

Aus der Klinik für kleine Haustiere
und dem Institut für Veterinär-Biochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Validierung eines ELISAs zur Messung des feline Haptoglobins und
Untersuchung der Bedeutung von Akute-Phase-Proteinen
als Biomarker bei erkrankten Katzen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jenny Stiller
Tierärztin aus Gera

Berlin 2016
Journal-Nr.: 3884

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier
Dritter Gutachter: PD Dr. Rüdiger Hauck

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

cats, blood serum, serum amyloid a protein (MeSH), haptoglobins, seromucoid,
ketoacidosis, biochemical markers, diabetes mellitus, urinary tract diseases, ELISA,
diagnostic techniques, monitoring

Tag der Promotion: 06.09.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-761-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2016

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	ALLGEMEINE GRUNDLAGEN.....	2
2.1	Akute-Phase-Proteine	2
2.1.1	Akute-Phase-Reaktion	2
2.1.2	Definition und Einteilung.....	3
2.1.3	Akute-Phase-Proteine der Katze	5
2.1.4	Messung der Akute-Phase-Proteine.....	6
2.1.5	Akute-Phase-Proteine als Biomarker.....	8
2.1.6	Studien über Akute-Phase-Proteine bei der Katze	10
2.2	Obstruktive FLUTD.....	10
2.3	Feliner Diabetes mellitus	12
3	ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN.....	14
4	MATERIAL UND METHODEN	15
4.1	Proben	15
4.2	Validierungsstudie des Haptoglobin-ELISAs	16
4.2.1	ELISA.....	16
4.2.2	Spektrophotometrischer Assay.....	17
4.2.3	Analytische Validierung	17
4.2.4	Overlap Performance	19
4.2.5	Statistische Auswertung und Performance-Ziele	19
4.3	Klinische Studie.....	22
4.3.1	Katzen.....	22
4.3.1.1	Gesunde Katzen	22
4.3.1.2	Obstruktive FLUTD	22
4.3.1.3	Feliner Diabetes mellitus	23
4.3.2	Zeitpunkte der Probenentnahmen	24
4.3.3	Dokumentierte Parameter	25

4.3.4	Assays	26
4.3.4.1	AGP	26
4.3.4.2	SAA.....	27
4.3.4.3	Haptoglobin.....	28
4.3.5	Statistische Auswertung	28
5	ERGEBNISSE	30
5.1	Validierungsstudie des Haptoglobin-ELISAs	30
5.1.1	Analytische Validierung	30
5.1.2	Methodenvergleich.....	33
5.1.3	Overlap Performance	35
5.2	Klinische Studie.....	36
5.2.1	Katzen.....	36
5.2.1.1	Gesunde Katzen	36
5.2.1.2	Obstruktive FLUTD	36
5.2.1.3	Feliner Diabetes mellitus	37
5.2.2	Referenzintervalle	38
5.2.3	Diagnostische Bedeutung	40
5.2.3.1	Obstruktive FLUTD	40
5.2.3.2	Feliner Diabetes mellitus	42
5.2.3.3	Diagnostische Sensitivität und Spezifität	44
5.2.3.4	Korrelationen.....	45
5.2.4	Bedeutung hinsichtlich Monitoring	46
5.2.4.1	Obstruktive FLUTD	46
5.2.4.2	Feliner Diabetes mellitus	48
5.2.4.3	Verallgemeinerte lineare Modelle	51
6	DISKUSSION	54
6.1	Validierungsstudie des Haptoglobin-ELISAs	54
6.2	Klinische Studie.....	58
6.2.1	Referenzintervalle	58

6.2.2	Signalement	60
6.2.3	Obstruktive FLUTD	62
6.2.3.1	Diagnostische Bedeutung	62
6.2.3.2	Bedeutung hinsichtlich Monitoring	64
6.2.4	Feliner Diabetes mellitus	67
6.2.4.1	Diagnostische Bedeutung	67
6.2.4.2	Bedeutung hinsichtlich Monitoring	71
6.2.5	Korrelationen und beeinflussende Faktoren	73
6.2.6	Limitationen der klinischen Studie	74
6.2.7	Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick	76
7	ZUSAMMENFASSUNG	78
8	SUMMARY	81
9	LITERATURVERZEICHNIS	84
10	ANHANG	95
11	PUBLIKATIONSLISTE	103
12	DANKSAGUNG	104
13	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	105

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Induktion der Akute-Phase-Reaktion und ihrer Effekte.	3
Abb. 2: Schematische Darstellung der Konzentrationsverläufe von Akute-Phase-Proteinen (APPs) nach einem immunologischen Stimulus.	5
Abb. 3: Design der klinischen Studie.	25
Abb. 4: Wiederholbarkeit nach Bland und Altman für 39 feline Serumproben gemessen als Duplikate im ELISA (A) und im spektrophotometrischen Assay (B).	32
Abb. 5: Passing-Bablok-Regressionsanalyse für Haptoglobin-Konzentrationen von 39 feline Seren, welche im ELISA und im spektrophotometrischen Assay gemessen wurden.	33
Abb. 6: Bland-Altman-Diagramm für Haptoglobin-Konzentrationen von 39 feline Seren, welche im ELISA und im spektrophotometrischen Assay gemessen wurden.....	34
Abb. 7: Darstellung der Overlap Performance des ELISAs zur Messung der Haptoglobin-Konzentrationen aus Seren gesunder (n = 27) und erkrankter Katzen ohne (n = 12) und mit systemischer Entzündung (n = 8).	35
Abb. 8: Histogramme der AGP- (A), SAA- (B) und Hp-Konzentrationen (C) der gesunden Katzen (n = 27).....	39
Abb. 9: Box-Whisker-Plots für AGP (A), SAA (B) und Hp (C) am Tag der Erstvorstellung bei gesunden Katzen (n = 27) und an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen unterteilt nach ihrem klinischen Verlauf (FLUTD _{unkompliziert} , n = 7; FLUTD _{kompliziert} , n = 9).....	41
Abb. 10: Box-Whisker-Plots für AGP (A), SAA (B) und Hp (C) am Tag der Erstvorstellung bei gesunden Katzen (n = 27) und an einem unkomplizierten und komplizierten Diabetes mellitus (DM) erkrankten Katzen (n = 4 bzw. n = 6).	43
Abb. 11: Streudiagramme zur Darstellung der Korrelationen zwischen den Akute-Phase-Proteinen AGP und Hp (A), zwischen SAA und Hp (B) sowie zwischen AGP und SAA (C) bei erkrankten Katzen am Tag der Erstvorstellung.	45
Abb. 12: Verlaufsmessungen von AGP, SAA und Hp bei an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen unterteilt nach ihrem klinischen Verlauf in FLUTD _{unkompliziert} (A, B, C) und FLUTD _{kompliziert} (D, E, F).	47
Abb. 13: Verlaufsmessungen von AGP, SAA und Hp bei an einem Diabetes mellitus (DM) erkrankten Katzen unterteilt in DM _{unkompliziert} (A, B, C) und DM _{kompliziert} (D, E, F).....	50

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Bewertung des Korrelationskoeffizientens r_s	21
Tab. 2: Einteilung der an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen (n = 16) nach klinischem Verlauf.....	23
Tab. 3: Einteilung der an einem Diabetes mellitus (DM) erkrankten Katzen (n = 10) nach Untersuchungsergebnissen.....	24
Tab. 4: Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten und gesamter Variationskoeffizient (CV_{Total}) für Haptoglobin-Konzentrationen von 3 feline Serumproben gemessen im ELISA.....	30
Tab. 5: Wiederherstellungsrate von Haptoglobin nach serieller Verdünnung von 4 feline Serumproben, welche im ELISA gemessen wurden.....	31
Tab. 6: Wiederfindungsrate von Haptoglobin nach Aufstockung von 4 feline Serumproben mit einer Spike-Lösung, welche im ELISA gemessen wurden.....	31
Tab. 7: 95%ige einseitige Referenzintervalle für AGP und SAA und oberes Referenzlimit eines 95% zweiseitigen Referenzintervalls für Hp (n = 27 Katzen).....	38
Tab. 8: Konzentrationen der Akute-Phase-Proteine AGP, SAA und Hp am Tag der Erstvorstellung bei an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen unterteilt nach ihrem klinischen Verlauf verglichen mit den Konzentrationen der gesunden Katzen.....	40
Tab. 9: Konzentrationen der Akute-Phase-Proteine AGP, SAA und Hp bei an einem unkomplizierten und komplizierten Diabetes mellitus (DM) erkrankten Katzen am Tag der Erstvorstellung verglichen mit den Konzentrationen der gesunden Katzen.....	42
Tab. 10: Diagnostische Sensitivität (SE) und Spezifität (SP) und jeweilige 95%ige Konfidenzintervalle (CI) von AGP, SAA und Hp zur Detektion eines komplizierten Verlaufs der FLUTD ($FLUTD_{kompliziert}$) bzw. eines komplizierten Diabetes mellitus ($DM_{kompliziert}$) am Tag der Erstvorstellung.....	44
Tab. 11: Parameterschätzungen der verallgemeinerten linearen Modelle zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen den Konzentrationsverläufen der jeweiligen Akute-Phase-Proteine (APPs) als abhängige Variable und der Gruppenzugehörigkeit sowie dem Tag der Probenentnahme als unabhängige Variable.....	52
Tab. 12: Parameterschätzungen der bivariaten verallgemeinerten linearen Modelle zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen den Konzentrationsverläufen der jeweiligen Akute-Phase-Proteine (APPs) als abhängige Variable und der Gruppenzugehörigkeit oder dem Tag der Probenentnahme als jeweils einzige unabhängige Variable.....	53

ANHANGSVERZEICHNIS

Anhang I: Tabellarische Darstellung von bisher publizierten Konzentrationen für AGP, SAA und Hp bei gesunden Katzen und die verwendete Messmethode.	95
Anhang II: Auflistung der bisher untersuchten Erkrankungen und der gemessenen Akute-Phase-Proteine	96
Anhang III: Wiederholbarkeit nach Bland und Altman für 39 feline Serumproben gemessen als Duplikate im spektrophotometrischen Assay ohne Rückrechnung der verdünnten Proben.	97
Anhang IV: Tabellarische Darstellung des Signalelements der gesunden Katzen (n = 27) und erkrankten Katzen (n = 26).	98
Anhang V: Tabellarische Darstellung des Signalelements der Katzen (n = 53) nach Gruppen unterteilt.	98
Anhang VI: Beschreibung der an obstruktiver FLUTD und an Diabetes mellitus erkrankten Katzen.	99
Anhang VII: Auflistung der an obstruktiver FLUTD und an Diabetes mellitus erkrankten Katzen.	100
Anhang VIII: Anpassungsgüte der verallgemeinerten linearen Modelle	102
Anhang IX: Verlaufsprofil von AGP, SAA und Hp für Katze 25.	102

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Abb.	Abbildung
	AGP	α 1-Acid Glycoprotein
	al.	alii
	APP	Akutes-Phase-Protein (Plural: APPs = acute phase proteins)
	APR	Akute-Phase-Reaktion
	ASVCP	American Society for Veterinary Clinical Pathology
B	Bias _{Des}	Desirable Bias
	Bias _{Min}	Minimally Acceptable Bias
	BKH	Britisch Kurzhaar
	bzw.	beziehungsweise
	β -HB	β -Hydroxybutyrat
C	C	Celsius
	ca.	circa
	CFU	Colony Forming Unit
	CI	Konfidenzintervall
	CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
	CRP	C-reaktives Protein
	CUSUM	Cumulative Sum
	CV	Coefficient of Variation
	CV _{Des}	Desirable Analytical CV
	CV _{Min}	Minimally Acceptable CV
	CV _{Total}	Gesamt-CV
	D	DK
DKA		Diabetische Ketoazidose
DL		Detection Limit
DM		Diabetes mellitus
E	EKH	Europäisch-Kurzhaar
	ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F	FelV	Felines Leukämie-Virus
	FIC	Feline Idiopathic Cystitis
	FIP	Feline Infektiöse Peritonitis
	FIV	Felines Immunodefizienz-Virus
	FLUTD	Feline Lower Urinary Tract Disease
	FN	falsch negativ
	FP	falsch positiv
G	G	Giga
H	Hb	Hämoglobin
	HDL	High Density Lipoprotein
	Hp	Haptoglobin
	HRP	Horseradish Peroxidase
I	IL	Interleukin
	IQR	Interquartile Range
L	l	Liter
	LAT	Latex-Agglutinationstest
M	m	männlich
	M	Median
	maAPP	Major Acute Phase Protein
	mg	Milligramm
	miAPP	Minor Acute Phase Protein

	mk	männlich kastriert
	ml	Milliliter
	mmol	Millimol
	moAPP	Moderate Acute Phase Protein
	MW	Mittelwert
	µl	Mikroliter
	µmol	Mikromol
N	<i>n</i>	Anzahl
	n.e.	nicht errechenbar
	ng	Nanogramm
	nm	Nanometer
	Norw. WK	Norwegische Waldkatze
O	OD	Optical Density
P	pH	Potentia Hydrogenii
Q	QICC	Quasi-likelihood under Independence Model Criterion
R	R	Range
	resp.	respektive
	RI	Referenzintervall
	rpm	Revolutions Per Minute
	r_s	Spearman Rangkorrelationskoeffizient
S	SAA	Serum-Amyloid-A
	SD	Standard Deviation
	SE	Sensitivität
	SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
	SP	Spezifität
	spektr.	spektrophotometrisch
	SRID	Single Radial Immunodiffusion
T	Tab.	Tabelle
	TE	Total Error
	TE _{Des}	Desirable Total Error
	TE _{Min}	Minimally Acceptable Total Error
	TIA	Turbidimetrischer Immunassay
	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
	TN	richtig negativ
	TNF	Tumornekrosefaktor
TP	richtig positiv	
U	u.a.	unter anderem
V	v.a.	vor allem
W	w	weiblich
	wk	weiblich kastriert
Z	z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

“Biological Marker (Biomarker): A characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biologic or pathologic processes, or pharmacologic response to a therapeutic intervention.” (De Gruttola et al., 2001)

Diese Definition für Biomarker wurde 2001 von einer Arbeitsgruppe des amerikanischen National Institute of Health herausgebracht. Sie beschreibt sowohl die Notwendigkeit einer objektiv validierten Messmethode als auch die Notwendigkeit der klinischen Evaluierung als diagnostische oder prognostische Indikatoren bzw. als Marker zur Überwachung des Therapieerfolgs.

Ein bereits etablierter Biomarker in der Humanmedizin stellt das C-reaktive Protein (CRP) dar, welches 1930 das erste Mal bei Patienten mit einer Pneumokokkeninfektion beschrieben wurde (Tillett und Francis, 1930). Der Begriff der „Akuten Phase“ wurde 1941 geprägt, um eine komplexe Kaskade von Abwehrreaktionen unmittelbar nach einer Gewebeschädigung zu beschreiben (Abernethy und Avery, 1941; Macleod und Avery, 1941). Folgend wurden Proteine, deren Konzentrationen sich während dieser unspezifischen Immunantwort um mindestens 25% verändern, als Akute-Phase-Proteine (APPs) bezeichnet (Kushner, 1982).

In der Veterinärmedizin erfolgte die erste Beschreibung eines APPs 1966 (Dillman und Coles, 1966). Seitdem ist die Anzahl der Studien, welche APPs als Biomarker beim Groß- und Kleintier untersuchen, steigend (Eckersall, 2004; Eckersall und Schmidt, 2014). Trotz dieser Entwicklung gibt es vergleichsweise wenige Studien, die feline APPs beschreiben.

Bei der Katze zählen das saure α 1-Glykoprotein (AGP), Serum-Amyloid-A (SAA) und Haptoglobin (Hp) zu den wichtigsten APPs. Gemäß der obigen Definition sind zur Etablierung dieser Proteine als Biomarker zum einen objektiv validierte Assays für diese Spezies notwendig und zum anderen müssen Studien durchgeführt werden, in denen APP-Konzentrationen bei Gesunden und bei Erkrankten untersucht werden. Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zur Etablierung von AGP, SAA und Hp als Biomarker bei der Katze.

2 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN

2.1 Akute-Phase-Proteine

2.1.1 Akute-Phase-Reaktion

Die Akute-Phase-Reaktion (APR) ist ein Teil des angeborenen unspezifischen Immunsystems. Sie stellt eine frühzeitige systemische Immunantwort auf Gewebeschädigung dar und umfasst eine Vielzahl von metabolischen, neuroendokrinen, hämatopoetischen und hepatischen Veränderungen. Ziel dieser Kaskade zellulärer Reaktionen ist es, die Homöostase wieder herzustellen und die Ursache der Schädigung zu eliminieren (Kushner, 1982; Trey und Kushner, 1995). Phylogenetisch stellt sie ein hoch konserviertes Abwehrsystem dar, welches verantwortlich für das Überleben des Individuums unmittelbar nach einer Noxe ist (Raynes, 1994).

