution (72 mL) of 5 mg/mL metaldehyde^a in chloroform^b was pipetted slowly into 3,600 mL plasma to create a solution of 100 µg/mL metaldehyde-fortified canine plasma. The plasma was under constant mixing in a chemical fume hood on a magnetic stirrer^c until chloroform was volatilized. A 0.5 mL aliquot of the metaldehyde-fortified plasma was collected to determine total protein and albumin concentrations by our in-house laboratory.^d Aliquots of 400 mL of metaldehyde-fortified canine plasma were added to 9 parenteral nutrition bags^e and stored overnight at 4°C. One plasma bag was used for each of the following procedures.

Extracorporeal blood purification techniques

Three extracorporeal blood purification techniques were applied to eliminate metaldehyde from canine plasma. These were HD, HP, and HD/HP using a commercial dialysis machine^f with pediatric tubing.^g Each technique was conducted in triplicate. For HD, pediatric high-flux dialyzers^h and for HP, activated charcoal columnsⁱ were used. For HD/HP, the circuit of the dialysis machine was modified with an adapter^j to include the hemoperfusion cartridge after the dialyzer. Anticoagulation was provided by an injection of 2,000 IU of unfractionated heparin^k to 400 mL metaldehyde-fortified canine plasma, followed by a continuous rate infusion of heparin (4,000 IU/h diluted up to 5 mL 0.9%

NaCl). The plasma bag was placed on a platform shaker¹ during the procedure. Plasma flow was set at 80 mL/min. Dialysate solution was composed of purified water, bicarbonate,^m and an acid solutionⁿ with concentrations of 4 mmol/L potassium, 140 mmol/L sodium, and 24 mmol/L bicarbonate. The dialysate flow rate was 500 mL/min at a temperature of 38°C. Tubing lines were connected to the plasma bag and the treatment started as a dry connection procedure. One and a half milliliters of plasma were collected from the injection port of the plasma bag before starting the procedure and every 5 minutes thereafter from the arterial injection port of the tubing until the end of the procedure (50 minutes total processing time). Each individual sample was transferred to a 2 mL tube,^o labeled, and stored at -80°C. In total, 11 samples were collected during each of 9 procedures. The 5 minute-interval sampling time points were labeled SP 0 to SP 10. With a plasma flow rate of 80 mL/min, the total plasma volume of 400 mL was processed once every 5 minutes and accordingly once per SP.

Quantitative metaldehyde analysis

For quantitative analysis of metaldehyde, samples were shipped to the laboratory^p on dry ice and stored at -80°C for a maximum of 5 weeks before analysis. For extraction of metaldehyde, 0.5 g of plasma from each thawed sample was transferred into a 15 mL screw-capped test tube^q and 2 mL ethyl acetate^r were added. The test tubes were placed on an overhead shaker^s for 50 minutes followed by centrifugation^t at 466 G for 5 minutes at 25°C. Thereafter, 300 µL of the supernatant were pipetted into a 2 mL HP autosampler vial^u with inlay and sealed immediately with a hole-cap and silicone septum.^v The concentration of metaldehyde was determined quantitatively by gas chromatography-mass

spectrometry (GC-MS). At least each third sample ($n = 38$) was analyzed in duplicate to determine instrument reproducibility.

Gas chromatography-mass spectrometry analysis was performed using a HP 6890 GC system^w equipped with a HP 5973 mass-selective detector^x and an Agilent autosampler.^y The GC column was an HP-1 Methyl Siloxane capillary column (15 m x 0.25 mm inner diameter x 0.25 μm film thickness).^z The GC conditions were as follows: injector temperature 240°C; oven temperature 40°C for initial 3 minutes, then increased to 65°C at a rate of 10°C/min followed by increments of 30°C/min to a final temperature of 290°C; carrier gas (helium) flow rate 2.6 mL/min. The chromatographic run was completed in 13 minutes and 50 seconds.

The quantification of metaldehyde was performed using selected ion monitoring mode. The following ions were monitored: m/z 45.0, m/z 89.0, m/z 117.0, and m/z 131. Injections of 2 μL were made in the splitless mode. Calibration samples were prepared by dilution of neat metaldehyde^{aa} in methanol,^{ab} followed by subsequent dilutions in ethyl acetate, resulting in final metaldehyde concentrations of 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.625 $\mu\text{g/mL}$, 1.25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, and 25 $\mu\text{g/mL}$. Accuracy of the method was assessed using fortified control samples. Control matrix, canine serum, was used and mixed with unfractionated heparin^{ac} consistent with the preparation of study samples. For fortification with metaldehyde, a stock solution of 730 $\mu\text{g/mL}$ metaldehyde in methanol was prepared to generate final concentrations of 5 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$ metaldehyde in canine serum. The fortified and unfortified control samples were extracted the same way as described above. Each analytical run included a full calibration curve at the beginning and end, a reagent blank, an unfortified control sample, a set of study samples, and at least 2 fortified (5 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$)

control samples.

Metaldehyde was confirmed by comparison of retention time and mass spectra to that of an analytical standard. The concentration of metaldehyde was calculated using regression analysis. The equation of the line was determined by the standards and the coefficient of determination (r^2). The peak area of the detected analyte had to be within the range of the calibration curve. The analysis was acceptable if r^2 was > 0.98 and the relative standard deviation in percent (%RSD) was less than 20%. The %RSD was determined to calculate the recovery of known fortified control samples. The unfortified control sample and the reagent blank had to be negative and the percent recovery for fortifications had to be between 70–120% to be acceptable. The percent recovery was calculated by dividing the $\mu\text{g/mL}$ found in the fortified control by the fortification level and multiplying it by 100.

Stability study

A preliminary study was performed to assess the stability of metaldehyde in spiked canine sera at -80°C over a period of 5 weeks. Canine serum was tested for metaldehyde by GC-MS prior to spiking. A stock solution of $5,280 \mu\text{g/mL}$ metaldehyde in chloroform^{ad} was prepared to create fortified canine serum samples at $5 \mu\text{g/mL}$ and $100 \mu\text{g/mL}$. Aliquots of unfortified and fortified control samples were analyzed immediately. Additional aliquots of 0.6 mL of unfortified and fortified control samples were placed in 1.5 mL screw-cap plastic cryotubes^{ae} and stored at -80°C . For the duration of 5 weeks, aliquots were thawed at regular intervals and analyzed by GC-MS to assess for a potential decrease in metaldehyde concentration over time of storage. Samples were extracted the same

way as described above.

Statistical methods

All analyses were performed using commercial statistical software.^{af,ag} To determine measurement error and reproducibility of the analytical method, duplicate GC-MS measurements (n = 38) were analyzed by calculating the coefficient of variation from duplicate measurements²⁴ and by Bland-Altman analysis.²⁴ Coefficient of variation from duplicate measurements was determined by dividing the mean standard deviation of repeated measurements by the mean, multiplied by 100 to give percentage. For Bland-Altman analysis, 95% limits of agreement were calculated as the bias \pm 1.96 SD of the differences. Bias was defined as the mean difference between duplicate GC-MS measurements. Bland-Altman analysis was performed to determine a potential systematic error in the analytical method. To assess for potential degradation of metaldehyde over time, binomial distribution of the values from the stability study was calculated. Probability of success was assumed and set at 85%.

For statistical analysis of the results of the main study, the area under the curve of the 3 different extracorporeal techniques was calculated, followed by one-way ANOVA and Bonferroni post hoc test to determine significant differences between the efficacies of the methods. Repeated measures ANOVA and Bonferroni post hoc test were applied to determine differences in percent metaldehyde reduction between the methods to specific sampling points and to evaluate the decrease in metaldehyde concentration within a given method. For calculations, the mean value of each method was used. Values are reported as mean \pm standard deviation of the triplicate results. Statistical significance was set

at $P < 0.05$.

Results

Method Validation

All values fulfilled the required conditions to accept GC-MS analyses. The mean coefficient of determination r^2 was 1.00 ± 0.01 ($n = 9$). The mean relative standard deviation in percent (%RSD) was $14.81 \pm 1.06\%$ (range 13.27–16.59%, $n = 9$). The mean calculated recoveries in percent of fortified control samples were $79.64 \pm 0.06\%$ ($n = 24$). No metaldehyde was found in the matrix control samples. Adequate linearity of the calibration curve was obtained in a concentration range of 1–100 $\mu\text{g/mL}$. The limit of quantification of the assay was 1 $\mu\text{g/mL}$.

Coefficient of variation from duplicate measurements was 5.1%, representing measurement error and reproducibility of the analytical method. Results of duplicate measurements by Bland-Altman analysis showed a bias of 0.23% with a standard deviation of differences of 2.59%. The maximum deviation was 8% and the 95% limits of agreement were approximately $\pm 5\%$ (–4.85% to 5.31%; Figure 1).

Stability study

Results of the stability study showed no evidence of metaldehyde degradation in serum samples at -80°C over a 5 week period at the concentrations evaluated. Results of calculated binomial distribution showed no evidence of a systematic effect or significant trend over time ($P = 0.02$). Metaldehyde was not detected in any of the control serum samples.

Main study

The pooled plasma samples contained 50.7 g/L (5.1 g/dL; reference interval 55.5–77.6 g/L [5.6–7.8 g/dL]) total protein and 28.1 g/L (2.8 g/dL; reference interval 31.1–43.0 g/L [3.1–4.3 g/dL]) albumin. The mean plasma metaldehyde concentration at SP 0 before starting the procedures was $90.6 \pm 3.7 \mu\text{g/mL}$. All 3 methods showed a significant reduction in metaldehyde concentration from SP 0 to SP 1 ($P < 0.05$), with mean metaldehyde concentration declining by 54.4% with HD ($P = 0.001$), 56.5% with HP ($P < 0.001$), and 70.5% with HD/HP ($P = 0.003$). Values below the limit of quantification or very low residual metaldehyde concentrations were achieved with all 3 extracorporeal techniques, yet the elimination times differed between techniques. A mean reduction in total metaldehyde concentration in excess of 95% was achieved at SP 4 with HD ($95.6 \pm 0.72\%$), at SP 8 with HP ($95.7 \pm 0.61\%$), and at SP 2 with HD/HP ($95.1 \pm 2.11\%$; Figure 2). Mean metaldehyde concentration was below the limit of quantification ($<1 \mu\text{g/mL}$) at SP 10 with HD ($0.8 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$) and at SP 5 with HD/HP ($0.7 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$). For HP, the residual mean metaldehyde concentration was $2.2 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ at SP 10.

Results showed significant differences between the efficacies of the 3 applied methods by calculating the area under the curve of the 3 different extracorporeal techniques followed by one-way ANOVA ($P < 0.001$). Applying Bonferroni post hoc test, results showed that HD/HP was more effective than HD ($P = 0.003$) and HP ($P < 0.001$), and HD provided a faster reduction in metaldehyde concentration than HP ($P = 0.002$; Figure 2). Statistically significant differences in metaldehyde concentration at specific sampling points were detected between HD and HP at SP 2 ($P < 0.001$), SP 3 and SP 4 (both $P < 0.0001$), and SP 5 ($P < 0.05$); between HD and HD/HP at SP 1 and SP 2 (both $P <$

0.0001), and SP 3 ($P < 0.05$); and between HP and HD/HP at SP 1, SP 2, SP 3, SP 4 (all $P < 0.0001$), and SP 5 ($P < 0.001$; Table 1).

Discussion

This study determined the efficacy of extracorporeal blood purification techniques (HD, HP, HD/HP) for the removal of metaldehyde from canine plasma. Metaldehyde concentrations were significantly reduced by applying each of these techniques. Comparing the techniques, HD/HP was most effective, followed by HD and HP. While removal efficacies varied between extracorporeal methods, all 3 techniques showed satisfying results *in vitro*. It is expected that all methods can accelerate metaldehyde elimination in clinical patients, resulting in a faster recovery.

Published data concerning metabolism and pharmacokinetics of metaldehyde are limited. Plasma elimination half-life for dogs is unknown. A case report in human medicine documented a serum elimination half-life of approximately 27 hours.²⁵ Residual serum metaldehyde concentrations were detectable for 5 days after admission.²⁵ Booze and Oehme²⁶ reported elevated plasma metaldehyde concentrations in dogs for up to 30 hours after oral metaldehyde dosing with 600 mg/kg body weight. Based on these data, it can be assumed that metaldehyde does not undergo rapid metabolism and/or elimination, which provides an opportunity for enhancing elimination. Our *in vitro* study showed that HD/HP provides the fastest elimination, due to the combination of diffusive and adsorptive extraction techniques. This combination is more advantageous than either technique alone if rapidity of toxin removal is required. If HD/HP is not available, HD is recommended over HP for several reasons. First,

HD achieved a statistically significantly faster *in vitro* clearance of metaldehyde compared to HP. Second, HD allows for simultaneous correction of any electrolyte or acid-base abnormalities that might be present.^{15,16} As metaldehyde intoxication is often associated with severe metabolic acidosis, this is a significant benefit over HP.⁵ Third, HD is more readily available at veterinary clinics, while HP cartridges and equipment are not commonly available at veterinary dialysis units. In the last 20 years, the use of HD in human medicine has steadily increased while the use of HP has declined.^{18,27,28} Possible reasons for these changes are the improvement in hemodialysis techniques and the development of more effective high-flux synthetic membranes.^{21,27,28} In addition, HP cartridges have limited shelf-life, are expensive, and have the potential for saturation within 1 treatment session.^{13,18,21} It is likely that these trends that have been observed in human medicine concerning the use of extracorporeal techniques also apply to veterinary medicine; however, systematic studies are not available.

In this *in vitro* study, HD caused a faster decrease in plasma metaldehyde concentration than HP. For a compound to pass readily through dialyzer membrane pores and be effectively removed by HD, the substance should have a low molecular weight (< 500 Da) and low protein binding (< 80%).^{14,15,18,22} The application of newer synthetic high-flux dialyzers allows for the removal of larger molecules up to 1,000–5,000 Da, depending on pore size.^{16,18,29-31} The molecular weight of metaldehyde is 176.2 Da.¹⁹ The extent of plasma protein binding of metaldehyde is not known. Our results demonstrate effective elimination of metaldehyde using HD. Therefore, it can be assumed that plasma protein binding did not substantially limit the efficacy of the method.

Charcoal hemoperfusion was found to be the least effective method for elimination of metaldehyde. Molecule size and plasma protein binding affect the

efficacy of HP; but, in comparison to HD, HP can remove larger and more lipid-soluble molecules with a higher degree of protein binding.^{14,20-22,28,29} Hence, these factors seem an unlikely explanation for a reduced efficacy of HP. It is possible that metaldehyde has a low binding affinity to charcoal in the cartridge, or that rapid saturation of the hemoperfusion cartridge led to a decline in toxin removal.^{13,20,32}

In series hemodialysis and charcoal hemoperfusion resulted in the fastest decrease of metaldehyde in plasma. This result may be explained by the combination of the diffusive effect of the HD dialyzer and the adsorptive effect of the HP column, thus providing a higher rate of total metaldehyde extraction than with either technique alone.¹³ The combined procedure was successfully applied to treat baclofen intoxication in a dog.²³ Serum elimination half-life was shortened from 5 to 1.5 hours in the initial 2 hours of treatment. Serum baclofen concentration declined rapidly with HD/HP, but because it is a case report, no comparative data between different removal techniques were provided.²³

The extracorporeal methods evaluated in the current *in vitro* study were designed to closely mimic *in vivo* conditions. The mean plasma metaldehyde starting concentration of 90.6 µg/mL was similar to measured levels in severely intoxicated dogs from an experimental study.²⁶ Of 8 dogs orally dosed with 600 mg/kg body weight of metaldehyde, 1 dog died and had a plasma metaldehyde level of 90 µg/mL.²⁶ Severe tremors were observed at concentrations of 36 to 90 µg/mL, while mild tremors were noted at concentrations of 8 to 52 µg/mL.²⁶ Each extracorporeal method resulted in very low residual metaldehyde concentrations *in vitro*, suggesting that, if similar removal could be achieved *in vivo*, clinical signs would improve accordingly.

Results of the current study must be interpreted with caution in terms of translating them directly to a clinical setting. Molecule size and protein binding properties likely have similar effects on the removal methods, whether in vitro or in vivo. However, the condition of the patient and the factors influencing pharmacokinetic parameters, such as age, liver function, and renal function, have to be considered. The measured plasma total protein and albumin concentrations in the canine plasma used in this study were slightly below the reference intervals for dogs. It cannot be excluded that a higher plasma protein concentration would have resulted in more protein binding and reduced elimination of metaldehyde in the current in vitro model. The apparent volume of distribution is not known for metaldehyde, and the present study does not allow a prediction of the volume of distribution. Substances with a small volume of distribution (<1 L/kg) can be effectively removed by extracorporeal methods.^{13,14} The blood volume is the only compartment accessible to extracorporeal techniques. A high volume of distribution is associated with the distribution of a compound out of the vascular compartment, making the compound inaccessible to removal by extracorporeal blood purification techniques. In that case, even if 100% of metaldehyde is removed from the bloodstream, the effect in reduction of total body metaldehyde may be poor. Such a situation could lead to a rebound effect as a result of redistribution of metaldehyde from inaccessible body compartments into the vascular space, resulting in increasing blood metaldehyde concentration after cessation of extracorporeal treatment.^{13,18}

In recent years, the awareness, acceptance, and availability of extracorporeal modalities has increased in veterinary medicine.^{16,22} If proved successful in vivo, especially in severe cases of metaldehyde intoxication, the benefit of extracorporeal techniques is expected to be significant in terms of

patient outcome and costs for treatment. Conventional treatment incurs considerable costs from several days of intensive care management, sometimes requiring general anesthesia. A single HD session requiring 1 day of hospitalization is likely to be more affordable.