Die APR (*Abb. 1*) kann sowohl durch lokale als auch durch systemische Stimuli induziert werden, wie z.B. infektiöse, neoplastische oder traumatische Ursachen (Kushner, 1982). Diese haben eine Gewebeschädigung mit einer lokalen Immunreaktion zur Folge. Dabei werden proinflammatorische Zytokine von aktivierten immunkompetenten Zellen (z.B. Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten) gebildet und in die Blutbahn sezerniert. Zu den wichtigsten Zytokinen gehören Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Sie dienen als Botenstoffe und haben verschiedene systemische Aufgaben und Zielorte, wie z.B. Induktion der Leukopoese im Knochenmark (Kushner, 1982; Gabay und Kushner, 1999). Eine der Hauptfunktionen der Zytokine ist die Stimulation oder Hemmung der Synthese der APPs in den Hepatozyten (Hurlimann et al., 1966; Kushner, 1982). Neben der Leber als dem Hauptort der Synthese können APPs in extrahepatischen Geweben produziert werden, beispielsweise in der Niere (Jabs et al., 2003) und im Endometrium (Christoffersen et al., 2010). Die APR ist durch antagonistische und durch Feedback-Mechanismen zeitlich limitiert. Ihre Dauer umfasst daher wenige Tage (Ceciliani et al., 2002). Bei chronischen Erkrankungen kann es jedoch zu einer verlängerten APR kommen, welche durch ihre systemischen Effekte zu weiteren Gewebeschädigungen und Komplikationen führen kann, z.B. zu einer reaktiven Amyloidose (Suffredini et al., 1999).

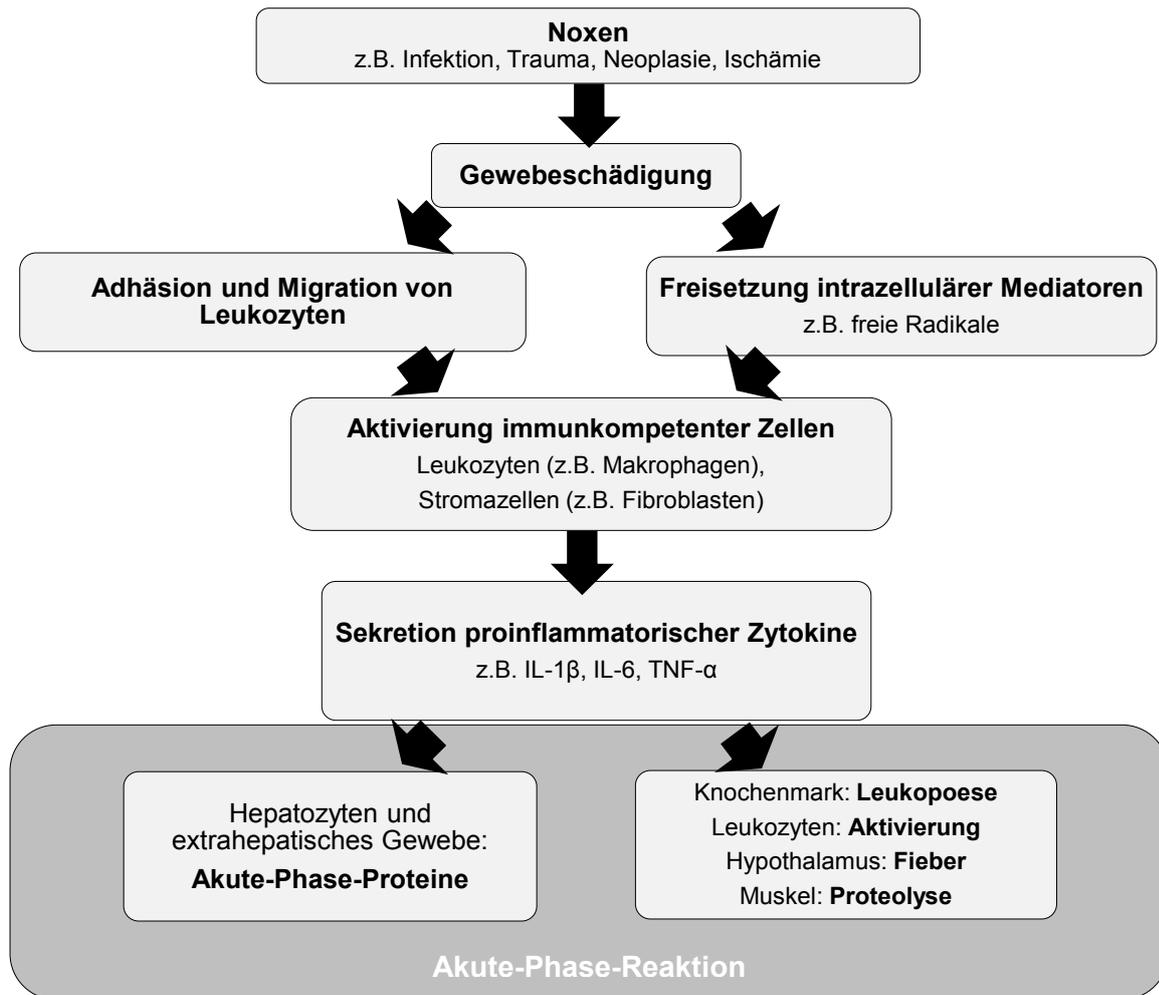


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Induktion der Akute-Phase-Reaktion und ihrer Effekte.
Modifiziert dargestellt nach Kjelgaard-Hansen und Jacobsen, 2011.
(IL-1, Interleukin-1; IL-6, Interleukin-6; TNF- α , Tumornekrosefaktor- α)

2.1.2 Definition und Einteilung

Als APPs werden Proteine definiert, deren Serumkonzentrationen sich während der APR um mindestens 25% verändern (Kushner, 1982). Zu den APPs werden derzeit rund 40 Proteine gezählt (Cecilian et al., 2002). Sie üben verschiedene Aufgaben aus (Gabay und Kushner, 1999; Jain et al., 2011), nach denen sie in folgende Gruppen unterteilt werden können:

- Transportproteine (z.B. Hp, Transferrin, Ceruloplasmin)
- Proteine der Gerinnung und Fibrinolyse (z.B. Prothrombin, Fibrinogen)
- Proteine des Komplementsystems (z.B. Komplement C3)
- Antiproteasen (z.B. α 1-Antitrypsin)
- Immunmodulatoren (z.B. CRP, AGP, SAA)

Des Weiteren werden die APPs nach ihrem Konzentrationsverlauf während der APR eingeteilt (Abb. 2). Als positive APPs werden Proteine bezeichnet, deren Konzentrationen aufgrund einer stimulierten Synthese ansteigen. Als negative APPs werden diejenigen definiert, deren Konzentrationen während der APR fallen. Das Absinken der Konzentration bei diesen Proteinen

kann erklärt werden durch einen erhöhten Verbrauch, durch Extravasation aufgrund einer gesteigerten Gefäßpermeabilität oder durch eine gehemmte Synthese in der Leber um mehr Aminosäuren für die Bildung positiver APPs bereitzustellen (Paltrinieri, 2008; Kjelgaard-Hansen und Jacobsen, 2011).

Die positiven APPs, welche hauptsächlich Glykoproteine darstellen (Ceron et al., 2005), werden in der veterinärmedizinischen Wissenschaft je nach Höhe und Schnelligkeit ihres Konzentrationsanstiegs weiter unterteilt in „major“ APPs (maAPPs) und „moderate“ APPs (moAPPs) (Ceron et al., 2005; Kann et al., 2012). In manchen Studien werden daneben noch „minor“ APPs (miAPPs) definiert (Paltrinieri, 2008; Eckersall und Bell, 2010; Kjelgaard-Hansen und Jacobsen, 2011). MaAPPs bei Hunden und Katzen reagieren auf einen Stimulus mit einem 10- bis 100-fachen Konzentrationsanstieg (Ceron et al., 2005). Beim Menschen wurden bis zu 1000-fache Konzentrationsanstiege gemessen (Kushner, 1982). Weitere Eigenschaften der maAPPs sind ein rascher Konzentrationsanstieg mit einem Peak 24 – 48 Stunden nach dem Stimulus, ein schnelles Absinken der Konzentration aufgrund einer kurzen Halbwertszeit und eine niedrige Serumkonzentration im gesunden Tier (Ceron et al., 2005; Eckersall und Bell, 2010; Kjelgaard-Hansen und Jacobsen, 2011). MoAPPs zeigen während der APR einen 2- bis 10-fachen Konzentrationsanstieg mit einem Peak 2 – 3 Tage nach einer Gewebeschädigung. Verglichen mit den maAPPs sinkt die Konzentration aufgrund einer längeren Halbwertszeit langsamer. Zudem ist die physiologische Konzentration im gesunden Tier höher (Ceron et al., 2005; Eckersall und Bell, 2010; Kjelgaard-Hansen und Jacobsen, 2011).

In der Humanmedizin werden die APPs meist in Typ 1 und Typ 2 APPs unterteilt. Einteilungskriterium ist hier die Induktion der APP-Synthese durch verschiedene Gruppen von Zytokinen. Die Synthese der Typ 1 APPs werden durch IL-1 ähnliche Zytokine (z.B. IL-1, TNF- α) und durch IL-6 ähnliche Zytokine (z.B. IL-6, IL-11) stimuliert, wohingegen die Produktion der Typ 2 APPs ausschließlich durch IL-6 ähnliche Zytokine angeregt wird. In der frühen Phase der APR wirken hauptsächlich IL-1 ähnliche Zytokine. Im weiteren Verlauf werden vermehrt IL-6 ähnliche Zytokine sezerniert (Baumann und Gauldie, 1994; Gabay und Kushner, 1999). Diese Einteilung wird eher selten in veterinärmedizinischen Veröffentlichungen beschrieben (z.B. Petersen et al., 2004).

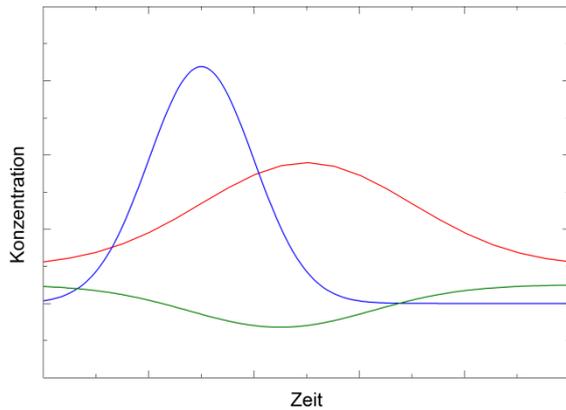


Abb. 2: Schematische Darstellung der Konzentrationsverläufe von Akute-Phase-Proteinen (APPs) nach einem immunologischen Stimulus. Die Konzentration der positiven APPs (blaue und rote Kurve) steigt während einer Akute-Phase-Reaktion, während die der negativen APPs (grüne Kurve) fällt. Die positiven APPs werden weiterhin eingeteilt nach Höhe und Schnelligkeit ihres Konzentrationsanstiegs in „major“ (blaue Kurve) und „moderate“ APPs (rote Kurve).

2.1.3 Akute-Phase-Proteine der Katze

Die Einteilung der APPs nach ihrem Konzentrationsverlauf ist spezies-spezifisch. Bei der Katze zählen AGP und SAA zu den maAPPs. Als moAPPs werden Hp und Ceruloplasmin definiert (Cray et al., 2009; Kjelgaard-Hansen und Jacobsen, 2011; Kann et al., 2012). Bis vor wenigen Jahren war CRP bei der Katze als positives APP nicht anerkannt (Ceron et al., 2005; Eckersall und Bell, 2010; Kjelgaard-Hansen und Jacobsen, 2011). In neueren Untersuchungen wurde jedoch nachgewiesen, dass die Konzentration des CRPs ebenfalls stark während der APR ansteigt (Gil et al., 2014; Leal et al., 2014). Als negative APPs der Katze werden u.a. Albumin und Transferrin definiert (Paltrinieri, 2008). Albumin, welches spezies-übergreifend ein negatives APP darstellt (Mackiewicz, 1997), ist hinsichtlich seiner Rolle während der APR bei der Katze kaum untersucht (Paltrinieri, 2008). Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten APPs näher dargestellt.

Das saure α 1-Glykoprotein (AGP), welches auch als Orosomukoid bezeichnet wird, ist ein stark glykosyliertes Protein. Die Hauptprotein-Komponente ist Seromukoid (Fournier et al., 2000; Ceron et al., 2005). Es gehört zu den Lipokalinen, eine Gruppe von Proteinen, welche hydrophobe Moleküle binden und in die Zelle transportieren können (Logdberg und Wester, 2000). AGP hat antiinflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften, indem es die Produktion von Zytokinen durch Lymphozyten kontrolliert und die Immunantwort von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten verändert (Hochepped et al., 2003). Eine Besonderheit des AGPs ist die posttranslationale Veränderung seines Glykosylierungsmusters während Erkrankungen, welche die immunmodulatorischen Funktionen des AGPs beeinflusst (Hochepped et al., 2003; Ceciliani und Pocacqua, 2007). Bei an Feliner Infektiöser Peritonitis (FIP) erkrankten Katzen wurde hyposialyliertes AGP nachgewiesen (Ceciliani et al., 2004). Die Bedeutung dieser strukturellen Veränderung des AGPs in Bezug auf die Pathogenese von FIP

ist Gegenstand derzeitiger Forschung.

Serum-Amyloid-A (SAA) ist ein Apolipoprotein, welches sich mit den Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) im Plasma verbindet. Der Aufbau des felines SAAs ist dem des humanen und kaninen SAAs sehr ähnlich, da es ein phylogenetisch hoch konserviertes Protein darstellt (Woo et al., 1993; Ohno et al., 1999). Es transportiert Cholesterol im Blut zur Leber (Kisilevsky und Manley, 2012) und hat eine Vielzahl an immunmodulatorischen Eigenschaften, wie z.B. die chemotaktische Rekrutierung von Entzündungszellen und Verminderung der Entzündungsprozesse durch Hemmung der Lymphozyten-Proliferation (Xu et al., 1995; Gatt et al., 1998; Paltrinieri, 2008). SAA steht neben seiner Rolle als APP durch eine weitere Eigenschaft im Fokus der veterinärmedizinischen Wissenschaft: Es ist Vorläufer des Proteins Amyloid A, welches bei der AA-Amyloidose Hauptbestandteil der unlöslichen Fibrillen ist. Bei Abessinier-Katzen ist eine familiäre Form (DiBartola et al., 1989; Paltrinieri et al., 2015), bei Siamkatzen sind hepatische und generalisierte Amyloidosen beschrieben (van der Linde-Sipman et al., 1997).

Haptoglobin (Hp) ist ein α 2-Glykoprotein, welches aus 2 Untereinheiten besteht. Im Gegensatz zum humanen Hp sind diese beiden Untereinheiten über eine nicht kovalente Bindung vereinigt (Mominoki et al., 1995). Hp kann mit freiem Hämoglobin (Hb) sehr feste Komplexe bilden, welche im Körper durch das retikuloendotheliale System abgebaut werden (Harvey und Gaskin, 1978; Ascenzi et al., 2005). Durch diese Eigenschaft wirkt es protektiv und antibakteriell, da es einerseits einen oxidativen Zellschaden in der Niere durch Ausscheiden des Hb verhindert und andererseits das Eisen des Hb als Substrat für Bakterien limitiert (Dobryszczycka, 1997). Daneben hat es immunmodulatorische Eigenschaften, wie z.B. die Hemmung der Phagozytose und Chemotaxis (Rossbacher et al., 1999).

2.1.4 Messung der Akute-Phase-Proteine

Grundsätzlich können 2 Messmethoden zur Bestimmung von APPs unterschieden werden: Biochemische Assays und Immunassays. Der Vorteil der biochemischen Tests ist, dass sie multispezies-spezifisch sind. Die Mehrheit der Messmethoden sind jedoch Immunassays, welche auf Antigen-Antikörper-Bindungen beruhen und deshalb meist durch mangelnde oder fehlende Kreuzreaktivität zwischen Antiserum einer bestimmten Spezies und Antigenen einer anderen Spezies spezies-spezifisch sind. Daher müssen für APPs entweder neue Immunassays entwickelt oder die für eine andere Spezies bereits validierten Tests für die neue Spezies evaluiert werden. In beiden Fällen ist eine objektive Validierung der Assays notwendig und grundlegend, um ein APP als Biomarker bei dieser Spezies zu etablieren (Eckersall et al., 1999b; Kjelgaard-Hansen und Jacobsen, 2011). Darüber hinaus bedarf es einer internationalen Standardisierung und Harmonisierung durch eine einheitliche Kalibrierung der Systeme. In der Kleintiermedizin existieren im Gegensatz zur Human- und Nutztiermedizin jedoch keine internationalen Referenzpräparate (Skinner, 2001; Eckersall et al., 2014).

Zur Messung des AGPs stehen Immunassays zur Verfügung, welche spezies-spezifische Antisera verwenden. Für die Katze war ein radialer Immundiffusionstest (SRID) bis 2014 kommerziell erhältlich („PHASE“ Feline α 1 Acid Glycoprotein SRID, Tridelata Development Limited, Maynooth, Irland). Die Messmethode nach Mancini beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung in Form eines sichtbaren Präzipitationsringes. Die anti-felinen Antikörper sind in Agar-Gel inkorporiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 – 48 Stunden kann der Durchmesser des Ringes gemessen werden. Dieser ist direkt proportional zur AGP-Konzentration (Mancini et al., 1965). Der bis 2014 erhältliche SRID war lediglich vom Hersteller validiert. Eine unabhängige Validierung für felines AGP ist nicht veröffentlicht. Trotzdem wurde er in der Mehrheit der aktuellen Studien zur Messung verwendet (z.B. Gil et al., 2014; Kann et al., 2014; Leal et al., 2014; Paltrinieri et al., 2014). Alternativ entwickelten und validierten Bence und Kollegen (2005) einen turbidimetrischen Immunassay (TIA), welcher jedoch nicht kommerziell erhältlich ist und daher nur in einer weiteren Studie zur Bestimmung des felines AGPs verwendet wurde (Korman et al., 2012).

Zur Messung des SAAs stehen ebenfalls Immunassays zur Verfügung. Im Gegensatz zu AGP wurden für dieses Protein multispezies-spezifische Tests entwickelt. Die eingesetzten Antikörper weisen eine hohe Kreuzreaktivität zwischen den Spezies auf, welche auf die phylogenetisch hohe Konservierung des SAAs zurückzuführen ist (Woo et al., 1993). Für die Katze existieren 3 validierte Tests. Ein TIA und ein Latex-Agglutinationstest (LAT) für humanes SAA wurden zur Detektion des felinen SAAs evaluiert (Hansen et al., 2006; Tamamoto et al., 2008; Christensen et al., 2012). In beiden Fällen führt die Antigen-Antikörper-Bindung zur Agglutination, welche spektrophotometrisch gemessen und darüber die jeweilige SAA-Konzentration bestimmt wird. Da der TIA im Gegensatz zum LAT kommerziell erhältlich ist (SAA-TIA, LZ-SAA, Eiken Chemical Co., Tokio, Japan), wurde er in einer Vielzahl von Studien zur Messung verwendet (z.B. Korman et al., 2012; Tamamoto et al., 2014). In gleichem Maße wurde ein kommerziell erhältlicher Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) in aktuellen Studien benutzt (z.B. Gil et al., 2014; Leal et al. 2014). Der Assay („PHASE“ RANGE Multispecies SAA ELISA, Tridelata Development Limited, Maynooth, Irland) basiert auf der Bindung des SAAs durch monoklonale Fänger- und Detektionsantikörper, welche durch Zugabe eines Chromogens in einem Farbumschlag resultiert. Die Farbintensität ist direkt proportional zur SAA-Konzentration. Dieser Test wurde in einer aktuellen Studie hinsichtlich Präzision mit guten Ergebnissen validiert (Paltrinieri et al., 2015).

Im Gegensatz zu SAA und AGP werden zur Messung des Hp überwiegend biochemische Assays verwendet. Die Bestimmung von Hp basiert auf der Fähigkeit des Proteins Hb zu binden (Harvey, 1976). Die Hp-Konzentration kann spektrophotometrisch durch eine konzentrationsabhängige Absorptionsveränderung gemessen werden. Diese kann entweder direkt durch die Hp-Hb-Komplexe (Harvey, 1976) oder indirekt durch einen Farbumschlag verursacht sein

(Makimura und Suzuki, 1982). Letzteres Prinzip beruht auf unterschiedlichen peroxidatischen Eigenschaften von freiem und gebundenem Hb. Die Peroxidase-Aktivität des freien Hb ist bei einem niedrigen pH gehemmt, wohingegen die Peroxidase-Aktivität des gebundenen Hb bei einem niedrigen pH erhalten ist. Die Zugabe eines Chromogens resultiert bei einem niedrigen pH in einem Farbumschlag je nach konzentrationsabhängigen peroxidatischen Eigenschaften. Für die Katze existiert ein kommerziell erhältlicher spektrophotometrischer Assay („PHASE“ Haptoglobin Assay, Tridelta Development Limited, Maynooth, Irland), der auf diesem Prinzip basiert. Er wurde für kanines Hp objektiv validiert (Martinez-Subiela und Ceron, 2005). Eine vom Hersteller unabhängige Evaluierung dieses multispezies-spezifischen Tests zur Bestimmung des felines Hp ist nicht veröffentlicht. Trotzdem ist es die Standardmethode in aktuellen Studien zur Messung von Hp bei Katzen (z.B. Kann et al., 2012; Korman et al., 2012; Tvarijonaviciute et al., 2012; Kann et al., 2014). Immunassays wurden ebenfalls für felines Hp entwickelt. So ist seit 3 Jahren ein ELISA zur Detektion von kaninem und felinem Hp kommerziell erhältlich (TECO Feline & Canine Haptoglobin ELISA, TECOmedical Group, Sissach, Schweiz). Dieser wurde jedoch nicht vom Hersteller unabhängig validiert.

2.1.5 Akute-Phase-Proteine als Biomarker

APPs können in der Medizin als Biomarker hinsichtlich Diagnostik, zur Überwachung des Therapieerfolgs (Monitoring), zur Prognostik und zum Gesundheitscheck eingesetzt werden. Sie stellen hoch sensitive, jedoch unspezifische Biomarker für entzündliche Prozesse dar (Eckersall und Bell, 2010).

Als diagnostische Biomarker sind sie im Vergleich zu Leukozyten sensitiver bezüglich dem Nachweis von Entzündungsreaktionen. Beispielsweise zeigte ein Fallbericht bei einer an Pankreatitis erkrankten Katze, dass SAA bereits beim Einsetzen der klinischen Symptomatik erhöht war, wohingegen die Leukozyten noch nicht angestiegen waren (Tamamoto et al., 2009). Des Weiteren können erhöhte APP-Konzentrationen bei einem scheinbar gesunden Tier auf subklinische Erkrankungen hinweisen. So waren die AGP-Konzentrationen bei Zwingerhunden erhöht, welche innerhalb der folgenden 2 Wochen klinische Symptome entwickelten oder verstarben (Ohwada und Tamura, 1993). Ein Konzentrationsanstieg der APPs kann zudem helfen einen entzündlichen Prozess von einem nicht entzündlichen Prozess oder eine systemische von einer lokalen Entzündung als Ursache des gleichen Symptoms zu unterscheiden. Zum Beispiel kann bei einer inappetenten Katze eine erhöhte SAA-Konzentration hinweisend sein auf eine systemischen Infektionserkrankung, wohingegen orale Veränderungen oder Enteritiden keinen signifikanten Konzentrationsunterschied im Vergleich zu gesunden Katzen verursachen (Sasaki et al., 2003). Die Höhe des Konzentrationsanstiegs kann zudem Aufschluss geben über den Schweregrad einer Erkrankung. So konnte z.B. ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Viruslast bei an Felines Immunodefizienz-Virus (FIV) erkrankten

Katzen und der SAA-Konzentration nachgewiesen werden (Kann et al., 2014). Die Limitationen der APPs als diagnostische Biomarker ergeben sich aus ihrer unspezifischen Induzierbarkeit. Eine erhöhte APP-Konzentration kann lediglich das Vorhandensein eines entzündlichen Prozesses detektieren. APPs können nicht als diagnostische Biomarker zum Nachweis der Ursache der APR verwendet werden (Ceron et al., 2005).

Als Biomarker hinsichtlich Monitoring kann der Konzentrationsverlauf von APPs das Ansprechen auf eine Therapie widerspiegeln. Durch die hohe Sensitivität der APPs sinkt die Konzentration bei einer erfolgreichen Behandlung schnell. Auf der anderen Seite kann ein Konzentrationsanstieg der erste Hinweis auf ein Rezidiv sein. Zum Beispiel wurde dies in einem Fallbericht bei einer an Pankreatitis erkrankten Katzen nachgewiesen. Hier folgte auf einen anfänglichen Therapieerfolg mit einem schnellen SAA-Konzentrationsabfall kurze Zeit später ein Rezidiv mit einem raschen Anstieg der Konzentration (Tamamoto et al., 2009). Bei immunsupprimierten Tieren kann durch Verlaufsmessungen von APPs eine Stimulation des Immunsystems detektiert werden, wie etwa bei Infektionen während Chemotherapie. Ein anderes Beispiel stellt eine Studie aus dem Jahr 2014 dar, in welcher APPs bei an FIV und/oder Felines Leukämie-Virus (FeLV) erkrankten Katzen unter Interferon- ω Therapie anstiegen (Leal et al., 2014). Jedoch ist auch die Aussagekraft der APPs hinsichtlich Monitoring aufgrund der unspezifischen Induzierbarkeit der APPs eingeschränkt. So kann beispielsweise ein erneuter Konzentrationsanstieg nach Behandlung einer Erkrankung durch eine andere Krankheit und nicht durch ein Rezidiv bedingt sein.

Zuletzt können APPs als Biomarker hinsichtlich Prognostik Anwendung finden. Dies beruht einerseits darauf, dass die Höhe der APP-Konzentration die Intensität der ablaufenden APR widerspiegelt und dass neben akuten auch chronische Entzündungen, wie Neoplasien, eine verlängerte APR verursachen können. Zudem können über einen längeren Zeitraum erhöhte APP-Konzentrationen wiederum zu Komplikationen führen, z.B. sekundäre Amyloidose. In einer Studie aus dem Jahr 2013 wurde festgestellt, dass SAA einen signifikanten prognostischen Faktor bei unterschiedlich erkrankten Katzen darstellt (Tamamoto et al., 2013).

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Limitationen der APPs wird daher erstens eine gemeinsame Messung von mindestens einem maAPP und einem moAPP empfohlen. Solche APP-Profile können aufgrund der unterschiedlichen Kinetik und Eigenschaften mehr Informationen zur ablaufenden Entzündungsreaktion liefern. Zweitens werden Verlaufs- anstatt Einzelmessungen von APPs bevorzugt, da eine einmalige Bestimmung eines APPs lediglich eine Momentaufnahme ohne Kenntnis eines folgenden Anstiegs oder Abfalls darstellt. Deshalb werden in aktuellen Studien vermehrt Verlaufsmessungen durchgeführt (Ceron et al., 2005; Ceron et al., 2008).

2.1.6 Studien über Akute-Phase-Proteine bei der Katze

Verglichen mit anderen Haustieren, wie beispielsweise Hund und Rind, wurden bei der Katze kaum Studien zur Evaluierung von APPs als Biomarker durchgeführt (Eckersall und Bell, 2010). Bei gesunden Katzen wurden hauptsächlich AGP und SAA zur Erhebung von Referenzbereichen oder für Kontrollgruppen bestimmt (*Anhang I*). Untersuchungen bei erkrankten Katzen sind im Anhang tabellarisch nach Krankheiten aufgelistet (*Anhang II*). Bisheriger Forschungsschwerpunkt liegt in der Untersuchung von AGP und SAA als diagnostische Marker bei infektiös erkrankten Katzen. Größte Bedeutung erlangten dabei Studien von AGP bei an FIP erkrankten Katzen. Erhöhte Konzentrationen dieses APPs im Serum und in peritonealer Flüssigkeit sind als diagnostischer Indikator für diese Erkrankung anerkannt (Duthie et al., 1997; Giordano et al., 2004). Die Messung von Hp stellt in den Studien über feline APPs eine Ausnahme dar.

Erst in den letzten Jahren wurde die Bedeutung der APPs hinsichtlich Monitoring und Prognostik untersucht. Die Anzahl dieser Studien ist jedoch weiterhin sehr gering (Tamamoto et al., 2009; Korman et al., 2012; Tamamoto et al., 2013; Gil et al., 2014; Leal et al., 2014). Zudem beschränken sich die Studien zum Monitoring auf Untersuchungen von immunsupprimierten Katzen. Die einzige Ausnahme stellt ein Fallbericht von Tamamoto und Kollegen dar. Hierfür wurden bei einer an Pankreatitis erkrankten Katze SAA-Verlaufsmessungen durchgeführt (Tamamoto et al., 2009). Auch Untersuchungen, welche mindestens ein maAPP und ein moAPP in die Messungen einbeziehen, sind trotz steigender Tendenz rar (Duthie et al., 1997; Kajikawa et al., 1999; Giordano et al., 2004; Korman et al., 2012; Gil et al., 2014; Kann et al., 2014; Leal et al., 2014). Daher bedarf es weiterer Studien zur Erforschung der Rolle der APPs hinsichtlich Monitoring, die mindestens ein maAPP und ein moAPP über einen längeren Zeitraum bei erkrankten Katzen messen. Kaum untersuchte Krankheiten stellen beispielsweise untere Harnwegserkrankungen und feliner Diabetes mellitus dar.

2.2 Obstruktive FLUTD

Die Bezeichnung der „Feline Lower Urinary Tract Disease“ (FLUTD) beschreibt einen Symptomkomplex, welcher mit einer heterogenen Gruppe von Erkrankungen der ableitenden Harnwege (*Vesica urinaria* und *Urethra*) bei der Katze assoziiert ist. Die Krankheiten sind hinsichtlich ihrer Ätiologie und Pathogenese verschieden. Eine Form der unteren Harnwegserkrankungen stellt die obstruktive FLUTD dar. Dabei kommt es zu einem partiellen oder vollständigen Verschluss der *Urethra*. Zu den Symptomen einer FLUTD gehören Dysurie, Strangurie, Hämaturie, Pollakisurie und Periurie. Anurie tritt bei einem vollständigen Harnröhrenverschluss auf (Hostutler et al., 2005). Harnrückstau ist wegen hochgradiger Elektrolytverschiebungen und Störungen des Säure-Basen- sowie Wasser-Haushaltes ein lebensbedrohlicher Notfall (Osborne et al., 2011). FLUTD zählt zu einem der häufigsten Vorstellungsgründe in der veterinärmedizinischen Praxis.

Sie tritt bei ungefähr 1,5% der in Tierarztpraxen untersuchten Katzen auf (Lund et al., 1999; Buffington et al., 2006). Von den betroffenen Katzen erkranken 28,6 – 58% an der obstruktiven Form (Gerber et al., 2005; Saevik et al., 2011). Die Prävalenz der FLUTD ist durch vermehrte Wohnungshaltung und Mehrkatzenhaushalte steigend. Die obstruktive FLUTD tritt vor allem bei männlichen kastrierten Tieren auf (Hostutler et al., 2005). Ungefähr 30 verschiedene Ursachen für FLUTD wurden beschrieben (Osborne et al., 1996). Die häufigste Obstruktionsursache sind in 55% der Fälle eines Harnröhrenverschlusses Harnpfropfen, wohingegen Harnsteine bei nur 15% der erkrankten Katze vorkommen. Bei 28% der Katzen kann kein intraluminal gelegenes Material nachgewiesen werden (Kruger et al., 1991). Zu diesen zählen hauptsächlich die an Feliner Idiopathischer Zystitis (FIC) erkrankten Katzen. FIC stellt die häufigste Ursache der unteren Harnwegserkrankungen im Allgemeinen dar (Gerber et al., 2005; Saevik et al., 2011; Dorsch et al., 2014). Sie steht im Fokus aktueller Forschungen, da sie bei manchen Tieren Teil eines komplexen systemischen Prozesses mit weiteren Begleiterkrankungen zu sein scheint, bei dem Stress als Triggerfaktor eine zentrale Rolle spielt (Buffington et al., 2014). Ein Harnröhrenverschluss kann bei an FIC erkrankten Katzen durch Urethritiden, urethrale Muskelspasmen und Harnpfropfen ausgelöst werden (Gerber et al., 2005). Weitere Obstruktionsursachen sind Neoplasien, Harnröhrenstrikturen, extraluminale Entzündungen oder Umfangsvermehrungen, neurologische Störungen und anatomische Missbildungen (Osborne et al., 2011).