In conclusion, this in vitro study demonstrated a significant elimination of metaldehyde from canine plasma by extracorporeal blood purification techniques. If proved successful in vivo, these techniques are expected to be life saving for patients acutely poisoned with metaldehyde, to hasten recovery, and to potentially decrease complications and costs associated with metaldehyde intoxication.

Acknowledgments

We thank Marcia Booth for her technical expertise with GC-MS analysis. The authors also thank the Institute of Pharmacology, Toxicology, and Pharmacy, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU, Munich and Dr. Karin Weber for their assistance during this research.

Footnotes

- ^a Metaldehyde Pestanal, analytical standard, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Germany
- ^b Chloroform Emsure, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- ^c RCT B Magnetic Stirrer, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany
- ^d Cobas Integra 400 plus, Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switzerland
- ^e Nutrimix 0.5/0, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany

- f 4008S classic, Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg, Germany
- g AV-Set FMC Paed R, Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg, Germany
- h Fresenius FX paed, Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg, Germany
- i Adsorba 150 C Hemoperfusion Cartridge, Gambro Dialysatoren GmbH, Hechingen, Germany
- j Accessory Adaptor circuit SP-390, Gambro Dasco S.p.A., Medolla, Italy
- k Heparin-Natrium-2500-ratiopharm Injektionslösung, 25000 I.U./5 mL, ratiopharm GmbH, Ulm, Germany
- l Reax 3 Shaker, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany
- m Bibag 650 g, Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg, Germany
- n SK-F 419, Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg, Germany
- o Micro tube 2 mL with cap, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany
- p California Animal Health and Food Safety Toxicology Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA
- q Kimax-51 culture tubes 16 x 100 mm, Gerresheimer Kimble Chase, Rockwood, TN
- r Ethyl Acetate Optima, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
- s Reax 2 Overhead Shaker, Heidolph Instruments GmbH & Co., Elk Grove Village, IL

- ^t Beckman Coulter Avanti J-E Centrifuge, Brea, CA
- ^u 2 mL clear crimp top vial, Agilent Technologies, Santa Clara, CA
- ^v Crimp top cap, 11 mm, PTFE/red rubber septa, Agilent Technologies, Santa Clara, CA
- ^w Hewlett Packard, HP 6890 Series GC System, Agilent Technologies, Santa Clara, CA
- ^x Hewlett Packard, HP 5973 Mass Selective Detector, Agilent Technologies, Santa Clara, CA
- ^y 7683 Automatic Liquid Sampler, Agilent Technologies, Santa Clara, CA
- ^z Agilent HP-1 GC Column (15 m, 0.25 mm, 0.25 μ m, 7 inch cage), Agilent Technologies, Santa Clara, CA
- ^{aa} Fluka, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO
- ^{ab} Methanol Optima, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
- ^{ac} Heparin sodium, 50,000 USP Units/10 mL, APP, Fresenius Kabi USA, LLC, Schaumburg, IL
- ^{ad} Chloroform, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
- ^{ae} Nalgene System Cryogenic vials, 1.5 mL, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
- ^{af} Graph Pad Prism 5, GraphPad Software, San Diego, CA
- ^{ag} SPSS Statistics 21.0, IBM Corp., Armonk, NY

References

1. Bates NS, Sutton NM, Campbell A. Suspected metaldehyde slug bait

- poisoning in dogs: A retrospective analysis of cases reported to the Veterinary Poisons Information Service. *Vet Rec* 2012;171(13):324.
2. Buhl KJ, Berman FW, Stone DL. Reports of metaldehyde and iron phosphate exposures in animals and characterization of suspected iron toxicosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2013;242(9):1244–1248.
 3. Studdert VP. Incidence of poisonings in dogs and cats in Melbourne. *Aust Vet J* 1985;62(4):133–135.
 4. Brauer C, Jambroszyk M, Tipold A. Metabolic and toxic causes of canine seizure disorders: A retrospective study of 96 cases. *Vet J* 2011;187(2):272–275.
 5. Yas-Natan E, Segev G, Aroch I. Clinical, neurological and clinicopathological signs, treatment and outcome of metaldehyde intoxication in 18 dogs. *J Small Anim Pract* 2007;48(8):438–443.
 6. Firth AM. Treatment of snail bait toxicity in dogs: Literature review. *J Vet Emerg Crit Care* 1992;2(1):25–30.
 7. Zimmermann R, Steinberg TA, Raith K, et al. Canine status epilepticus due to acute intoxication. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2010;38(5):285–294.
 8. Studdert VP. Epidemiological features of snail and slug bait poisoning in dogs and cats. *Aust Vet J* 1985;62(8):269–271.
 9. Bishop CH. Blindness associated with metaldehyde poisoning. *Vet Rec* 1975;96(19):438.
 10. Steenberger VM. Toxicology brief: Taking the bait: Metaldehyde toxicosis. *Veterinary Technician* 2004;25:259–261.

11. Campbell A. Metaldehyde. In: Campbell A, Chapman M, eds. Handbook of poisoning in dogs and cats. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd; 2000, pp. 181–185.
12. Firth AM. Treatment of snail bait toxicity in dogs: Retrospective study of 56 cases. *J Vet Emerg Crit Care* 1992;2(1):31–36.
13. Borkan SC. Extracorporeal therapies for acute intoxications. *Crit Care Clin* 2002;18(2):393–420.
14. Keno LA, Langston CE. Treatment of accidental ethanol intoxication with hemodialysis in a dog. *J Vet Emerg Crit Care* 2011;21(4):363–368.
15. Elliott DA. Hemodialysis. *Clin Tech Small Anim Pract* 2000;15(3):136–148.
16. Fischer JR, Pantaleo V, Francey T, Cowgill LD. Veterinary hemodialysis: Advances in management and technology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004;34(4):935–967.
17. Cowgill LD. Urea kinetics and intermittent dialysis prescription in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011;41(1):193–225.
18. de Pont AC. Extracorporeal treatment of intoxications. *Curr Opin Crit Care* 2007;13(6):668–673.
19. von Burg R, Stout T. Toxicology update. Metaldehyde. *J Appl Toxicol* 1991;11(5):377–378.
20. Garella S. Extracorporeal techniques in the treatment of exogenous intoxications. *Kidney Int* 1988;33(3):735–754.
21. Shalkham AS, Kirrane BM, Hoffman RS, et al. The availability and use of

- charcoal hemoperfusion in the treatment of poisoned patients. *Am J Kidney Dis* 2006;48(2):239–241.
22. Cowgill LD, Guillaumin J. Extracorporeal renal replacement therapy and blood purification in critical care. *J Vet Emerg Crit Care* 2013;23(2):194–204.
 23. Scott NE, Francey T, Jandrey K. Baclofen intoxication in a dog successfully treated with hemodialysis and hemoperfusion coupled with intensive supportive care. *J Vet Emerg Crit Care* 2007;17(2):191–196.
 24. Bland M. *An introduction to medical statistics*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2000, pp. 268–293.
 25. Moody JP, Inglis FG. Persistence of metaldehyde during acute molluscicide poisoning. *Hum Exp Toxicol* 1992;11(5):361–362.
 26. Booze TF, Oehme FW. An investigation of metaldehyde and acetaldehyde toxicities in dogs. *Fundamental and Applied Toxicology* 1986;6(3):440–446.
 27. Holubek WJ, Hoffman RS, Goldfarb DS, et al. Use of hemodialysis and hemoperfusion in poisoned patients. *Kidney Int* 2008;74(10):1327–1334.
 28. Gil HW, Kim SJ, Yang JO, et al. Clinical outcome of hemoperfusion in poisoned patients. *Blood Purif* 2010;30(2):84–88.
 29. Matzke GR. Status of hemodialysis of drugs in 2002. *J Pharm Pract* 2002;15(5):405–418.
 30. Goodman JW, Goldfarb DS. The role of continuous renal replacement therapy in the treatment of poisoning. *Semin Dial* 2006;19(5):402–407.