Die Diagnose einer obstruktiven FLUTD wird durch eine auffällige Anamnese und klinische Allgemeinuntersuchung gestellt, in der eine vergrößerte, pralle und schmerzhafte Harnblase palpabel ist (Gunn-Moore, 2014). Die Therapie eines Harnröhrenverschlusses besteht in der Behebung der Obstruktion durch Ausmassieren des verstopfenden Materials aus der Penisspitze oder durch Schieben eines Harnkatheters. Zudem benötigen die Patienten intravenöse Infusions- und Schmerztherapie und gegebenenfalls einen antibiotischen Schutz. Nach erfolgreicher Behebung des Harnröhrenverschlusses müssen die Patienten intensiv überwacht werden, da es zu Komplikationen, wie einer postobstruktiven Diurese, und zu Rezidiven kommen kann (Osborne et al., 2011). Urethrale Re-Obstruktion kommt bei 22 – 35% der Katzen innerhalb von 6 Monaten nach einer Episode vor (Gerber et al., 2008; Segev et al., 2011). Zur Prophylaxe weiterer Rezidive werden perineale Urethrostomien empfohlen (Hostutler et al., 2005).

Bisher wurden nur SAA-Konzentrationen als Einzelmessungen bei Katzen mit FLUTD bestimmt. Sasaki et al. wiesen einen statistisch signifikanten Konzentrationsunterschied zu den gesunden Katzen nach (Sasaki et al., 2003), wohingegen Tamamoto und Kollegen bei nur einer von 7 Katzen mit Zystitis eine erhöhte SAA-Konzentration feststellten (Tamamoto et al., 2013). Untersuchungen von APPs bei an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen zur Untersuchung ihrer Rolle als Biomarker hinsichtlich Diagnostik und Monitoring existieren bisher nicht.

2.3 Feliner Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) ist eine häufige Endokrinopathie der Katze. Er ist definiert als eine persistierende Hyperglykämie, welche sich bei den betroffenen Patienten durch Polyurie, Polydipsie und Polyphagie klinisch manifestiert (Reusch, 2015).

Die Prävalenz des feline DM ist steigend. In einer US-amerikanischen Tierklinik nahm sie von 0,08% im Jahr 1970 auf 1,2% im Jahr 1999 zu (Prahl et al., 2007). Als Risikofaktoren gelten Übergewicht, physische Inaktivität, Wohnungshaltung, ein Alter von > 10 Jahren, das männliche Geschlecht und Kastration (Panciera et al., 1990). Ungefähr 80% der betroffenen Katzen leiden an einer Diabetesform, die dem DM Typ-2 des Menschen entspricht. Dieser ist zum einen durch eine beeinträchtigte Insulinwirkung in Leber, Muskulatur und Fettgewebe (Insulinresistenz) und zum anderen durch eine Dysfunktionalität der pankreatischen β -Zellen verursacht (Reusch, 2015).

Relativer oder absoluter Insulinmangel führt zu einer verminderten Glukoseaufnahme in Muskulatur, Fettgewebe und Leber sowie zu einer ungehinderten Glukoseproduktion in der Leber durch Glukoneogenese und Glykogenolyse. Dies hat eine Hyperglykämie zur Folge, welche wiederum bei Überschreiten der Nierenschwelle (ca. 14 – 16 mmol/l) zu einer Glukosurie führt. Das Resultat der Glukosurie ist eine osmotische Diurese, welche sich als Polyurie klinisch manifestiert und durch eine Polydipsie kompensiert wird. Neben dem Glukose-Stoffwechsel werden auch der Protein- und Fett-Metabolismus beeinflusst. Eine gesteigerte Proteolyse bewirkt einen Gewichtsverlust trotz Polyphagie. Die durch Lipolyse entstehenden freien Fettsäuren werden in der Leber durch β -Oxidation zunächst zu Acetacetat und folgend zu β -Hydroxybutyrat (β -HB) und Aceton umgebaut. Diese 3 Ketonkörper dienen als Energielieferant in zahlreichen extrahepatischen Geweben (Bloom und Rand, 2014; Reusch, 2015).

Die Diagnose eines feline DM wird bei typischen Symptomen (z.B. Polyurie, Polydipsie, Polyphagie) mit persistierender Hyperglykämie und Glukosurie gestellt. Die Therapie umfasst regelmäßige Insulin-Applikationen und eine Diät. Therapieziele sind zunächst das Erreichen einer Normoglykämie unter Insulin und damit Symptomlosigkeit (Reusch, 2015). Das hauptsächliche Ziel besteht jedoch in einer Remission des DM, welcher je nach Management und Zeitpunkt des Therapiebeginns bei 34 – 84% der Katzen auftreten kann (Roomp und Rand, 2009).

Eine lebensbedrohliche Komplikation des feline DM stellt die diabetische Ketoazidose (DKA) dar. Sie ist eine hochgradige Stoffwechselentgleisung bei Insulinmangel, welche intensivmedizinisch betreut werden muss. Die gesteigerte Mobilisierung freier Fettsäuren einerseits und die Verlagerung der hepatischen Stoffwechselforgänge von der Fettsynthese zur β -Oxidation und Ketogenese andererseits führen zu einer Anreicherung von Ketonkörpern im Blut. Dies resultiert in einer hochgradigen metabolischen Azidose, einer gesteigerten osmotischen Diurese, einer Hyperosmolalität, Dehydratation sowie in hochgradigen Elektrolytverschiebungen. Die DKA kann sich bei Katzen mit einem noch nicht diagnostizierten DM

entwickeln oder bei Patienten, deren Insulin-Dosierung zu niedrig eingestellt ist. Häufig treten im letzteren Fall zusätzlich weitere Erkrankungen, wie Infektionen oder andere hormonelle Störungen, auf. Die Behandlung umfasst eine intravenöse Infusionstherapie, Substitution von Elektrolyten (v.a. Kalium und Phosphat), Applikationen eines kurz wirksamen Insulins sowie symptomatische Therapie (z.B. Antiemetika). Die betroffenen Katzen müssen engmaschig kontrolliert und intensiv überwacht werden (Rand, 2013; Nelson, 2015).

Katzen mit einer diabetischen Ketose (DK) ohne metabolische Azidose entwickeln meist neben den typischen Symptomen eines DM keine weiteren Symptome und erscheinen dem Besitzer daher meist gesund. Zeigen die Patienten keine Anzeichen einer systemischen Erkrankung und sind in der klinischen Untersuchung keine schwerwiegenden Abweichungen vom physiologischen Zustand erkennbar, sind in der Regel Infusionstherapie und intensivmedizinische Betreuung nicht notwendig. In diesen Fällen kann ein kurzwirksames Insulin mehrmals täglich unter Glukose-Kontrolle appliziert werden. Eine länger anhaltende DK ist häufig hinweisend auf eine zusätzliche Erkrankung und/oder eine zu niedrig eingestellte Insulindosierung (Rand, 2013; Nelson, 2015). Die Katzen müssen häufig kontrolliert werden, da bei einer ansteigenden Konzentration der Ketonkörper das Risiko einer DKA steigt. Bei einer Cut-Off-Konzentration des β -HB von 2,4 mmol/l konnte eine Sensitivität für eine DKA von 100% und eine Spezifität von 87% nachgewiesen werden (Weingart et al., 2012a).

Untersuchungen von APPs bei an DM erkrankten Katzen sind rar. Bisher wurde nur SAA als Einzelmessung bestimmt. In einer Studie von Tamamoto und Kollegen wurde bei 2 von 7 bzw. bei 3 von 8 Katzen eine erhöhte SAA-Konzentration festgestellt (Tamamoto et al., 2008; Tamamoto et al., 2013). In einer Untersuchung von Sasaki und seinem Team wurde ein signifikanter Konzentrationsunterschied zu den gesunden Katzen nachgewiesen (Sasaki et al., 2003). Es besteht Forschungsbedarf hinsichtlich der Bedeutung von APPs als Biomarker zur Diagnostik und zum Monitoring bei an einem unkomplizierten und komplizierten DM erkrankten Katzen.

3 ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN

Ziele der vorliegenden Arbeit waren erstens die objektive Validierung eines seit 3 Jahren kommerziell erhältlichen ELISAs zur Messung des felinen Hp. Zweites Ziel war die Evaluierung von AGP, SAA und Hp als Biomarker bei an obstruktiver FLUTD und an DM erkrankten Katzen. Für die Validierungsstudie wurde der ELISA nach internationalen Empfehlungen evaluiert (Kjelgaard-Hansen und Jacobsen, 2011; Flatland et al., 2014). Dies umfasste zunächst die analytische Validierung. Hierfür wurden die Präzision, die Richtigkeit und die Nachweisgrenze erhoben sowie ein Methodenvergleich mit dem spektrophotometrischen Assay durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die klinische Evaluierung des ELISAs bei gesunden Katzen und erkrankten Katzen ohne und mit einer systemischen Entzündung („Overlap Performance“). Folgende Fragen sollten geklärt werden:

1. Ist der ELISA ein valider Test hinsichtlich Präzision, Richtigkeit und Nachweisgrenze?
2. Stimmen die im ELISA gemessenen Hp-Konzentrationen mit denen des spektrophotometrischen Assays für klinische Zwecke ausreichend überein?
3. Können durch die im ELISA gemessenen Hp-Konzentrationen Katzen mit einer systemischen Entzündung von anderen Katzen differenziert werden?

In der prospektiven klinischen Studie wurden zunächst Referenzbereiche für AGP, SAA und Hp etabliert. Im Anschluss wurde die Bedeutung der 3 APPs als Biomarker bezüglich Diagnostik und Monitoring bei an obstruktiver FLUTD und an DM erkrankten Katzen untersucht. Die erkrankten Katzen wurden hierfür nach Krankheitsverlauf bzw. Schweregrad der Erkrankung in je 2 Gruppen (unkompliziert und kompliziert) eingeteilt. Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

4. Führen die hier untersuchten Erkrankungen zu einer Konzentrationserhöhung von AGP, SAA und Hp im Vergleich zu den gesunden Katzen?
5. Gibt es Konzentrationsunterschiede von AGP, SAA und Hp zwischen der unkomplizierten und komplizierten Gruppe der jeweiligen Erkrankung?
6. Welches APP ist am besten zur Detektion von Katzen der komplizierten Gruppe der jeweiligen Erkrankung geeignet?
7. Wie stark korrelieren die APPs untereinander bei den erkrankten Katzen?
8. Stimmt der Konzentrationsverlauf des jeweiligen APPs mit der individuellen klinischen Entwicklung des Patienten überein?
9. Unterscheiden sich die Konzentrationsverläufe der jeweiligen APPs zwischen den unterschiedlichen Erkrankungen?
10. Werden die Konzentrationsverläufe der jeweiligen APPs bei den akut erkrankten Katzen durch den Zeitpunkt der Probenentnahme beeinflusst?

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Proben

Es wurden Serumproben von 56 Katzen gesammelt, welche in einem Zeitraum von Juni 2012 bis Januar 2014 an der Klinik für kleine Haustiere, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin vorgestellt wurden. In die Validierungsstudie wurden 50 Katzen eingeschlossen (Präzision und Richtigkeit, $n = 6$; Methodenvergleich, $n = 39$; Overlap Performance, $n = 47$). In die klinische Studie wurden insgesamt 53 Katzen aufgenommen (gesund, $n = 27$; obstruktive FLUTD, $n = 16$; DM, $n = 10$).

Die Probengewinnung erfolgte ausschließlich zu diagnostischen Zwecken. Die Einwilligung der Patientenbesitzer zur Verwendung etwaiger Probenreste für wissenschaftliche Untersuchungen wird routinemäßig bei Erstvorstellung an der Klinik für kleine Haustiere erteilt. Die Studie unterlag daher weder einer Genehmigungs- noch einer Anzeigepflicht.

Alle Katzen erhielten eine klinische Allgemeinuntersuchung sowie eine Analyse des Blutbildes (Sysmex XT-2000iV und Sysmex poch-100iV Diff, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) und der Blutchemie (Konelab 60i, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte; GemPremier3000, Instrumentation Laboratory, Kirchheim). Weitere diagnostische Maßnahmen wurden je nach Ermessen des behandelnden Tierarztes durchgeführt (z.B. venöse Blutgasanalyse, Messung der β -HB-Konzentration, Harnuntersuchung, röntgenologische und sonographische Untersuchung).

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der *Vena cephalica dexter/sinister*, der *Vena saphena lateralis dexter/sinister* oder der *Vena jugularis dexter/sinister*. Zur Serumgewinnung wurde das Blut in einem Probenröhrchen mit einem Gerinnungsaktivator (Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aufgefangen. Im Anschluss an eine 30-minütige Gerinnungszeit bei Raumtemperatur (20 – 25°C) wurde das Blut bei 3500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Heraeus Labofuge 400 Tischzentrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte) und anschließend in Eppendorf-Gefäße (Reagiergefäß 1,5 ml, Sarstedt, Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aliquotiert. Die Proben wurden innerhalb von 60 Minuten nach Abnahme bei 4°C und innerhalb der folgenden 24 Stunden bei -20°C für maximal 18 Monate gelagert. Um etwaige Veränderungen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu verhindern, wurden nur die benötigten Proben am Tag der jeweiligen Messung aufgetaut. Vor jeder Messung wurden die Aliquots sorgfältig gevortext. Die Empfehlungen der Hersteller bezüglich der Qualität der Proben wurden eingehalten. Lipämische und hochgradig hämolytische Proben wurden von allen Messungen ausgeschlossen. Zudem wurden geringgradig hämolytische Proben nicht im spektrophotometrischen Assay zur Messung des Hp verwendet.

4.2 Validierungsstudie des Haptoglobin-ELISAs

4.2.1 ELISA

Die Hp-Konzentration wurde mit einem kommerziell erhältlichen ELISA (TECO Feline & Canine Haptoglobin ELISA, TECOmedical Group, Sissach, Schweiz) gemessen. Der Assay basiert auf dem Sandwich-Prinzip und verwendet affinitätsgereinigte polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen felines und kanines Hp. Die Detektionsantikörper wurden mit Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) konjugiert. Durch Zugabe des Chromogens 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) resultiert die Hp-Antikörper-Bindung in einem blauen Farbumschlag. Dieser ist direkt proportional zur Hp-Konzentration. Zum Abstoppen des Farbumschlags wird Salzsäure verwendet. Die 6 Standardlösungen enthalten folgende Hp-Konzentrationen: 0, 125, 250, 500, 1000 und 2000 ng/ml. Die Proben wurden 1:10000 verdünnt. Der Messbereich umfasst laut Hersteller Konzentrationen von 0 – 20 mg/ml. Standards und Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (20 – 25°C) und wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Nach manuellem Vorwaschen und Zugabe des Assay-Puffers (100 µl) in die einzelnen Wells wurden je 20 µl von Standard- bzw. Probenlösung in die Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde die Platte über 1 Stunde auf einem Schüttler (Labor A: Titramax 100, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach; Labor B: IKA Shaker MTS 4, IKA-Werke GmbH Co. KG, Staufen) bei 500 rpm inkubiert. Nach Inkubation wurden die ungebundenen Antigene durch 3-maliges manuelles Waschen entfernt. Danach wurden je 100 µl der Anti-Hp/HRP-Lösung in die Wells pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf dem Schüttler bei 500 rpm wurde die Platte 5-mal manuell gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden je 100 µl des TMB-Substrates dazugegeben. Nach 15 – 30 Minuten wurden je 100 µl der Stopplösung in die Wells pipettiert. Die optischen Dichten (OD) wurden bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm) gemessen (Labor A: EMax Plus Microplate Absorbance Reader, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, USA; Labor B: iMark Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Der aus den Doppelmessungen berechnete Mittelwert der OD wurde ermittelt. Die Standardkurve wurde über eine 4-Parameter-logistische Regression auf einer linearen Skala erstellt (Labor A: SoftMax Pro Software, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, USA; Labor B: Microplate Manager 6, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Die Hp-Konzentrationen der Proben wurden durch Multiplizieren mit dem Verdünnungsfaktor in mg/ml berechnet.

4.2.2 Spektrophotometrischer Assay

Ein kommerziell erhältlicher spektrophotometrischer Assay („PHASE“ Haptoglobin Assay, Tridelta Development Limited, Maynooth, Irland) wurde als Vergleichsmethode in der vorliegenden Arbeit verwendet, da er in verschiedenen aktuellen Studien die Hauptmessmethode für Hp darstellt (Giordano et al., 2004; Kann et al., 2012; Korman et al., 2012; Tvarijonaviciute et al., 2012; Kann et al., 2014) und bereits zur Messung von felinem Hp im klinischen Alltag verwendet wird. Das Messprinzip, welches auf der Hp-Hb-Bindung beruht, wurde bereits im Kapitel 2.1.4 erklärt. Die 5 Standardlösungen enthalten folgende Hp-Konzentrationen: 0; 0,312; 0,625; 1,25 und 2,5 mg/ml. Wie vom Hersteller empfohlen, wurden die Proben zunächst unverdünnt gemessen. Bei einer Konzentration von $> 2,5$ mg/ml wurden sie 1:5 mit dem Verdünnungspuffer diluiert. Standards und Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (20 – 25°C) und wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden je 7,5 µl der Standards und Proben und folgend je 100 µl Hb in die Wells pipettiert. Nach einem kurzen vorsichtigen Schütteln der Platte wurden je 140 µl des Chromogens dazugegeben und die Mikrotiterplatte wurde für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die OD bei 630 nm gemessen (Labor A: EMax Plus Microplate Absorbance Reader, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, USA; Labor B: iMark Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Der aus den Doppelmessungen berechnete Mittelwert der OD wurde ermittelt. Die Standardkurve wurde über eine 4-Parameter-logistische Regression auf einer linearen Skala angefertigt (Labor A: SoftMax Pro Software, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, USA; Labor B: Microplate Manager 6, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Bei verdünnten Proben wurden die Hp-Konzentrationen in mg/ml durch Multiplizieren mit dem Verdünnungsfaktor berechnet.