31. Kim Z, Goldfarb DS. Continuous renal replacement therapy does not have a clear role in the treatment of poisoning. *Nephron Clin Pract* 2010;115(1):c1–c6.
32. Al Aly Z, Yalamanchili P, Gonzalez E. Extracorporeal management of valproic acid toxicity: A case report and review of the literature. *Semin Dial* 2005;18(1):62–66.

Table 1: Statistically significant differences in plasma metaldehyde concentration at specific sampling points (SP) between applied extracorporeal blood purification techniques (HD, HP, HD/HP). HD, hemodialysis; HD/HP, in series hemodialysis and charcoal hemoperfusion; HP, charcoal hemoperfusion; SP, sampling point; n.s., no statistically significant difference ($P > 0.05$); *, statistically significant difference ($P < 0.05$); **, statistically significant difference ($P < 0.001$); *, statistically significant difference ($P < 0.0001$).**

Procedures	SP 1	SP 2	SP 3	SP 4	SP 5	SP 6	SP 7	SP 8	SP 9	SP 10
HD versus HP	n.s.	**	***	***	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HD versus HD/HP	***	***	*	n.s.						
HP versus HD/HP	***	***	***	***	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

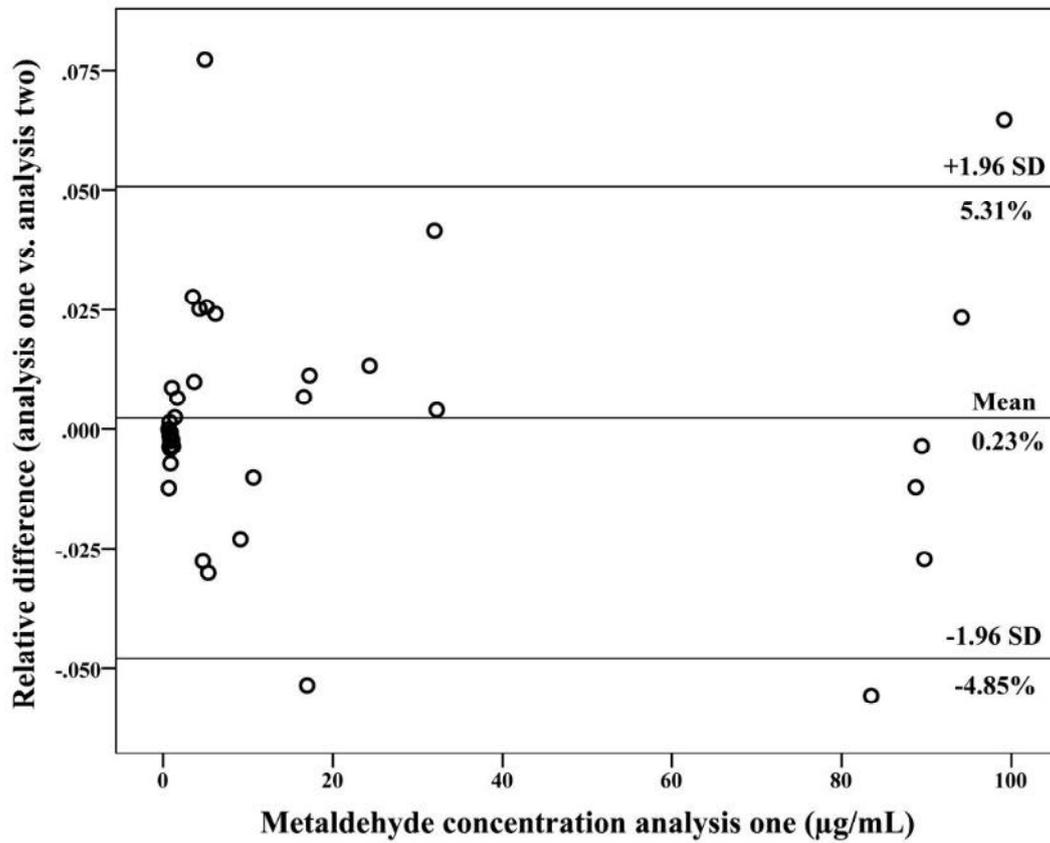


Figure 1: GC-MS repeatability: Bland-Altman plot of differences for measurement 1 and measurement 2 of duplicate analyzed samples (n = 38). The x-axis represents plasma metaldehyde concentration obtained from measurement 1. The relative difference of measurement 1 and measurement 2 is plotted on y-axis. Lines represent the mean difference (Mean) and the 95% limits of agreement (± 1.96 SD). GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; SD, standard deviation.

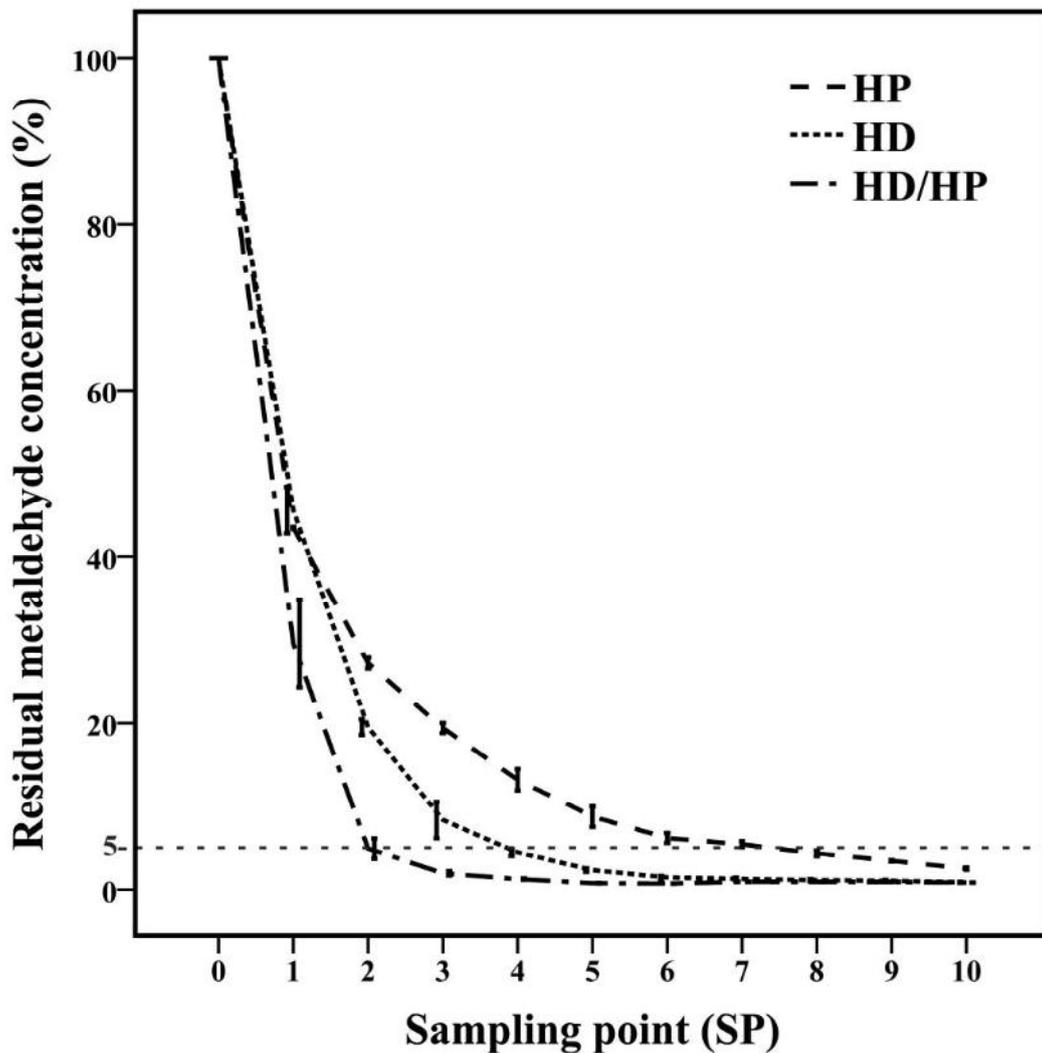


Figure 2: Changes in relative plasma metaldehyde concentration (%) during extracorporeal techniques. The x-axis represents the SP during extracorporeal procedures. Each SP equals 1 time processed plasma volume. The y-axis represents the residual relative plasma metaldehyde concentration in percent. Lines represent mean values from triplicate procedures including error bars ± 1 SEM. The dotted line represents relative metaldehyde reduction of 95%. HP, charcoal hemoperfusion; HD, hemodialysis; HD/HP, in series hemodialysis and charcoal hemoperfusion; SE, standard error of the mean; SP, sampling point.

IV. DISKUSSION

In der durchgeführten *in-vitro*-Studie wurde die Effektivität von Hämodialyse (HD), Hämoperfusion (HP) und die Kombination beider Verfahren (HD/HP) zur Elimination von Metaldehyd aus caninem Plasma untersucht. Mit allen drei Methoden wurde ein signifikanter Abfall der Metaldehydkonzentration in caninem Plasma erreicht. Vergleicht man die drei Methoden untereinander, war die HD/HP am effektivsten, gefolgt von der HD und zuletzt der HP. Ungeachtet der unterschiedlichen Effektivität erzielten alle drei Methoden *in vitro* einen Abfall der Giftstoffkonzentration von über 95 %.

Der Einsatz der HD resultierte *in vitro* in einem schnelleren Abfall der Plasma-Metaldehydkonzentration als die HP. Damit die zu eliminierende Substanz effektiv mittels HD entfernt werden kann, sollte sie ein Molekulargewicht von unter 500 Dalton haben und einen geringen Proteinbindungsgrad (< 80 %) aufweisen, um die Poren der semipermeablen Membran in dem Dialysator passieren zu können (ELLIOTT, 2000; DE PONT, 2007; KENO & LANGSTON, 2011; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013). Im Zuge der Entwicklung synthetischer High-Flux-Dialysatoren ermöglicht die HD heutzutage auch die Elimination größerer Moleküle. Abhängig von der Größe der Membranporen können die Substanzen 1.000 – 5.000 Dalton aufweisen (MATZKE, 2002; FISCHER et al., 2004; GOODMAN & GOLDFARB, 2006; DE PONT, 2007; KIM & GOLDFARB, 2010). Metaldehyd hat ein Molekulargewicht von 176,2 Dalton und ist damit ein geeigneter Kandidat zur Elimination mittels HD bezüglich der Molekülgröße (VON BURG & STOUT, 1991). Der Grad der Proteinbindung von Metaldehyd ist nicht bekannt. Die Ergebnisse der durchgeführten Studie zeigen eine effektive Elimination von Metaldehyd mittels HD, daher kann davon ausgegangen werden, dass der Grad der Proteinbindung von Metaldehyd die Effektivität dieser Methode nicht wesentlich limitiert.

Der Einsatz der HP resultierte in dem am wenigsten effektiven Abfall der Plasma-Metaldehydkonzentration. Der Grad der Proteinbindung und die Molekülgröße der Substanz beeinflussen die Effektivität der HP, wie auch der HD. Allerdings können mittels HP, im Vergleich zu der HD, größere und auch stärker Protein-gebundene Moleküle entfernt werden (GARELLA, 1988; MATZKE, 2002; SHALKHAM et al., 2006; GIL et al., 2010; KENO & LANGSTON, 2011;

COWGILL & GUILLAUMIN, 2013). Daher scheinen diese Kriterien nicht für die geringere Effektivität der HP im Vergleich zu der HD verantwortlich zu sein. Eine denkbare Erklärung für die geringere Effektivität der HP ist eine möglicherweise aufgetretene Sättigung der Hämoperfusionskartusche. Dies würde zu einem Abfall der Giftstoffelimination führen. Ein solches Problem wurde bereits bei Vergiftungen mit Theophyllin und Valproinsäure beschrieben. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine geringe Affinität von Metaldehyd zu der Aktivkohle, dem Adsorptionsmedium in der Kartusche (GARELLA, 1988; BORKAN, 2002; AL ALY et al., 2005).

Das kombinierte Verfahren von HD und HP ergab den schnellsten Abfall der Metaldehydkonzentration *in vitro*. Dieses Ergebnis resultiert vermutlich aus dem Zusammenspiel der zwei verschiedenen Extraktionstechniken. Die Elimination von Metaldehyd mittels Diffusion durch den Dialysator kombiniert mit der Adsorption durch die Hämoperfusionskartusche ergab einen schnelleren Abfall der Metaldehydkonzentration im Vergleich zu den separat eingesetzten Verfahren. Das kombinierte Verfahren wurde bereits erfolgreich zur Therapie einer Baclofenvergiftung bei einem Hund eingesetzt (SCOTT et al., 2007). In dem Fallbericht wird angegeben, dass in den ersten zwei Stunden dieses Verfahrens die Serumhalbwertszeit von fünf Stunden auf eineinhalb Stunden verkürzt wurde. Mittels HD/HP wurde ein rascher Abfall der Serum-Baclofenkonzentration erreicht. Allerdings wurden in dem Fallbericht keine Vergleiche zu anderen extrakorporalen Techniken angegeben (SCOTT et al., 2007).

In der Literatur stehen nur begrenzt Informationen über den Metabolismus und die Pharmakokinetik von Metaldehyd zur Verfügung. Die Halbwertszeit von Metaldehyd bei Hunden ist nicht bekannt. Ein humanmedizinischer Fallbericht über einen 37 Jahre alten Mann mit Metaldehydintoxikation gibt eine Halbwertszeit von 26,9 Stunden an. Im Serum des Patienten war Metaldehyd bis zu fünf Tagen nachweisbar (MOODY & INGLIS, 1992). In einer experimentellen Studie wurde Hunden 600 mg/kg Metaldehyd oral zugeführt. Erhöhte Metaldehydkonzentrationen im Plasma der Tiere wurden bis zu 30 Stunden nach Verabreichung festgestellt (BOOZE & OEHME, 1986). Aufgrund dieser Daten ist davon auszugehen, dass Metaldehyd im Organismus erst nach mehreren Stunden bis Tagen vollständig metabolisiert und eliminiert wird. Dadurch bietet sich die Möglichkeit nach neuen therapeutischen Ansätzen zu forschen, die eine

Beschleunigung der Ausscheidung von Metaldehyd aus dem Körper erreichen sollen. Es wird erwartet, dass die Verfahren auch bei klinischen Patienten einen Abfall der Metaldehydkonzentration im Blut erwirken und somit zu einer schnelleren Genesung der Patienten beitragen könnten.

Welches der drei extrakorporalen Verfahren zur Reduktion der Metaldehydkonzentration Anwendung finden sollte, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die Ergebnisse der durchgeführten *in-vitro*-Studie zeigen, dass HD/HP die schnellste Elimination von Metaldehyd bewirkt. Wenn ein möglichst schneller Abfall der Giftstoffkonzentration erreicht werden soll, ist daher der Einsatz von HD/HP der HD oder der HP alleine vorzuziehen. Allerdings müssen für die Anwendung von HD/HP die nötigen Materialien verfügbar sein. Sollte HD/HP nicht zur Verfügung stehen, kann auch durch den alleinigen Einsatz von HD oder HP ein signifikanter Abfall der Giftstoffkonzentration erreicht werden. Mittels HD wurde im Vergleich zu HP eine statistisch signifikant schnellere Entfernung von Metaldehyd aus dem caninen Plasma erreicht. Die HD ermöglicht außerdem durch variable Zusammensetzung des Dialysats eine Korrektur von Elektrolyt- und Säure-Basen-Abweichungen (ELLIOTT, 2000; FISCHER et al., 2004). Da Metaldehydvergiftungen häufig mit der Entwicklung einer metabolischen Azidose einhergehen, kann dies von Vorteil für den Patienten sein (YAS-NATAN et al., 2007). Des Weiteren sind an veterinärmedizinischen Kliniken Dialysatoren für die HD häufiger verfügbar als die zur Durchführung der HP nötigen Adsorptionskartuschen.

In den letzten zwanzig Jahren hat in der Humanmedizin der Einsatz der HD kontinuierlich zugenommen, während der Einsatz der HP abgenommen hat (DE PONT, 2007; HOLUBEK et al., 2008; GIL et al., 2010). Vergleichbare Studien über den Einsatz extrakorporaler Blutreinigungsverfahren sind in der Veterinärmedizin nicht verfügbar. Zu dem Trend des vermehrten Einsatzes der HD und nicht der HP führten vermutlich folgende Gegebenheiten: Die Hämodialyseverfahren wurden in den letzten Jahren stetig verbessert, unter anderem durch den Einsatz neuer Materialien und die Entwicklung von effektiveren High-Flux-Dialysatoren. Die heutzutage verwendeten Dialysatoren bestehen aus synthetischen Materialien, wie zum Beispiel Polysulfon, mit einer höheren Biokompatibilität. Die früher verwendeten Zellulosemembranen waren biologisch weniger gut verträglich und durch die mögliche

Komplementaktivierung mit einem höheren Komplikationsrisiko verbunden. High-Flux-Dialysatoren haben im Vergleich zu den herkömmlichen Dialysatoren größere Membranporen und erlauben die Entfernung größerer Moleküle und die Einstellung höherer Ultrafiltrationsraten (MATZKE, 2002; FISCHER et al., 2004; SHALKHAM et al., 2006; HOLUBEK et al., 2008; GIL et al., 2010). Außerdem weist die HP weitere Nachteile gegenüber der HD auf; dazu zählen die im Vergleich zu den Dialysatoren höheren Kosten und die begrenzte Haltbarkeit der Hämoperfusionskartuschen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Sättigung der Kartuschen mit dem Giftstoff. Eine mögliche Sättigung tritt in der Regel ab zwei Stunden Behandlungsdauer auf und resultiert in einer reduzierten Elimination der zu entfernenden Substanz. In diesem Fall wäre ein Austausch der Hämoperfusionskartusche während der Behandlung nötig (GARELLA, 1988; BORKAN, 2002; SHALKHAM et al., 2006; DE PONT, 2007).