4.2.3 Analytische Validierung

Die Präzision des ELISAs als Maß für den zufälligen Fehler wurde durch Ermittlung der Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten (CV) von 3 felinen Serumproben unterschiedlicher Konzentrationen ermittelt. Zur Berechnung der Intra-Assay-CVs wurden eine Probe 20 Mal und 2 Proben 10 Mal in jeweils zufälliger Reihenfolge innerhalb eines Messlaufs, d.h. auf einer Mikrotiterplatte, analysiert. Die Inter-Assay-CVs wurden berechnet aus der Messung derselben Proben in Duplikaten auf 4 verschiedenen Mikrotiterplatten, welche an 4 unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden.

Die Richtigkeit des Assays als Maß für die Abweichung des ermittelten Wertes vom „wahren Wert“ aufgrund eines systematischen Fehlers wurde indirekt durch die Linearität von Verdünnungsstufen („dilution linearity“) und durch die Wiederfindungsrate einer aufgestockten Probe („spiking recovery“) evaluiert. Zur Bestimmung der Linearität von Verdünnungsstufen wurden 4 Serumproben mit einer Hp-Konzentration von > 3 mg/ml fortlaufend mit dem

Verdünnungspuffer diluiert (1:5000, 1:10000, 1:20000). Die Proben wurden in Duplikaten innerhalb eines Messlaufs analysiert. Die ermittelten Konzentrationen wurden mit dem rechnerisch zu erwartenden Wert verglichen und als Wiederherstellung in Prozent angegeben. Die Wiederfindungsrate einer aufgestockten Probe wurde zur Ermittlung möglicher Interferenzen der Proben im ELISA analysiert. Da kein gereinigtes felines Hp als Spike-Lösung zur Verfügung stand, erfolgte die Bestimmung durch Zusatz eines 1:5 verdünnten Standards A zu 4 Serumproben. Die aus einer Doppelmessung ermittelte Konzentration des diluierten Standards betrug 3,84 mg/ml. Die aufgestockten Proben wurden in Duplikaten in zufälliger Reihenfolge innerhalb eines Messlaufs analysiert. Die Wiederfindungsrate wurde aus dem Vergleich der gemessenen Konzentration zum rechnerisch zu erwartenden Wert in Prozent kalkuliert.

Die Sensitivität des ELISAs wurde durch Bestimmung der Nachweisgrenze („detection limit“, DL) evaluiert. Das DL ist definiert als die Fähigkeit des ELISAs, die niedrigste Konzentration zu messen, die statistisch signifikant unterscheidbar vom Nullstandard („blank“) ist. Es wurde aus 20 Wiederholungsmessungen des Verdünnungspuffers berechnet.

Ein Methodenvergleich wurde durchgeführt, um den systematischen Fehler (Bias) und die Übereinstimmung zwischen den beiden Tests zu beurteilen. Als notwendige Voraussetzung für die Bewertung des Methodenvergleichs wurde zunächst die Wiederholbarkeit des ELISAs und des spektrophotometrischen Assays nach Bland und Altman (Bland und Altman, 1986; Bland und Altman, 1999) analysiert. Für den Methodenvergleich wurden 39 feline Serumproben von gesunden und von erkrankten Katzen verwendet und die Hp-Konzentrationen wurden im ELISA und im spektrophotometrischen Assay ermittelt. Es wurden Serumproben ausgewählt, deren Konzentrationen die im klinischen Einsatz zu erwartende Spanne an Werten umfassten (Jensen und Kjelgaard-Hansen, 2006).

Alle Messungen wurden von derselben Person durchgeführt. Die Methodvalidierung des ELISAs wurde in 2 verschiedenen Labors umgesetzt: Labor A für die Bestimmung der Intra-Assay-Präzision (alle Messungen), der Inter-Assay-Präzision (12 von 24 Messungen), der Verdünnungs- und Spike-Studie (alle Messungen) und des Methodenvergleichs (alle Messungen); Labor B für die Inter-Assay-Präzision (12 von 24 Messungen). Alle mit dem spektrophotometrischen Assay durchgeführten Messungen wurden in Labor A durchgeführt.

4.2.4 Overlap Performance

Anhand der Diagnose wurden 47 Katzen in folgende 3 Gruppen unterteilt: gesunde Katzen ($n = 27$), erkrankte Katzen ohne systemische Entzündung ($n = 12$) und erkrankte Katzen mit systemischer Entzündung ($n = 8$). Erkrankte Katzen ohne systemische Entzündung umfassten Katzen mit einem diagnostizierten und gut eingestellten Diabetes mellitus ($n = 3$) und Katzen mit einer unteren Harnwegserkrankung ($n = 9$) ohne Anzeichen einer systemischen Entzündung. Als Katzen mit einer systemischen Entzündung wurden stationär betreute Patienten klassifiziert, welche an diabetischer Ketoazidose ($n = 5$), an Pankreatitis ($n = 2$) und an hochgradiger diabetischer Ketose ($n = 1$) erkrankt waren. Bei diesen Katzen wurden zudem Begleiterkrankungen diagnostiziert, wie beispielsweise Nephropathie. Sie erfüllten zum Zeitpunkt der Probenentnahme mindestens 2 der folgenden Kriterien für eine systemische Entzündungsreaktion (Brady et al., 2000): (1) Rektaltemperatur $\leq 37,8^\circ\text{C}$ oder $\geq 39,7^\circ\text{C}$; (2) Herzfrequenz ≤ 140 Schläge/Minute oder ≥ 225 Schläge/Minute; (3) Atemfrequenz ≥ 40 Züge/Minute; (4) Leukozytenzahl $\leq 5,0$ G/l oder $\geq 19,5$ G/l oder Linksverschiebung ($> 5\%$ stabkernige neutrophile Granulozyten).

Die Beurteilung der Overlap Performance erfolgte anhand des Vergleichs der Verteilung der Hp-Konzentrationen zwischen den einzelnen Gruppen. Alle Messungen wurden von derselben Person in 2 verschiedenen Labors durchgeführt (Labor A: 18 Messungen; Labor B: 29 Messungen).

4.2.5 Statistische Auswertung und Performance-Ziele

Falls verfügbar wurden die Qualitätsziele bezüglich der Performance (d.h. der Leistung) des ELISAs von zuvor veröffentlichten Daten für die biologische Variabilität bei Hunden abgeleitet (Harr et al., 2013). Andernfalls wurden die Ziele auf Grundlage allgemeiner Empfehlungen für die Performance von Immunassays (Cox et al., 2004-2012 May 1 [updated 2014 Dec 24]) oder von anderen diagnostischen Tests (Jensen und Kjelgaard-Hansen, 2010) in der Veterinärmedizin formuliert.

Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen (SD) und Intra- sowie Inter-Assay-CVs wurden mithilfe gängiger Verfahren der deskriptiven Statistik berechnet. Der Gesamt-CV (CV_{Total}) des Assays wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$CV_{\text{Total}} = \sqrt{CV_{\text{Intra-assay}}^2 + CV_{\text{Inter-assay}}^2}$$

Der Wert des erwünschten CVs („desirable analytical CV“, CV_{Des}) wurde auf 8,5% und der Wert des minimal akzeptierbaren CVs („minimally acceptable analytical CV“, CV_{Min}) auf 12,75% festgesetzt (Harr et al., 2013). Die Ergebnisse der Verdünnungs- als auch der Spike-Studie wurden als ausreichend interpretiert, wenn die errechneten Wiederherstellungsraten Werte von 80% bis

120% umfassten (Cox et al., 2004-2012 May 1 [updated 2014 Dec 24]; Jensen und Kjelgaard-Hansen, 2010). Das DL wurde aus der Summe des Mittelwertes der Nullstandards plus 3 SDs bestimmt (Jensen und Kjelgaard-Hansen, 2010). Die Wiederholbarkeit nach Bland und Altman (Bland und Altman, 1986; Bland und Altman, 1999) des ELISAs und des spektrophotometrischen Assays wurde als akzeptabel bewertet, wenn sich der Mittelwert der Differenzen der Doppelmessungen nicht signifikant von Null unterschied und wenn 95% der Differenzen innerhalb eines Bereichs vom Mittelwert der Differenzen $\pm 1,96 \times \text{SD}$ des Mittelwerts der Differenzen lagen.

Der Methodenvergleich wurde in 3 Schritten durchgeführt: (1) Berechnung des Spearman Rangkorrelationskoeffizientens (r_s) für eine erste Beurteilung des Zusammenhangs, (2) Passing-Bablok-Regression (Passing und Bablok, 1983) und (3) Bland-Altman-Diagramm (Bland und Altman, 1986; Bland und Altman, 1999). Die Interpretation der r_s -Werte kann der folgenden Tabelle (Tab. 1) entnommen werden. In der Passing-Bablok-Regression wurden die Regressionsgleichung und die 95%igen Konfidenzintervalle (95% CI) der Steigung und des Achsenabschnitts für den Nachweis eines proportionalen und konstanten Fehlers herangezogen. Ein CUSUM-Test wurde durchgeführt zur Überprüfung einer möglichen signifikanten Abweichung von der Linearität. Das Bland-Altman-Diagramm schloss den Mittelwert der Differenzen zwischen beiden Assays, die Übereinstimmungsgrenzen (Mittelwert der Differenzen $\pm 1,96 \times \text{SD}$) und den erwünschten Gesamtfehler („desirable total error“, TE_{Des}) ein. Im Falle eines proportionalen Fehlers wurde das klassische Bland-Altman-Diagramm durch Verwendung von relativen prozentualen Differenzen auf der y-Achse modifiziert.

Der systematische Fehler, d.h. der Bias, zwischen beiden Methoden wurde als mittlere Differenz nach folgender Formel errechnet (Harr et al., 2013; Flatland et al., 2014):

$$\text{Bias (\%)} = \frac{\text{Mittelwert}_{\text{ELISA}} - \text{Mittelwert}_{\text{spektr.Assay}}}{\text{Mittelwert}_{\text{spektr.Assay}}} \times 100 .$$

Der erwünschte Bias („desirable bias“, Bias_{Des}) wurde auf 6,6%, der minimal akzeptierbare Bias („minimally acceptable bias“, Bias_{Min}) auf 9,9% festgelegt. Für den TE_{Des} wurde ein Wert von 20,63%, für den minimal akzeptierbaren Gesamtfehler („minimally acceptable total error“, TE_{Min}) ein Wert von 30,94% definiert (Harr et al., 2013). Eine klinisch akzeptierbare Übereinstimmung beider Methoden wurde angenommen, wenn der errechnete Bias den Wert von Bias_{Des} oder von Bias_{Min} nicht überschritt und wenn beide Übereinstimmungsgrenzen innerhalb des Limits von TE_{Des} oder von TE_{Min} im Bland-Altman-Diagramm lagen.

Die Overlap Performance wurde durch den Konzentrationsvergleich von Hp zwischen den Gruppen mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests beurteilt und graphisch dargestellt. Bei einem statistisch signifikanten Konzentrationsunterschied wurde der Post-Hoc-Test nach Dunn-Bonferroni für paarweise Vergleiche durchgeführt. Der ELISA wurde als valide für die Beurteilung der APR

interpretiert, wenn die Katzen mit systemischer Entzündung statistisch signifikant unterscheidbar von den gesunden Katzen und den erkrankten Katzen ohne systemische Entzündung waren (Jensen und Kjelgaard-Hansen, 2010; Flatland et al., 2014).

Hp-Konzentrationen unterhalb des DL im ELISA wurden auf 0,1 mg/ml gesetzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Die statistische Analyse wurde mithilfe von Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA), IBM SPSS Statistics 20 (IBM, Armonk, USA) und MedCalc Statistical Software Version 15.2.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgien) durchgeführt.

Tab. 1: Bewertung des Korrelationskoeffizientens r_s .

$ r_s $	Interpretation
$ r_s = 0$	keine Korrelation
$0 < r_s \leq 0,2$	sehr schwache Korrelation
$0,2 < r_s \leq 0,5$	schwache Korrelation
$0,5 < r_s \leq 0,7$	mittlere Korrelation
$0,7 < r_s \leq 0,9$	starke Korrelation
$0,9 < r_s \leq 1$	sehr starke Korrelation
$ r_s = 1$	perfekte Korrelation

4.3 Klinische Studie

4.3.1 Katzen

4.3.1.1 Gesunde Katzen

Zur Etablierung von Referenzintervallen und als Kontrollgruppe wurden 27 gesunde Katzen sorgfältig ausgewählt. Sie wurden für Blutspenden, Gesundheitschecks oder Kastrationen vorgestellt. Als Einschlusskriterien galten ein Alter von mindestens 6 Monaten und ein regelmäßiger Impf- und Entwurmungsstatus bei Freigänger-Katzen. Zudem mussten die Katzen anamnestisch gesund sein und eine unauffällige klinische Allgemeinuntersuchung sowie hämatologische Untersuchung aufweisen. Ausgeschlossen wurden Katzen mit Anzeichen einer akuten Erkrankung innerhalb der letzten 2 Wochen sowie mit einer chronischen Erkrankung.

4.3.1.2 Obstruktive FLUTD

Insgesamt 16 an obstruktiver FLUTD erkrankte Katzen wurden in die Studie eingeschlossen. Die Katzen mussten mindestens eines der folgenden klinischen Symptome aufweisen: Pollakisurie, Strangurie, Dysurie, Hämaturie, Periurie oder Anurie. In der klinischen Allgemeinuntersuchung musste eine vergrößerte, pralle und schmerzhaft palpabel Harnblase sein. Zudem wurden nur Katzen ausgewählt, von denen Serum vom Tag der Erstvorstellung und von mindestens einer folgenden Blutabnahme gewonnen werden konnte. Tiere wurden von der Studie ausgeschlossen, wenn nicht genügend Serum vorhanden war.

Neben einer allgemeinen klinischen Untersuchung sowie einer Analyse des Blutbildes und der Blutchemie erhielten alle Katzen eine röntgenologische sowie eine sonographische Untersuchung des Urogenitaltraktes. Urin wurde durch Katheterisierung gewonnen und wie folgt untersucht: spezifisches Gewicht mittels Refraktometer (Handrefraktometer HRM18, A. KRÜSS Optronic GmbH, Hamburg), Analyse mittels Harnstick (Combur9-Test, Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim), mikroskopische Untersuchung des Harnsediments und mikrobiologische Untersuchung (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, Berlin).

Bei Diagnosestellung wurde die urethrale Obstruktion durch einen Harnkatheter gelöst und alle Katzen erhielten Infusions- sowie Schmerztherapie und gegebenenfalls ein Antibiotikum. Sie wurden über mindestens 2 Tage stationär betreut. Anhand des klinischen Verlaufs nach der anfänglichen Behandlung wurden die Katzen in die 2 Gruppen FLUTD_{unkompliziert} und FLUTD_{kompliziert} unterteilt (Tab. 2).

Tab. 2: Einteilung der an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen (n = 16) nach klinischem Verlauf.
(FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease; n, Anzahl der Katzen)

Gruppe	Diagnose	Einschlusskriterium	Ausschlusskriterium
FLUTD _{unkompliziert}	Urethrale Obstruktion mit unkompliziertem klinischen Verlauf	Rasche klinische Besserung unter Therapie	Diagnose einer weiteren primären und/oder sekundären Erkrankung
FLUTD _{kompliziert}	Urethrale Obstruktion mit kompliziertem klinischen Verlauf	Diagnose einer weiteren primären und/oder sekundären Erkrankung	

4.3.1.3 Feliner Diabetes mellitus

In die Studie wurden 10 an DM erkrankte Katzen eingeschlossen. Die Diagnose eines DM wurde gestellt bei typischen Symptomen (Polyurie, Polydipsie, Polyphagie) und Hyperglykämie mit Glukosurie bei einer erhöhten Fruktosamin-Konzentration. Eine DK wurde diagnostiziert bei einem DM mit Ketonämie. Die Diagnose einer DKA wurde bei einer zusätzlich nachgewiesenen metabolischen Azidose gestellt. Hyperglykämie wurde definiert als eine Glukose-Konzentration im Kapillar- oder venösen Blut von $> 13,9$ mmol/l (Konelab 60i, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte; GemPremier3000, Instrumentation Laboratory, Kirchheim; Bayer Ascensia Contour, Bayer AG, Leverkusen; AlphaTRAK, Abbott Animal Health, Illinois, USA). Fruktosamin-Werte von > 340 μ mol/l waren erhöht (Laboklin GmbH Co KG, Bad Kissingen). β -HB-Konzentrationen wurden mit einem validierten portablen Messgerät bestimmt (Precision Xceed, Abbott GmbH, Wiesbaden; Weingart et al., 2012b). Eine Azidose wurde nachgewiesen bei einem venösen pH-Wert von $< 7,35$ (GemPremier3000, Instrumentation Laboratory, Kirchheim).