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene extrakorporale Blutreinigungsverfahren in einem *in-vitro*-Modell untersucht. Es wurde angestrebt, bei der Durchführung des Experiments *in-vivo*-Konditionen so gut als möglich zu simulieren. Die Parameter der Dialysemaschine wurden weitestmöglich klinischen Gegebenheiten angepasst. Die Ausgangskonzentration von Metaldehyd in caninem Plasma lag bei einem Mittelwert von 90,6 µg/ml. Diese Konzentration ist vergleichbar mit Werten einer experimentellen Studie bei Hunden (BOOZE & OEHME, 1986). Im Zuge dieser Studie wurde acht Hunden oral jeweils 600 mg/kg Metaldehyd eingegeben. Einer dieser acht Hunde verstarb an den Folgen der Vergiftung mit einer gemessenen Plasma-Metaldehydkonzentration von 90 µg/ml. In Konzentrationen von 36 bis 90 µg/ml wurde bei den Tieren starker Tremor und in Konzentrationen von 8 bis 52 µg/ml schwacher Tremor beobachtet (BOOZE & OEHME, 1986). Auch bei experimentellen Studien mit Mäusen wurde eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad der klinischen Symptome und der Metaldehydkonzentration im Blut der Tiere nachgewiesen (SPARKS et al., 1996). Ein humanmedizinischer Fallbericht über eine Vergiftung mit Metaldehyd gibt eine maximal gemessene Serumkonzentration von 125 µg/ml an. Dieser Wert wurde elf Stunden nach Einlieferung des Patienten in das Krankenhaus ermittelt. In diesem Stadium zeigte der Patient Krampfanfälle, Fieber und befand sich in einem komatösen Zustand. Am Tag fünf war die Serum-Metaldehydkonzentration auf 18 µg/ml abgefallen

und am nachfolgenden Tag hatte sich der Patient ausreichend erholt, um in eine psychiatrische Anstalt zur weiteren Betreuung überwiesen werden zu können (MOODY & INGLIS, 1992). In einem weiteren humanmedizinischen Vergiftungsfall wurde eine Serum-Metaldehydkonzentration von 21 µg/ml nachgewiesen. Die Patientin zeigte keine gravierenden Vergiftungssymptome und wurde nach zwei Tagen Krankenhausaufenthalt entlassen (SAITO et al., 2008). Diese Untersuchungen legen die Annahme nahe, dass die Metaldehydkonzentration im Blut mit der klinischen Symptomatik korreliert. Alle drei angewendeten extrakorporalen Techniken in der vorliegenden *in-vitro*-Studie resultierten in sehr geringen Rest-Metaldehydkonzentrationen gegen Beendigung der Verfahren. Es wird angenommen, dass sich die klinische Symptomatik in Vergiftungsfällen entsprechend verbessern würde, wenn ein entsprechender Abfall der Metaldehydkonzentration *in vivo* erreicht werden könnte.

Allerdings ist es nicht möglich, die Resultate dieser *in-vitro*-Studie uneingeschränkt auf *in-vivo*-Situationen zu übertragen. Der allgemeine klinische Zustand und patientenbezogene Einflussfaktoren wie Alter, Leber- und Nierenfunktion des Patienten müssen berücksichtigt werden. Die Molekülgröße und der Grad der Proteinbindung der zu eliminierenden Substanz haben vermutlich *in vitro* und *in vivo* denselben Einfluss auf die Effektivität extrakorporaler Verfahren. Die Werte von Totalprotein und Albumin in dem verwendeten caninen Plasma lagen geringgradig unterhalb der Referenzwerte für Hunde. Es wäre möglich, dass höhere Plasma-Proteinwerte in einer höheren Proteinbindung von Metaldehyd und möglicherweise reduzierten Elimination resultiert hätten. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass für den *in-vitro*-Versuch Plasma und kein Vollblut verwendet wurde. Vollblut hätte *in-vivo*-Konditionen näher simuliert. Aus ethischen Gründen wurde kein Vollblut, sondern Plasma mit einer Lagerdauer von mindestens einem Jahr und somit nur noch begrenzter klinischer Einsetzbarkeit herangezogen. Die fehlende Hauptkomponente von Plasma im Vergleich zu Vollblut sind Erythrozyten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Vollblut ein gewisser Anteil von Metaldehyd in Erythrozyten umverteilt wird. Durch die Elimination von Metaldehyd aus dem Plasma mittels extrakorporaler Techniken würde in diesem Fall Metaldehyd entsprechend der Konzentrationsverhältnisse wieder aus den Erythrozyten in das Plasma gelangen. Die Verwendung von Vollblut könnte somit durch die Umverteilungsprozesse in

einer etwas langsameren Elimination von Metaldehyd im Vergleich zu dem verwendeten Plasma führen. Des Weiteren kann eine potentielle Metabolisierung von Metaldehyd in den Erythrozyten nicht ausgeschlossen werden. Ob Metaldehyd in Erythrozyten umverteilt wird oder in Erythrozyten metabolisiert wird, ist nicht bekannt.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Effektivität extrakorporaler Verfahren ist das Verteilungsvolumen. Substanzen, die ein geringes Verteilungsvolumen aufweisen, können effektiv mittels extrakorporaler Methoden entfernt werden (BORKAN, 2002; KENO & LANGSTON, 2011). Das Verteilungsvolumen von Metaldehyd im Organismus ist nicht bekannt und die Resultate der vorliegenden *in-vitro*-Studie geben diesbezüglich keinen Aufschluss. Daher könnte das Verteilungsvolumen die Anwendung extrakorporaler Verfahren zur Elimination von Metaldehyd *in vivo* limitieren. Zur Simulation des Patienten *in vitro* wurde ein Plasmabeutel, also ein einziges Kompartiment verwendet. *In vivo* kann sich der Giftstoff von dem Gefäßsystem in andere Körper-Kompartimente umverteilen. Das Gefäßsystem ist das einzige für extrakorporale Verfahren zugängliche Kompartiment. Ein hohes Verteilungsvolumen impliziert einen hohen Anteil an Umverteilung der Substanz aus dem Blutkreislauf in andere Körper-Kompartimente und macht die Substanz damit unzugänglich für extrakorporale Blutreinigungsverfahren. In diesem Fall wäre es möglich, dass die insgesamt Giftstoffbelastung für den Körper nur geringgradig reduziert wird, selbst wenn durch extrakorporale Verfahren 100 % des Giftstoffes aus dem Blutkreislauf eliminiert werden. Eine solche Situation kann zu einem Rebound-Effekt führen, indem es erneut zur Umverteilung des Giftstoffes aus unzugänglichen Körperkompartimenten zurück in den Blutkreislauf kommt und folglich zu ansteigenden Giftstoffkonzentrationen im Blut nach Beendigung der extrakorporalen Methode. Dieser Effekt wurde bereits bei der Behandlung einer Valproinsäure- und einer Theophyllinvergiftung beschrieben (HIGGINS et al., 1995; AL ALY et al., 2005). Der klinische Zustand des Patienten sollte auch nach Beendigung des extrakorporalen Verfahrens überwacht werden. Wenn möglich, sollte eine erneut Messung der Giftstoffkonzentration im Blut erfolgen. Sollte ein Rebound-Effekt auftreten, könnte die Anwendung wiederholt werden (BORKAN, 2002; GOODMAN & GOLDFARB, 2006; DE PONT, 2007; KIM & GOLDFARB, 2010).

In den vergangenen Jahren nahm das Bewusstsein und die Akzeptanz der Tierbesitzer und die Verfügbarkeit extrakorporaler Blutreinigungsverfahren in der Tiermedizin deutlich zu (FISCHER et al., 2004; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013). Sollten sich die in dieser *in-vitro*-Studie erhaltenen Resultate in klinischen Situationen bestätigen, könnten extrakorporale Verfahren im Gegensatz zu der herkömmlichen alleinigen symptomatischen und unterstützenden Therapie Vorteile in Bezug auf die Behandlungsdauer und die Komplikationsrate aufweisen. Der Giftstoff könnte schneller aus dem Körper des Tieres eliminiert werden und so, insbesondere in Fällen einer schweren Metaldehydintoxikation, der Entwicklung eines drastischen Krankheitsverlaufes entgegengewirkt und die Symptome früher gelindert werden. Es wäre mit einer Verbesserung der Prognose und einer Senkung der Mortalitätsrate zu rechnen. Durch die Reduktion der intensivmedizinischen Maßnahmen und die Verkürzung der Klinikaufenthaltsdauer könnte außerdem eine Verringerung der Behandlungskosten erreicht werden.