Alle Katzen erhielten eine klinische Allgemeinuntersuchung, eine hämatologische und blutchemische Analyse sowie eine röntgenologische und sonographische Untersuchung des Abdomens. Mögliche weiterführende Untersuchung, die je nach Fall eingeleitet wurden, umfassten hauptsächlich eine mikrobiologische Harnuntersuchung und die Bestimmung der feline Pankreas-Lipase-Immunreaktivität (Spec fPL Test, IDEXX Vet Med Labor GmbH, Ludwigsburg). Anhand der Untersuchungsergebnisse der β -HB- und der venösen Blutgasmessung wurden die Patienten in 2 Gruppen unterteilt (Tab. 3). Zu Zwecken der Datenanalyse wurden Katzen mit einem nicht-ketotischen DM und Katzen mit einer DK, welche ein gutes Allgemeinbefinden und eine β -HB-Konzentration von $< 2,4$ mmol/l aufwiesen, in eine Gruppe (DM_{unkompliziert}) zusammengefasst. Die Katzen der Gruppe DM_{unkompliziert} wurden ambulant betreut und wurden für Glukose-Tagesprofile und Kontrolluntersuchungen vorstellig, wohingegen die Katzen der Gruppe DM_{kompliziert} stationär intensiv betreut werden mussten. Sie wurden mit Infusionstherapie stabilisiert, erhielten zunächst kurzwirksames Insulin und gegebenenfalls weitere Medikation wie Analgetika und Antiemetika.

Es wurden nur erkrankte Katzen in die Studie aufgenommen, von denen Seren von mindestens 2 unterschiedlichen Tagen vorhanden waren. Bei den Katzen der Gruppe DM_{kompliziert} musste eine Serumprobe am Tag der Erstvorstellung gewonnen worden sein. Katzen, von denen nicht genügend Serum vorhanden war, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Tab. 3: Einteilung der an einem Diabetes mellitus (DM) erkrankten Katzen (n = 10) nach Untersuchungsergebnissen.

(β -HB, β -Hydroxybutyrat; DK; Diabetische Ketose; DKA; Diabetische Ketoazidose; n, Anzahl der Katzen)

Gruppe	Diagnose	Einschlusskriterium	Ausschlusskriterium
DM _{unkompliziert}	Unkomplizierter DM	Diagnose eines nicht-ketotischen DM oder Diagnose einer DK (β -HB > 0) mit gutem Allgemeinbefinden und β -HB < 2,4 mmol/l	Diagnose einer DKA oder Diagnose einer DK (β -HB > 0) mit schlechtem Allgemeinbefinden und/oder β -HB \geq 2,4 mmol/l
DM _{kompliziert}	Komplizierter DM	Diagnose einer DKA oder Diagnose einer DK mit schlechtem Allgemeinbefinden und/oder β -HB \geq 2,4 mmol/l	

4.3.2 Zeitpunkte der Probenentnahmen

Zur Untersuchung der Bedeutung der APPs hinsichtlich der Diagnostik von FLUTD und DM wurden Seren vom Tag 0 gewonnen (Abb. 3). Tag 0 beschreibt bei den akut erkrankten Patienten (FLUTD_{unkompliziert}, FLUTD_{kompliziert}, DM_{kompliziert}) den Tag der Erstvorstellung im Behandlungsfall. Bei den chronisch erkrankten Katzen der Gruppe DM_{unkompliziert} stellt der Tag 0 den Tag dar, an dem im Untersuchungszeitraum die erste Serumprobe gewonnen werden konnte. Bei diesen Katzen wurde die Diagnose DM vor Tag 0 gestellt und sie standen bereits unter Insulin-Therapie.

Zur Erforschung der Bedeutung bezüglich Monitoring bei an FLUTD und an DM erkrankten Katzen wurden APP-Konzentrationen von mindestens 2 verschiedenen Tagen gemessen (Abb. 3). Die Blutentnahmen erfolgten nach Ermessen des behandelten Tierarztes. Daher sind die Zeitpunkte der Probengewinnung bis auf Tag 0 für jede Katze verschieden (z.B. Tag 1 = 1 Tag nach Erstvorstellung, ..., Tag n = n Tage nach Erstvorstellung). Der zeitliche Abstand zwischen 2 Abnahmen durfte bei akuten Erkrankungen (FLUTD_{unkompliziert}, FLUTD_{kompliziert}, DM_{kompliziert}) maximal 14 Tage betragen. Bei chronischen Erkrankungen (DM_{unkompliziert}, DM_{kompliziert} nach erfolgreicher Behandlung der DK oder DKA) durften mehrwöchige Abstände zwischen Kontrolluntersuchungen vorliegen.

Die APP-Konzentrationen der gesunden Katzen wurden als Einzelmessungen erhoben.

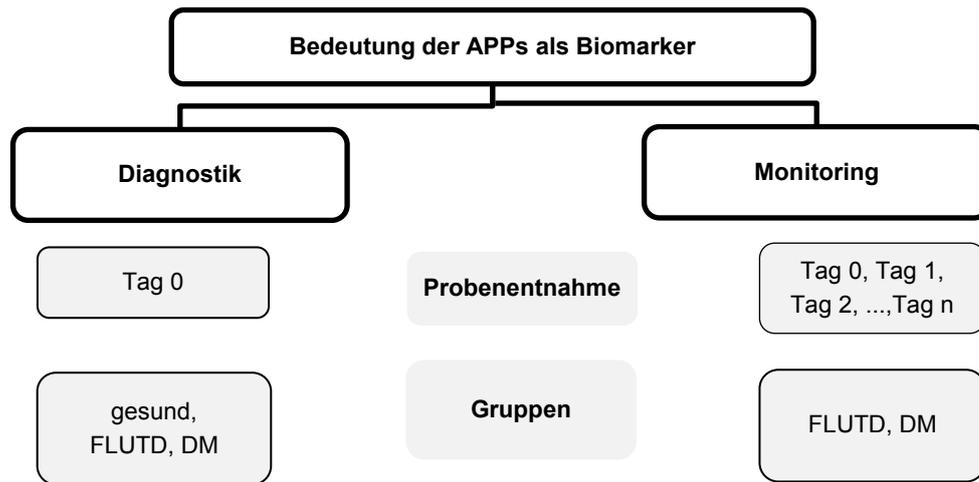


Abb. 3: Design der klinischen Studie. Zur Untersuchung der Bedeutung der Akute-Phase-Proteine hinsichtlich Diagnostik von FLUTD und DM wurden Seren am Tag 0 entnommen. Die Konzentrationen wurden mit Konzentrationen aus Einzelmessungen von 27 gesunden Katzen verglichen. Zur Untersuchung der Bedeutung hinsichtlich Monitoring von FLUTD und DM wurden Verlaufsmessungen von mindestens 2 verschiedenen Tagen (Tag 0, Tag 1, ..., Tag n) durchgeführt.

(APP, Akute-Phase-Proteine; DM, Diabetes mellitus; FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease)

4.3.3 Dokumentierte Parameter

Für die gesunden und erkrankten Katzen wurden Signalement (Alter, Geschlecht, Rasse) und die für die Einschlusskriterien notwendigen Parameter erfasst. Für die erkrankten Katzen wurden zusätzlich folgende Parameter erhoben:

- *Diagnostizierte Vorerkrankungen*

Es wurde dokumentiert, ob zum Zeitpunkt der Erstvorstellung bereits akute oder chronische Vorerkrankungen diagnostiziert waren. Akute Erkrankungen schlossen Krankheiten der letzten 14 Tage ein.

- *Weitere Primär- und/oder Sekundärerkrankungen*

Weiterhin wurde erfasst, ob nach Erstvorstellung weitere Erkrankungen im Untersuchungszeitraum diagnostiziert wurden. Diese konnten unabhängig von der bereits festgestellten Erkrankung sein (weitere primäre Erkrankung) oder als Komplikation auftreten (sekundäre Erkrankung).

- *Dauer des stationären Aufenthaltes*

- *Anzahl der gemessenen Proben*

- *Zeitpunkte der Probenentnahme*

4.3.4 Assays

4.3.4.1 AGP

Die AGP-Konzentration wurde mit einem zurzeit nicht mehr kommerziell erhältlichen radialen Immundiffusionstest („PHASE“ Feline α 1 Acid Glycoprotein SRID, Tridelta Development Limited, Maynooth, Irland) gemessen. Das Messprinzip, welches auf der Formation eines Präzipitationsringes beruht, wurde bereits im Kapitel 2.1.4 beschrieben. Da bisher noch keine vom Hersteller unabhängigen Daten zur Präzision des Tests veröffentlicht wurden, wurden zunächst Intra- und Inter-Assay-CVs für 2 Proben bestimmt. Für die Bestimmung des Intra-Assay-CVs wurden 3 Messungen derselben Probe auf einer Platte, für die des Inter-Assay-CVs wurde je 1 Messung auf 4 verschiedenen Platten durchgeführt. Für die erste Probe mit einer mittleren AGP-Konzentration von 251 μ g/ml wurden ein Intra-Assay-CV von 12,4% und ein Inter-Assay-CV von 16,2% ermittelt. Für die 2. Probe mit einer mittleren AGP-Konzentration von 811 μ g/ml wurden ein Intra-Assay-CV von 13,8% und ein Inter-Assay-CV von 8,5% nachgewiesen. Der hohe Wert des Intra-Assay-CVs der ersten Probe kann durch die Ableseung der Werte auf einer semi-logarithmischen Skala erklärt werden. Die restlichen Werte zur Präzision sind ausreichend. Da die mittlere AGP-Konzentration der ersten Probe innerhalb der Wertebereiche liegt, welche in anderen Studien bei gesunden Katzen ermittelt wurden (*Anhang I*), wurde der Intra-Assay-CV der ersten Probe für die klinische Studie ebenfalls als akzeptabel bewertet.

Die 2 Standardlösungen enthielten eine AGP-Konzentration von 500 bzw. 2000 μ g/ml. Der Messbereich reichte laut Hersteller von 100 – 3000 μ g/ml. Die Durchführung der Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Je 5 μ l der Standardlösungen und der zu messenden Seren wurden in die ausgestanzte Mitten der Agar-Gel-Platte pipettiert. Anschließend wurden die Platten über 24 – 48 Stunden in einer Box bei Raumtemperatur und hoher Luftfeuchte inkubiert. Die Durchmesser der Präzipitationsringe wurden auf 0,1 mm genau mithilfe eines vom Hersteller bereitgestellten Maßstabs von 2 Personen unabhängig voneinander gemessen und die Mittelwerte bestimmt. Die Standardkurve wurde auf einer semi-logarithmischen Skala aufgetragen und die Konzentrationen der gemessenen Seren wurden in μ g/ml abgelesen.

Alle Messungen von insgesamt 100 Seren wurden in dem gleichen Labor (Labor B) von derselben Person durchgeführt. Proben mit einer AGP-Konzentration > 2000 μ g/ml wurden 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und die Konzentration unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt. AGP-Konzentrationen von < 100 μ g/ml wurden zur statistischen Auswertung auf eine Konzentration von 50 μ g/ml festgelegt.

4.3.4.2 SAA

Zur Messung der SAA-Konzentration wurde ein kommerziell erhältlicher, multispezies-spezifischer Sandwich-ELISA („PHASE“ RANGE Multispecies SAA ELISA, Tridelta Development Limited, Maynooth, Irland) verwendet. Das Messprinzip wurde bereits im Kapitel 2.1.4 erläutert. Als Chromogen wurde TMB verwendet. Die Detektionsantikörper sind mit HRP konjugiert. Die Präzision des Assays wurde unabhängig vom Hersteller in einer aktuellen Studie mit guten Ergebnissen ermittelt (Paltrinieri et al., 2015).

Die 6 Standardlösungen enthalten folgende SAA-Konzentrationen: 0; 6,25; 12,5; 25; 50 und 100 ng/ml. Die Proben wurden 1:500 verdünnt. Der Messbereich reicht laut Hersteller von 3,1 – 50 µg/ml. Standards und Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die Messungen erfolgten falls nicht anders beschrieben bei Raumtemperatur (20 – 25°C) und wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden je 50 µl der Anti-SAA/HRP-Lösung in die Wells pipettiert. Im Anschluss wurden je 50 µl der Standard- und Probenlösungen dazugegeben und über 1 Stunde bei 37°C inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg). Nach 4-maligem manuellem Waschen wurden je 100 µl TMB hinzugefügt und über 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl der Stopplösung in die Wells pipettiert und die Platte geschwenkt. Die OD wurden bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm) gemessen (Labor A: EMax Plus Microplate Absorbance Reader, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, USA; Labor B: iMark Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Der aus den Doppelmessungen berechnete Mittelwert der OD wurde ermittelt. Die Standardkurve wurde über eine 4-Parameter-logistische Regression auf einer linearen Skala erstellt (Labor A: SoftMax Pro Software, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, USA; Labor B: Microplate Manager 6, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Die SAA-Konzentrationen der Proben in µg/ml wurden durch Multiplizieren mit dem Verdünnungsfaktor berechnet.

Die insgesamt 100 gemessenen Proben wurden alle von derselben Person in 2 verschiedenen Labors durchgeführt ($n = 37$ Messungen in Labor A, $n = 64$ Messungen in Labor B). Bei einer SAA-Konzentration > 50 µg/ml wurden die Seren 1:1000 verdünnt und die Konzentration unter Berücksichtigung dieses Verdünnungsfaktors bestimmt. Bei einer SAA-Konzentration > 100 µg/ml wurde auf eine weitere Messung mit einer stärkeren Verdünnung aufgrund des benötigten Volumens bei einem begrenzten Gesamtvolumen der einzelnen Proben verzichtet. Daher wurden für die statistischen Auswertungen zur Vermeidung von falsch positiven Aussagen SAA-Konzentrationen > 100 µg/ml auf 100 µg/ml festgesetzt.

4.3.4.3 Haptoglobin

Die Hp-Konzentration wurde mit dem in der ersten Studie validierten Sandwich-ELISA (TECO Feline & Canine Haptoglobin ELISA, TECOmedical Group, Sissach, Schweiz) gemessen. Für Angaben zur Durchführung siehe Kapitel 4.2.1. Die insgesamt 100 Proben wurden alle von derselben Person in 2 verschiedenen Labors gemessen ($n = 37$ Messungen in Labor A, $n = 64$ Messungen in Labor B). Hp-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze wurden zur statistischen Auswertung auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml festgelegt.

4.3.5 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mithilfe von Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics 20 (IBM, Armonk, USA) und MedCalc Statistical Software Version 15.2.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgien). Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha \leq 0,05$ festgesetzt. Als sehr signifikant wurden p -Werte $\leq 0,01$, als hoch signifikant p -Werte $\leq 0,001$ bewertet. Alle Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Bei nicht normalverteilten Daten wurden nichtparametrische Tests angewendet. Die Daten der einzelnen Gruppen wurden zunächst deskriptiv ausgewertet. Folgende Parameter wurden hierfür ermittelt: Median, Mittelwert, SD, Minimum und Maximum. Für AGP und SAA wurden die Parameter auf 1 Dezimalstelle genau, für Hp auf 2 Dezimalstellen genau angegeben. Die Daten wurden graphisch mit Box-Whisker-Plots ausgewertet. Die Geschlechterverteilung (ohne Einbeziehung des Kastrationsstatus) zwischen den Gruppen (gesund, FLUTD_{unkompliziert}, FLUTD_{kompliziert} bzw. gesund, DM_{unkompliziert}, DM_{kompliziert}) wurde mithilfe des Chi²-Tests untersucht. Zur Überprüfung auf signifikante Altersunterschiede zwischen den Gruppen wurden Kruskal-Wallis-Tests verwendet.