Parallel zu der Erforschung neuer und effektiver potentieller Behandlungsmethoden zur Metaldehydvergiftung beim Hund sollten auch präventive Maßnahmen verfolgt werden, um der hohen Anzahl an Vergiftungsfällen bei Tieren entgegenzuwirken. Die bisher durchgeführten Maßnahmen zur Reduktion der Vergiftungsfälle, wie zum Beispiel neue Kennzeichnungsvorschriften oder der Zusatz von Bitterstoffen, zeigten bislang keinen nachweislich zufriedenstellenden Effekt (VAN PELT & MOSTIN, 2010; BATES et al., 2012; BUHL et al., 2013). Die Metaldehydvergiftung bleibt eine häufig auftretende und weit verbreitete Intoxikation beim Hund. Oft verwenden Tierbesitzer die Schneckenkornköder selbst und sind sich der damit verbundenen potentiellen Gefahr für ihren Hund nicht bewusst (ZIMMERMANN et al., 2010; BATES et al., 2012). In einer retrospektiven Studie mit 18 Vergiftungsfällen bei Hunden erfolgte die Giftaufnahme bei 13 der 18 Hunde auf dem eigenen Grundstück (YAS-NATAN et al., 2007). Dies zeigt, dass weiterhin und verstärkt Aufklärungsarbeit notwendig ist, um vor allem Tierbesitzer auf die mit dem Einsatz von Schneckenkornködern verbundenen Gefahren für ihre Haustiere aufmerksam zu machen. Außerdem sollte weiterhin an der Verbesserung der Beschriftung von Giftverpackungen gearbeitet werden und zudem nach Alternativen, wenn möglich für andere Spezies ungiftigen Lösungen, zur

Bekämpfung von Schnecken geforscht werden.

Die im Zuge dieser Dissertation erlangten Kenntnisse könnten auch für die Humanmedizin von Bedeutung sein. Humanmedizinische Fallberichte zu Metaldehydvergiftungen sind ausreichend dokumentiert. Diese betreffen nicht nur Erwachsene, sondern auch Kinder und können fatale Konsequenzen nach sich ziehen (LEWIS et al., 1939; LONGSTRETH & PIERSON, 1982). Daher wären extrakorporaler Blutreinigungsverfahren als potentiell neues Therapieverfahren auch für die humanmedizinische Anwendung von Interesse.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Metaldehydvergiftungen durch Schneckenkornködter treten bei Hunden häufig auf und sind weltweit beschrieben. Die Mortalitätsrate wird in der veterinärmedizinischen Literatur mit bis zu 23 % angegeben. Bisher ist weder eine spezifische Behandlung noch ein Antidot für diese schwere Vergiftung bekannt. Daher besteht großes klinisches Interesse an der Erforschung einer effektiven Therapieoption zur Behandlung der Metaldehydintoxikation bei Hunden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Effektivität von Hämodialyse (HD), Hämo-perfusion (HP) und einer Kombination beider Verfahren (HD/HP) zur Elimination von Metaldehyd aus caninem Plasma. Dies ist die erste veröffentlichte Studie, die die Effektivität extrakorporaler Blutreinigungsverfahren zur Entfernung von Metaldehyd untersucht.

Zunächst wurde eine Stabilitätsstudie durchgeführt. Die Resultate ergaben, dass Metaldehyd in caninem Serum bei einer Lagerung von -80 °C über einen Zeitraum von fünf Wochen stabil ist. Damit wurde möglichen verfälschten analytischen Resultaten des eigentlichen Forschungsvorhabens vorgebeugt.

Die Ergebnisse dieser Studie basieren auf einem *in-vitro*-Experiment. In diesem Experiment konnte ein signifikanter Abfall der Metaldehydkonzentration in caninem Plasma durch alle drei untersuchten extrakorporalen Blutreinigungsverfahren gezeigt werden. Ein über 95%iger Abfall der Plasma-Metaldehydkonzentration wurde mittels HD/HP nach der zweifachen Bearbeitung, mittels HD nach der vierfachen Bearbeitung und mittels HP nach der achtfachen Bearbeitung des Gesamt-Plasmavolumens erreicht. Ein signifikanter Unterschied in der Effektivität der drei Methoden war vorhanden. Das kombinierte Verfahren war effektiver als die alleinige Anwendung von HD oder HP, und HD war effektiver als HP.

Das Studiendesign wurde weitestmöglich *in-vivo*-Konditionen angepasst. Sollten sich die hier erhaltenen Resultate *in vivo* bestätigen, können extrakorporale Blutreinigungsverfahren als neuer Therapieansatz lebensrettend für Tiere mit akuter Metaldehydvergiftung sein, die Genesung der Patienten beschleunigen und möglicherweise Komplikationen und Therapiekosten reduzieren.

VI. SUMMARY

Incidents of metaldehyde intoxication in dogs are reported worldwide with severe morbidity and a mortality rate with up to 23 % in veterinary literature. No specific antidote or causal treatment is available. Therefore, further research to improve treatment options is of high clinical interest.

The objective of this *in vitro* study was to evaluate the effect of hemodialysis, hemoperfusion, and the combined approach on the removal of metaldehyde from canine plasma. This is the first published study evaluating extracorporeal blood purification techniques on the removal of metaldehyde.

A preliminary study was performed to assess the stability of metaldehyde in spiked canine sera. Results showed no evidence of metaldehyde degradation in serum samples at -80 °C over a five-week period. The stability study was performed to avoid falsified analytical results in the main trial.

Results of this *in vitro* study demonstrated a significant elimination of metaldehyde from canine plasma by all three extracorporeal blood purification techniques. Reduction of metaldehyde concentration of more than 95 % was achieved after processing the plasma volume two times applying combined hemodialysis and hemoperfusion, four times applying hemodialysis, and eight times applying hemoperfusion. Efficacy in reduction of metaldehyde concentration differed significantly between the three procedures. Combined hemodialysis and hemoperfusion was more effective in metaldehyde removal than hemodialysis or hemoperfusion alone, and hemodialysis alone was more effective than hemoperfusion alone.

The study was designed to closely mimic *in vivo* conditions. If proved successful *in vivo*, extracorporeal techniques are expected to be life-saving for patients acutely poisoned with metaldehyde, to hasten recovery, and to potentially decrease complications and costs associated with metaldehyde intoxication.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Al Aly Z, Yalamanchili P, Gonzalez E. Extracorporeal management of valproic acid toxicity: A case report and review of the literature. *Semin Dial* 2005; 18: 62-6.

Bates NS, Sutton NM, Campbell A. Suspected metaldehyde slug bait poisoning in dogs: A retrospective analysis of cases reported to the Veterinary Poisons Information Service. *Vet Rec* 2012; 171: 324.

Berny P, Caloni F, Croubels S, Sachana M, Vandebroucke V, Davanzo F, Guitart R. Animal poisoning in Europe. Part 2: Companion animals. *Vet J* 2010; 183: 255-9.

Bishop CH. Blindness associated with metaldehyde poisoning. *Vet Rec* 1975; 96: 438.

Booze TF, Oehme FW. An investigation of metaldehyde and acetaldehyde toxicities in dogs. *Fundamental and Applied Toxicology* 1986; 6: 440-6.

Borkan SC. Extracorporeal therapies for acute intoxications. *Crit Care Clin* 2002; 18: 393-420.

Brauer C, Jambroszyk M, Tipold A. Metabolic and toxic causes of canine seizure disorders: A retrospective study of 96 cases. *Vet J* 2011; 187: 272-5.

Buhl KJ, Berman FW, Stone DL. Reports of metaldehyde and iron phosphate exposures in animals and characterization of suspected iron toxicosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2013; 242: 1244-8.

Campbell A. Metaldehyde. In: *Handbook of poisoning in dogs and cats*. Campbell A, Chapman M, eds. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd 2000: 181-5.

Chandy T, Sharma CP. Activated charcoal microcapsules and their applications. *J Biomater Appl* 1998; 13: 128-57.

Cowgill LD. Urea kinetics and intermittent dialysis prescription in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011; 41: 193-225.