Die Etablierung der Referenzintervalle für AGP, SAA und Hp erfolgte nach den Leitlinien der „American Society of Veterinary Clinical Pathology“ (ASVCP; Friedrichs et al., 2012). Die Daten wurden graphisch durch Histogramme ausgewertet. Ausreißer wurden mithilfe des Tests nach Reed (Reed et al., 1971) identifiziert. Für AGP und SAA wurde je ein 95%iges einseitiges Referenzintervall, für Hp ein 95%iges zweiseitiges Referenzintervall berechnet. Bei nicht normalverteilten Daten wurde die robuste Methode nach CLSI C28-A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008) angewendet. 90%ige CI wurden durch Bootstrapping erstellt. Etwaige Konzentrationsunterschiede zwischen weiblichen und männlichen Tieren wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests bestimmt.

Zur Untersuchung der diagnostischen Bedeutung der APPs wurden die Konzentrationen der erkrankten Katzen am Tag 0 mit den Daten der gesunden Katzen und untereinander verglichen. Bei nicht normalverteilten metrischen Daten von unabhängigen Stichproben zwischen den 3 Gruppen (gesund, FLUTD_{unkompliziert}, FLUTD_{kompliziert} bzw. gesund, DM_{unkompliziert}, DM_{kompliziert}) wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Bei einem signifikanten Unterschied wurden paarweise

Vergleiche mit dem Post-Hoc-Test nach Dunn-Bonferroni durchgeführt und anhand der angepassten Signifikanz bewertet.

Zur Evaluierung der diagnostischen Güte von AGP, SAA und Hp zur Detektion von Katzen der jeweils komplizierten Gruppe wurden Sensitivität (SE) und Spezifität (SP) berechnet. Da SE und SP abhängig von der Gruppengröße sind, wurde zusätzlich je ein 95%iger CI angegeben. Die richtig positiven bzw. negativen und die falsch positiven bzw. negativen Fälle wurden wie folgt definiert:

Richtig positiv (RP) = Erkrankte Katze der komplizierten Gruppe mit einer jeweiligen APP-Konzentration oberhalb der oberen Referenzlimits

Richtig negativ (RN) = Erkrankte Katze der unkomplizierten Gruppe mit einer jeweiligen APP-Konzentration im Referenzintervall

Falsch positiv (FP) = Erkrankte Katze der unkomplizierten Gruppe mit einer jeweiligen APP-Konzentration oberhalb des oberen Referenzlimits

Falsch negativ (FN) = Erkrankte Katze der komplizierten Gruppe mit einer jeweiligen APP-Konzentration im Referenzintervall

SE und SP wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$SE = \frac{RP}{RP+FN} ; SP = \frac{RN}{RN+FP} .$$

Weiterhin wurden die Korrelationen der APPs bei den erkrankten Katzen am Tag der Erstvorstellung berechnet und durch Streudiagramme dargestellt. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Spearman Rangkorrelationskoeffizient r_s ermittelt. Die Interpretation der r_s -Werte kann der Tabelle (Tab. 1) entnommen werden. SAA-Konzentrationen $> 100 \mu\text{g/ml}$, welche für die statistischen Auswertungen auf $100 \mu\text{g/ml}$ gesetzt wurden, wurden für die Korrelationsberechnung ausgeschlossen, um falsch niedrige Korrelation zu vermeiden.

Zur Untersuchung der Bedeutung bezüglich Monitoring wurden die Konzentrationsverläufe über die Zeit bei den an FLUTD und DM erkrankten Katzen zunächst graphisch ausgewertet und unter Einbeziehung der dokumentierten Parameter beschrieben. Bei den akut erkrankten Katzen (FLUTD_{unkompliziert}, FLUTD_{kompliziert}, DM_{kompliziert}) wurde weiterhin untersucht, welchen Einfluss der Tag der Probenentnahme und die Gruppe auf den APP-Konzentrationsverlauf haben. Wegen der Heterogenität der Zeitpunkte der Probenentnahmen und der verbundenen Stichproben wurden hierfür verallgemeinerte lineare Modelle angewendet, wobei die Gruppe und der Tag der Probenentnahme die unabhängigen Variablen und die Konzentrationsdifferenz zum Tag 0 die abhängige Variable darstellten. Zur Beurteilung der Modellgüte wurde das Kriterium der angepassten Quasi-Likelihood bei Unabhängigkeit (QICC) herangezogen. Die Gruppe DM_{unkompliziert} wurde von dieser Untersuchung aufgrund der großen zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Probenentnahmen ausgeschlossen.

5 ERGEBNISSE

5.1 Validierungsstudie des Haptoglobin-ELISAs

5.1.1 Analytische Validierung

Für die Intra- und Inter-Assay-CVs der 3 feline Serumproben, die im ELISA gemessen wurden, wurden Werte von 2,5% bis 4,7% bzw. 7,1% bis 11,6% nachgewiesen. Die jeweiligen CV_{Total} (7,5%, 11,1% und 12,2%) waren niedriger als der CV_{Min} von 12,75%. Jedoch war bei 2 Seren der ermittelte CV_{Total} höher als CV_{Des} von 8,5% (Tab. 4). Die Ergebnisse der Verdünnungsstudie lagen in einem Bereich von 108,1% bis 118,4% mit einem Mittelwert von 112,9% (Tab. 5). Die Resultate der Spike-Studie erreichten Werte von 90,8% bis 94,0% mit einem Mittelwert von 91,8% (Tab. 6). Alle Wiederherstellungsraten lagen in dem zuvor festgelegten Zielbereich von 80% bis 120%. Für das DL wurde ein Wert von 0,19 mg/ml ermittelt.

Die Wiederholbarkeit-Tests nach Bland und Altman ergaben akzeptable Ergebnisse für die Messungen im ELISA (Abb. 4). Im spektrophotometrischen Assay lagen 4 Proben, d.h. mehr als 5% der 39 Messungen, außerhalb der Grenzen des Mittelwertes der Differenz $\pm 1,96 \times SD$ des Mittelwertes der Differenz. Die 4 Ausreißer gehörten zu insgesamt 14 Proben mit einer Hp-Konzentration von $> 2,5$ mg/ml, welche zur Messung im spektrophotometrischen Assay manuell 1:5 verdünnt wurden. Die Konzentrationen der verdünnten Seren und damit auch die Differenzen zwischen den 2 Messungen einer Probe wurden rückgerechnet durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (d.h. mit 5). Durch Darstellung der Messungen ohne Rückrechnung der verdünnten Seren wurden die Kriterien für eine akzeptable Wiederholbarkeit im spektrophotometrischen Assay erfüllt (Anhang III).

Tab. 4: Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten und gesamter Variationskoeffizient (CV_{Total}) für Haptoglobin-Konzentrationen von 3 feline Serumproben gemessen im ELISA.

(CV, Variationskoeffizient; Hp, Haptoglobin; n, Anzahl der Wiederholungsmessungen; SD, Standardabweichung)

Mittelwert der Hp-Konzentration (mg/ml)	Intra-Assay			Inter-Assay*			CV _{Total} (%)**
	n	SD (mg/ml)	CV (%)	n	SD (mg/ml)	CV (%)	
1,80	20	0,07	3,8	8	0,22	11,6	12,2
3,25	10	0,08	2,5	8	0,23	7,1	7,5
3,28	10	0,16	4,7	8	0,31	10,0	11,1

* Zur Bestimmung des Inter-Assay-CVs wurden 3 feline Serumproben in Duplikaten in 4 verschiedenen Messdurchgängen an 4 verschiedenen Tagen gemessen.

** CV_{Total} wurde als Summe des Intra- und des Inter-Assay-CVs bestimmt (für Formel siehe 4.2.5).

Tab. 5: Wiederherstellungsrate von Haptoglobin nach serieller Verdünnung von 4 feline Serumproben, welche im ELISA gemessen wurden.
(Hp, Haptoglobin)

	Verdünnung*	Hp (mg/ml)	Wiederherstellungsrate (%)**
Probe 1	1:1	5,52	100
	1:2	3,17	114,9
	1:4	1,61	116,7
Probe 2	1:1	6,11	100
	1:2	3,37	110,3
	1:4	1,74	113,9
Probe 3	1:1	6,52	100
	1:2	3,65	112,0
	1:4	1,93	118,4
Probe 4	1:1	6,68	100
	1:2	3,61	108,1
	1:4	1,82	109,0

* Da die Proben im ELISA vorverdünnt werden müssen, wurde die 1:5000 Verdünnung zur Bestimmung der initialen Konzentration verwendet. Die Verdünnungsstufen 1:10000 und 1:20000 entsprachen daher dem 1:2 bzw. dem 1:4 Verdünnungsverhältnis.

$$** \text{ Wiederherstellungsrate (\%)} = \left(\frac{\text{gemessene Hp Konzentration (mg/ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{initiale Hp Konzentration (mg/ml)}} \right) \times 100$$

Tab. 6: Wiederfindungsrate von Haptoglobin nach Aufstockung von 4 feline Serumproben mit einer Spike-Lösung, welche im ELISA gemessen wurden.
(Hp, Haptoglobin)

	Hp (mg/ml)		Wiederfindungsrate (%)**
	reine Probe	aufgestockte Probe*	
Probe 1	3,14	6,37	90,9
Probe 2	3,37	6,55	90,8
Probe 3	3,61	6,83	91,6
Probe 4	3,65	7,04	94,0

* Hp aufgestockte Probe (mg/ml) = Hp reine Probe (mg/ml) + Spike Lösung (3,84 mg/ml)

$$** \text{ Wiederfindungsrate (\%)} = \left(\frac{\text{Hp aufgestockte Probe (mg/ml)}}{\text{Hp reine Probe (mg/ml)} + \text{Spike Lösung (3,84 mg/ml)}} \right) \times 100$$

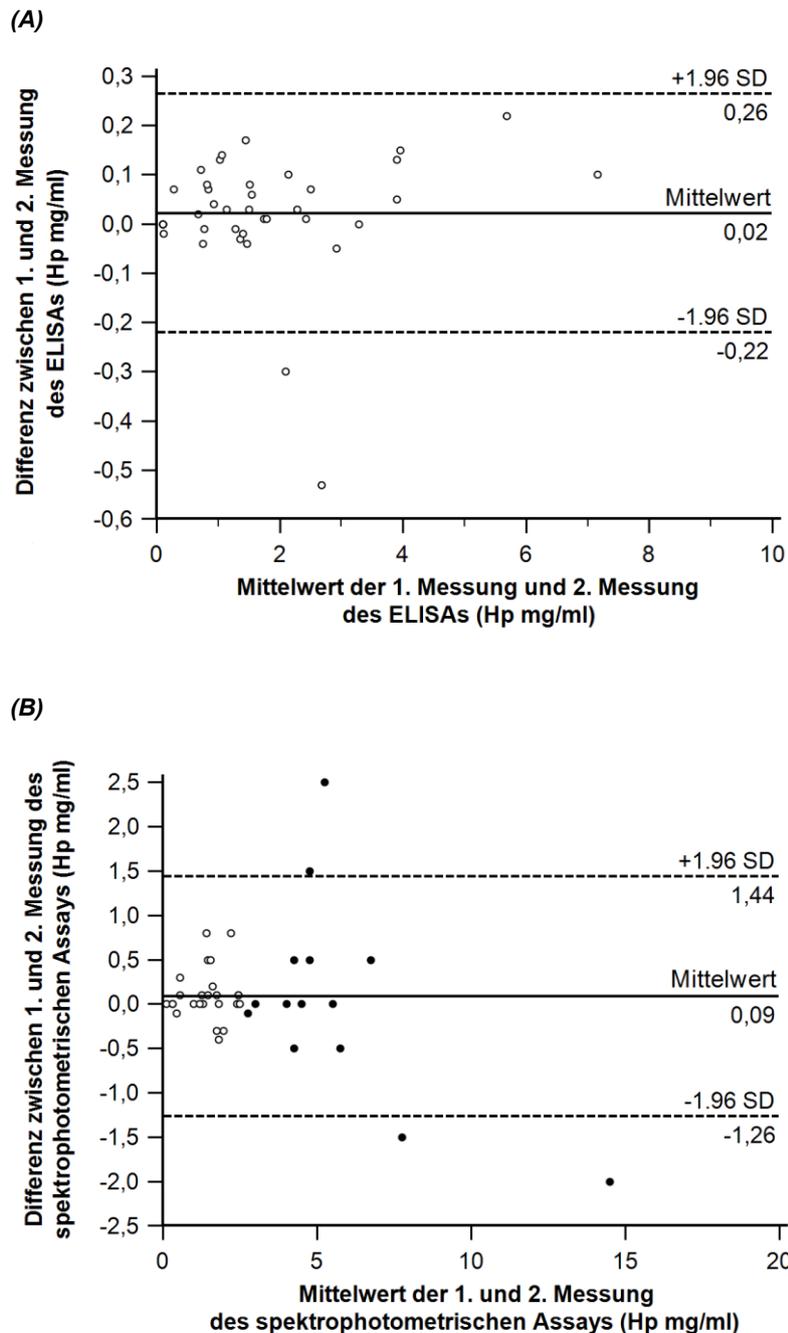


Abb. 4: Wiederholbarkeit nach Bland und Altman für 39 feline Serumproben gemessen als Duplikate im ELISA (A) und im spektrophotometrischen Assay (B). Die durchgehende schwarze Linie stellt den Mittelwert der Differenzen zwischen den Doppelmessungen derselben Probe, die 2 gestrichelten Linien stellen den Mittelwert der Differenzen $\pm 1,96 \times$ Standardabweichung (SD) des Mittelwertes der Differenz dar.

(A) Der Mittelwert der Differenzen zwischen den Doppelmessungen im ELISA war 0,02 mg/ml mit einem 95% Konfidenzintervall (95% CI) von -0,02 – 0,06 mg/ml. SD war 0,12 mg/ml, die obere bzw. untere Grenze betrug 0,26 mg/ml resp. -0,22 mg/ml (95% CI 0,20 – 0,33 mg/ml bzw. -0,29 bis -0,15 mg/ml). Zwei Proben (d.h. 5% von 39 Serumproben) lagen außerhalb der unteren Grenze. Der ELISA wies eine akzeptable Wiederholbarkeit auf.

(B) Der Mittelwert der Differenzen zwischen den Doppelmessungen im spektrophotometrischen Assay war 0,09 mg/ml mit einem 95% CI von -0,13 – 0,31 mg/ml. SD war 0,69 mg/ml, die obere bzw. untere Grenze betrug 1,44 mg/ml resp. -1,26 mg/ml (95% CI 1,06 – 1,82 mg/ml bzw. -1,65 bis -0,88 mg/ml). Die „○“-Symbole repräsentieren Proben (n = 25), die nicht verdünnt wurden, wohingegen die „●“-Symbole Proben (n = 14) repräsentieren, welche manuell 1:5 verdünnt wurden. Vier Proben lagen infolge der Rückrechnung durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor außerhalb der oberen und unteren Grenze. Akzeptable Wiederholbarkeit des spektrophotometrischen Assays wurde erreicht, wenn keine Rückrechnung durchgeführt wurde (Anhang III).

(CI, Konfidenzintervall; Hp, Haptoglobin; n, Anzahl; SD, Standardabweichung)

5.1.2 Methodenvergleich

Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient r_s des Methodenvergleichs betrug 0,95 ($p < 0,0001$). Dies spiegelt eine sehr starke Korrelation zwischen dem ELISA und dem spektrophotometrischen Assay wider. Die Passing-Bablok-Regression (Abb. 5) ergab einen proportionalen Fehler mit einer Steigung von 0,60 (95% CI 0,50 – 0,70). Ein konstanter Fehler konnte nicht nachgewiesen werden (Achsenabschnitt von 0,00 mg/ml; 95% CI -0,17 – 0,20 mg/ml). Für Proben, die für die Messung im spektrophotometrischen Assay nicht verdünnt wurden ($n = 25$), wurde ein kleiner proportionaler Fehler, jedoch wiederum kein konstanter Fehler festgestellt. Die Steigung betrug hierfür 0,74 (95% CI 0,62 – 0,88), der Achsenabschnitt war -0,14 mg/ml (95% CI -0,34 – 0,00 mg/ml). Wegen der geringen Anzahl von unverdünnten Proben im spektrophotometrischen Assay ($n = 14$) wurde keine Regressionsanalyse für diese Untergruppe durchgeführt, aber scheinbar existierte hier ebenfalls ein proportionaler Fehler zwischen beiden Methoden. Der CUSUM-Test ergab keine signifikante Abweichung von der Linearität für alle Proben und für die Untergruppe der unverdünnten Seren im spektrophotometrischen Assay ($p = 0,77$ bzw. $p = 0,82$).