Cowgill LD, Guillaumin J. Extracorporeal renal replacement therapy and blood purification in critical care. *J Vet Emerg Crit Care* 2013; 23: 194-204.

De Backer W, Zachee P, Verpooten GA, Majelyne W, Vanheule A, De Broe ME. Thallium intoxication treated with combined hemoperfusion-hemodialysis. *J Toxicol Clin Toxicol* 1982; 19: 259-64.

De Pont AC. Extracorporeal treatment of intoxications. *Curr Opin Crit Care* 2007; 13: 668-73.

Dolder LK. Metaldehyde toxicosis. *Veterinary Medicine* 2003; 98: 213-5.

Elliott DA. Hemodialysis. *Clin Tech Small Anim Pract* 2000; 15: 136-48.

Falbe J, Regitz M. *Römpp Lexikon Chemie*, 10th edn Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1997: 2605-6.

Firth AM. Treatment of snail bait toxicity in dogs: Literature review. *J Vet Emerg Crit Care* 1992a; 2: 25-30.

Firth AM. Treatment of snail bait toxicity in dogs: Retrospective study of 56 cases. *J Vet Emerg Crit Care* 1992b; 2: 31-6.

Fischer JR, Pantaleo V, Francey T, Cowgill LD. Veterinary hemodialysis: Advances in management and technology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34: 935-67.

Garella S. Extracorporeal techniques in the treatment of exogenous intoxications. *Kidney Int* 1988; 33: 735-54.

Gil HW, Kim SJ, Yang JO, Lee EY, Hong SY. Clinical outcome of hemoperfusion in poisoned patients. *Blood Purif* 2010; 30: 84-8.

Goodman JW, Goldfarb DS. The role of continuous renal replacement therapy in the treatment of poisoning. *Semin Dial* 2006; 19: 402-7.

Higgins RM, Hearing S, Goldsmith DJ, Keevil B, Venning MC, Ackrill P. Severe theophylline poisoning: Charcoal haemoperfusion or haemodialysis? *Postgrad Med J* 1995; 71: 224-6.

Holubek WJ, Hoffman RS, Goldfarb DS, Nelson LS. Use of hemodialysis and hemoperfusion in poisoned patients. *Kidney Int* 2008; 74: 1327-34.

Homeida AM, Cooke RG. Pharmacological aspects of metaldehyde poisoning in mice. *J Vet Pharmacol Ther* 1982a; 5: 77-81.

Homeida AM, Cooke RG. Anti-convulsant activity of diazepam and clonidine on metaldehyde-induced seizures in mice: Effects on brain gamma-amino butyric acid concentrations and monoamine oxidase activity. *J Vet Pharmacol Ther* 1982b; 5: 187-90.

Keno LA, Langston CE. Treatment of accidental ethanol intoxication with hemodialysis in a dog. *J Vet Emerg Crit Care* 2011; 21: 363-8.

Kilian M, Frey HH. Central monoamines and convulsive thresholds in mice and rats. *Neuropharmacology* 1973; 12: 681-92.

Kim Z, Goldfarb DS. Continuous renal replacement therapy does not have a clear role in the treatment of poisoning. *Nephron Clin Pract* 2010; 115: c1-c6.

Kitchell RL, Schubert TA, Mull RL, Knaak JB. Palatability studies of snail and slug poison baits, using dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 173: 85-90.

Lewis DR, Madel GA, Drury J. Fatal poisoning by "Meta Fuel" tablets. *British Medical Journal* 1939; 1: 1283-4.

Longstreth WTJ, Pierson DJ. Metaldehyde poisoning from slug bait ingestion. *West J Med* 1982; 137: 134-7.

Ludin M. Murder by metaldehyde poisoning. *Schweiz Med Wochenschr* 1958; 88: 381-4.

Matzke GR. Status of hemodialysis of drugs in 2002. *J Pharm Pract* 2002; 15: 405-18.

Miller R. Poisoning by "Meta Fuel" tablets (Metacetaldehyde). *Arch Dis Child* 1928; 3: 292-5.

Moody JP, Inglis FG. Persistence of metaldehyde during acute molluscicide poisoning. *Hum Exp Toxicol* 1992; 11: 361-2.

Puschner B. Metaldehyde. In: *Small Animal Toxicology*, 1st edn. Peterson ME, Talcott PA, eds. Philadelphia: W.B. Saunders 2001: 553-62.

Saito T, Morita S, Motojyuku M, Akieda K, Otsuka H, Yamamoto I, Inokuchi S. Determination of metaldehyde in human serum by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 875: 573-6.

Scott NE, Francey T, Jandrey K. Baclofen intoxication in a dog successfully treated with hemodialysis and hemoperfusion coupled with intensive supportive care. *J Vet Emerg Crit Care* 2007; 17: 191-6.

Shalkham AS, Kirrane BM, Hoffman RS, Goldfarb DS, Nelson LS. The availability and use of charcoal hemoperfusion in the treatment of poisoned patients. *Am J Kidney Dis* 2006; 48: 239-41.

Shih CC, Chang SS, Chan YL, Chen JC, Chang MW, Tung MS, Deng JF, Yang CC. Acute metaldehyde poisoning in Taiwan. *Vet Hum Toxicol* 2004; 46: 140-3.

Shintani S, Goto K, Endo Y, Iwamoto C, Ohata K. Adsorption effects of activated charcoal on metaldehyde toxicity in rats. *Vet Hum Toxicol* 1999; 41: 15-8.

Sparks SE, Quistad GB, Cole LM, Casida JE. Metaldehyde molluscicide action in mice: Distribution, metabolism, and possible relation to GABAergic system. *Pestic Biochem Physiol* 1996; 55: 226-36.

Studdert VP. Incidence of poisonings in dogs and cats in Melbourne. *Aust Vet J* 1985a; 62: 133-5.

Studdert VP. Epidemiological features of snail and slug bait poisoning in dogs and cats. *Aust Vet J* 1985b; 62: 269-71.

Van Pelt H, Mostin M. Effect of risk-reducing actions on metaldehyde intoxications by dogs. *Clinical Toxicology* 2010; 48: 315.

Von Burg R, Stout T. Toxicology update. Metaldehyde. *J Appl Toxicol* 1991; 11: 377-8.

Yas-Natan E, Segev G, Aroch I. Clinical, neurological and clinicopathological signs, treatment and outcome of metaldehyde intoxication in 18 dogs. *J Small Anim Pract* 2007; 48: 438-43.

Zimmermann R, Hulsmeyer VI, Sauter-Louis C, Fischer A. Status epilepticus and epileptic seizures in dogs. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 970-6.

Zimmermann R, Steinberg TA, Raith K, Hülsmeier V, Fischer A. Canine status epilepticus due to acute intoxication. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2010; 38: 285-94.

VIII. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt und mich in der Zeit als Doktorandin begleitet haben. Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann und meinem Betreuer Dr. René Dörfelt, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben. Katrin, vielen Dank für die wissenschaftliche Anleitung, die fachliche Unterstützung und die zwei schönen Jahre als Doktorandin. René, vielen Dank für das sehr interessante Thema, dein Vertrauen, deine Geduld und deine ansteckende Begeisterung für die Intensivmedizin.

Danke auch an Dr. Karin Weber und das Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, insbesondere an Prof. Dr. Heidrun Potschka, an Frau Dr. Daniela Eisinger und an Frau Regina Rentsch, die mich in der Umsetzung des Forschungsvorhabens tatkräftig unterstützt und beraten haben. Ebenso gilt mein Dank Dr. Sven Reese, der mir mit Rat und Tat in allen statistischen Fragen geduldig zur Seite stand. Des Weiteren möchte ich mich bei der *Morris Animal Foundation* für die finanzielle Unterstützung bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Birgit Puschner, ihren Mitarbeitern und der *University of California* in Davis, USA für ihre Kooperation bei diesem Forschungsvorhaben. Liebe Birgit, vielen Dank für deine hervorragende Betreuung der Laborarbeiten in Davis, deine Unterstützung, fachliche Beratung und wertvolle Hilfe bei der englischen Veröffentlichung. Ein besonderes Dankeschön geht auch an Marcia Booth, die mich mit ihrer unermüdlichen Geduld und ihrem Optimismus in die Geheimnisse der GC/MS-Analyse eingeweiht hat.

Von ganzem Herzen danke ich meiner lieben Familie. Sie hat mir durch ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihren starken Rückhalt das Studium und die Doktorarbeit erst ermöglicht. Ein ganz herzlicher Dank geht auch an meinen großartigen Freund Patrick für sein Verständnis, seine Zuversicht und seinen liebevollen Zuspruch. Danke an all meine Freunde und Begleiter für das geduldige Ertragen meiner Launen, die aufmunternden Worte und Ablenkungen immer dann, wenn es nötig war.