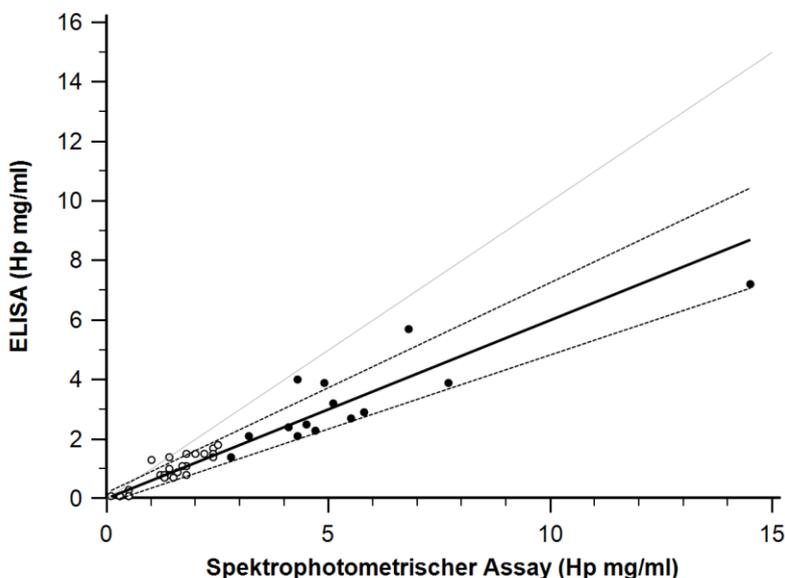


Abb. 5: Passing-Bablok-Regressionsanalyse für Haptoglobin-Konzentrationen von 39 feline Seren, welche im ELISA und im spektrophotometrischen Assay gemessen wurden. Die durchgehende schwarze Linie stellt die Regressionslinie mit folgender Gleichung dar: Haptoglobin ELISA (mg/ml) = 0,00 mg/ml + Haptoglobin spektrophotometrischer Assay (mg/ml) \times 0,60. Die 2 gestrichelten Linien markieren die Konfidenzbereiche der Regressionslinie (95% CI für Achsenabschnitt -0,17 – 0,20 mg/ml und für Steigung 0,50 – 0,70). Die dünne graue Linie repräsentiert die Gleichheitslinie ($y = x$). Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient r_s betrug 0,95 ($p < 0,0001$). Die „●“-Symbole stellen Serumproben ($n = 14$) dar, welche für die Messung im spektrophotometrischen Assay aufgrund einer Haptoglobin-Konzentration $> 2,5$ mg/ml verdünnt werden mussten. (CI, Konfidenzintervall; Hp, Haptoglobin; n, Anzahl)

Das modifizierte Bland-Altman-Diagramm (Abb. 6) ergab einen Mittelwert der Differenzen der Hp-Konzentrationen, welche in beiden Methoden bestimmt wurden, von 1,13 mg/ml oder 51,0% (95% CI 0,69 – 1,57 mg/ml oder 40,5 – 61,5%). 95% der gemessenen Proben lagen innerhalb der beiden Übereinstimmungsgrenzen (obere Grenze: 3,77 mg/ml oder 114,2%; untere Grenze: -1,51 mg/ml oder -12,2%). Dies spiegelt eine gute statistische Übereinstimmung zwischen beiden Methoden wider. Die obere Übereinstimmungsgrenze lag außerhalb des Bereichs, welcher sowohl von den Grenzen des erwünschten Gesamtfehlers ($TE_{Des} = \pm 20,63\%$) als auch von denen des minimal akzeptierbaren Fehlers ($TE_{Min} = \pm 30,94\%$) umschlossen wird. Für den Bias wurde ein Wert von -38,9% berechnet. Dessen absoluter Betrag erfüllte nicht die Performance-Ziele des erwünschten Bias ($Bias_{Des} = 6,6\%$) oder des minimal akzeptierbaren Bias ($Bias_{Min} = 9,9\%$). Dementsprechend konnte eine klinische Übereinstimmung des ELISAs mit dem spektrophotometrischen Assay nicht nachgewiesen werden. Das negative Vorzeichen des Bias verdeutlicht, dass die im ELISA gemessenen Konzentrationen niedriger waren als die im spektrophotometrischen Assay ermittelten.

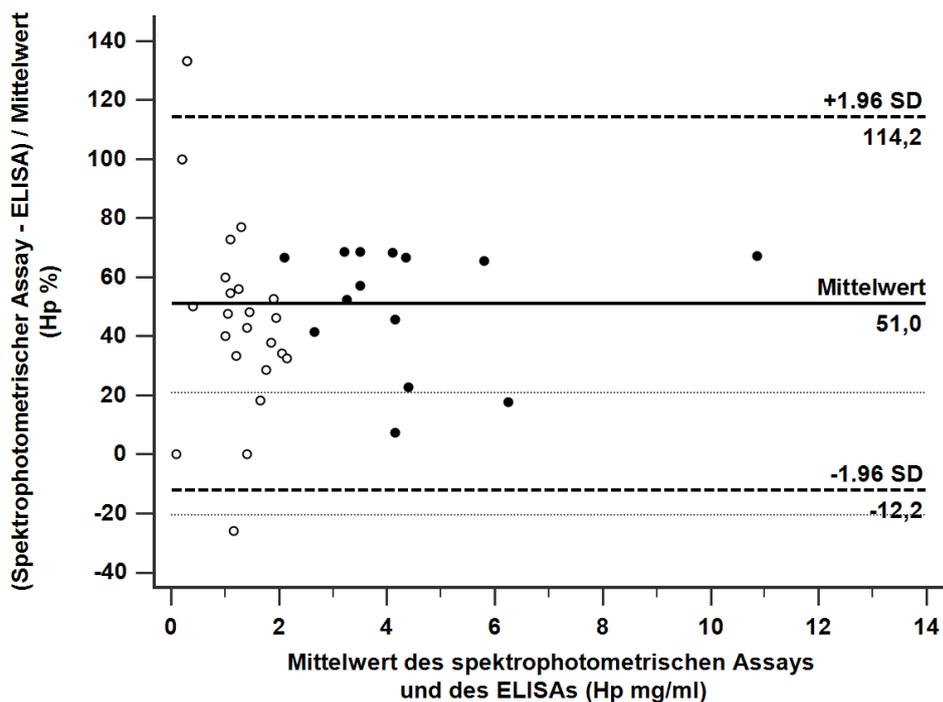


Abb. 6: Bland-Altman-Diagramm für Haptoglobin-Konzentrationen von 39 feline Seren, welche im ELISA und im spektrophotometrischen Assay gemessen wurden. Die durchgehende schwarze Linie stellt den Mittelwert der Differenzen zwischen Messungen mit beiden Methoden dar (1,13 mg/ml oder 51%, 95% CI 0,69 – 1,57 mg/ml oder 40,5 – 61,5%). Die 2 gestrichelten Linien repräsentieren die Übereinstimmungsgrenzen, d.h. den Mittelwert der Differenzen $\pm 1,96 \times$ Standardabweichung (SD) des Mittelwertes der Differenz: obere Grenze 3,77 mg/ml oder 114,2% (95% CI 3,02 – 4,53 mg/ml oder 96,2 – 132,3%), und untere Grenze -1,51 mg/ml oder -12,2% (95% CI -2,27 bis -0,76 mg/ml oder -30,3 – 5,8%). Die 2 dünnen gepunkteten Linien stellen die Limits für den erwünschten Gesamtfehler dar ($TE_{Des} = \pm 20,63\%$). Die „•“-Symbole repräsentieren Proben (n = 14), welche für die Messung im spektrophotometrischen Assay aufgrund einer Haptoglobin-Konzentration > 2,5 mg/ml verdünnt werden mussten. (CI, Konfidenzintervall; Hp, Haptoglobin; n, Anzahl; SD, Standardabweichung; TE_{Des} , Desirable Total Error)

5.1.3 Overlap Performance

Die Mediane der Hp-Konzentrationen der 3 Gruppen waren: gesunde Katzen, 0,38 mg/ml (Konzentrationsspanne: 0 – 2,57 mg/ml); erkrankte Katzen ohne systemische Entzündung, 1,10 mg/ml (0 – 2,71 mg/l); Katzen mit systemischer Entzündung, 5,67 mg/ml (3,28 – 8,03 mg/ml). Die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests ergaben einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den 3 Gruppen ($p < 0,0001$). Im Post-Hoc-Test nach Dunn-Bonferroni konnte nachgewiesen werden, dass die Hp-Konzentrationen bei den Katzen mit systemischer Entzündung signifikant höher waren als die der anderen beiden Gruppen ($p < 0,005$). Es gab keinen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den gesunden Katzen und den erkrankten Katzen ohne systemische Entzündung ($p = 0,89$).

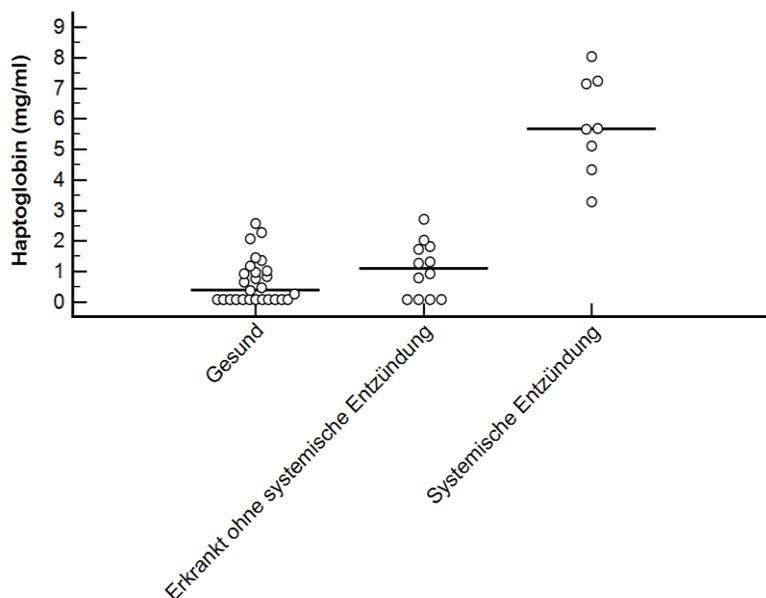


Abb. 7: Darstellung der Overlap Performance des ELISAs zur Messung der Haptoglobin-Konzentrationen aus Seren gesunder ($n = 27$) und erkrankter Katzen ohne ($n = 12$) und mit systemischer Entzündung ($n = 8$). Erkrankte Katzen ohne systemische Entzündung umfassten Katzen mit einem diagnostizierten und gut eingestellten Diabetes mellitus ($n = 3$) und Katzen mit einer unteren Harnwegserkrankung ($n = 9$). Als Katzen mit einer systemischen Entzündung wurden stationär betreute Patienten klassifiziert, welche an diabetischer Ketoazidose ($n = 5$), an Pankreatitis ($n = 2$) und an hochgradiger diabetischer Ketoazidose ($n = 1$) erkrankt waren. Die horizontalen Linien stellen die Mediane der Haptoglobin-Konzentrationen der einzelnen Gruppen dar.

5.2 Klinische Studie

5.2.1 Katzen

5.2.1.1 Gesunde Katzen

Das mediane Alter der 27 gesunden Katzen betrug 5 Jahre (Altersspanne: 6 Monate bis 12 Jahre, *Anhang IV*). Das Geschlechterverhältnis war nahezu ausgeglichen (weiblich kastriert, $n = 12$; weiblich intakt, $n = 1$; männlich kastriert, $n = 13$; männlich intakt, $n = 1$). Folgende Rassen waren vertreten: Europäisch Kurzhaar (EKH, $n = 19$), Britisch Kurzhaar (BKH, $n = 2$), Maine-Coon ($n = 2$) und Maine-Coon-Mix ($n = 2$), Perser und Ragdoll ($n = je 1$). Die Katzen wurden zur Blutspende ($n = 23$), zum Gesundheitscheck ($n = 2$), zur Impfung sowie zur Kastration vorgestellt (je $n = 1$).

5.2.1.2 Obstruktive FLUTD

Die 16 an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen waren im Durchschnitt 7 Jahre alt (Altersspanne: 3 bis 11 Jahre, *Anhang IV*). Alle Patienten waren männlich kastriert. Folgende Rassen waren vertreten: EKH ($n = 8$), Perser ($n = 2$), Norwegische Waldkatze ($n = 2$), BKH, Karthäuser, Karthäuser-Mix und Maine-Coon ($n = je 1$). Es gab keinen signifikanten Altersunterschied zur Gruppe der gesunden Katzen ($p = 0,09$). Jedoch war die Geschlechterverteilung zu den gesunden Katzen signifikant verschieden (Likelihood-Quotient- $\chi^2 = 15,3$; $p < 0,0001$; *Anhang V*). Bei je 7 Katzen konnte ein Harnpfropfen bzw. ein Harnstein als Obstruktionsursache identifiziert werden. Bei 2 Katzen konnte kein intraluminal gelegenes Material nachgewiesen werden.

In die Gruppe FLUTD_{unkompliziert} wurden 7 Katzen eingeschlossen (*Anhang VI*). Diese Patienten blieben im Median 5 Tage stationär und zeigten unter der Therapie eine rasche klinische Besserung. Bei 4 der 7 Katzen wurde eine perineale Urethrostomie durchgeführt. In folgenden Kontrolluntersuchungen zeigten die Katzen ein ungestörtes Allgemeinbefinden sowie einen physiologischen Harnabsatz. Neun Katzen wurden als FLUTD_{kompliziert} klassifiziert (*Anhang VI*). Sie entwickelten unter der Therapie der obstruktiven FLUTD Komplikationen und/oder es wurden weitere primäre Erkrankungen diagnostiziert. Zwei der 9 Katzen verstarben während der stationären Betreuung. Bei den verbliebenen 7 Katzen wurde eine perineale Urethrostomie durchgeführt. Die Mehrheit der Katzen entwickelte eine mittel- bis hochgradige Anämie während der stationären Betreuung, welche nicht nur durch den operativ bedingten Blutverlust, sondern auch durch die Entzündung verursacht wurde. Sie konnten im Median nach 10 Tagen aus der Klinik entlassen werden. Fünf Katzen wurden nach Entlassung innerhalb von 3 Tagen erneut vorgestellt wegen Inappetenz und/oder Harnabsatzbeschwerden. Von diesen 5 Katzen wurden 4 stationär aufgenommen.

5.2.1.3 Feliner Diabetes mellitus

Die 10 an Diabetes mellitus erkrankten Katzen waren im Durchschnitt 11 Jahre alt (Altersspanne: 6 bis 16 Jahre, *Anhang IV*). Fünf Patienten waren männlich kastriert, 4 waren weiblich kastriert und eine Katze war weiblich intakt. Drei verschiedene Rassen waren vertreten: EKH ($n = 8$), BKH und Perser ($n = je\ 1$). Die Katzen der Gruppe $DM_{kompliziert}$ waren signifikant älter als die gesunden Katzen ($p = 0,006$). Das Geschlechterverhältnis der beiden Gruppen mit ausschließlich männlichen Tieren in Gruppe $DM_{unkompliziert}$ und 5 weiblichen Tieren in Gruppe $DM_{kompliziert}$ war im Vergleich mit den gesunden Katzen signifikant verschieden (Likelihood-Quotient- $\chi^2 = 8,5$; $p = 0,015$; *Anhang V*).

In die Gruppe $DM_{unkompliziert}$ wurden 4 Katzen eingeschlossen (*Anhang VI*). Sie wurden für Glukose-Tagesprofile oder für Kontrolluntersuchungen ambulant vorstellig. Alle 4 Patienten hatten mindestens eine weitere Vorerkrankung. Bei einer Katze wurde unter Insulin-Therapie eine Normoglykämie festgestellt. Diese Katze verstarb jedoch aufgrund einer ungeklärten akuten Erkrankung Zuhause. Bei den anderen 3 Patienten wurden trotz eines guten Allgemeinbefindens erhöhte Glukose- und Fruktosamin-Konzentrationen nachgewiesen. Bei diesen Katzen wurde in mindestens einer Kontrolle eine DK mit β -HB-Konzentrationen von $< 2,4$ mmol/l festgestellt. Zwei dieser 3 Katzen waren vor 10 – 14 Tagen an einer DKA erkrankt und bereits erfolgreich behandelt. Aus der stationären Zeit konnten jedoch keine Serumreste zur APP-Messung gesammelt werden.

Sechs Katzen wurden als $DM_{kompliziert}$ klassifiziert (*Anhang VI*). Bei 5 Katzen wurde eine DKA und bei 1 Katze eine hochgradige DK mit einer β -HB-Konzentration von 5,8 mmol/l diagnostiziert. Bei allen Katzen wurden weitere Primär- und/oder Sekundärerkrankungen nachgewiesen, wobei Anämien und Hepatopathien am häufigsten festgestellt wurden. Drei Katzen wurden auf Wunsch des Besitzers hin euthanasiert. Die verbliebenen 3 Katzen wurden im Median 8 Tage stationär betreut und wurden nach Entlassung weiterhin vorstellig für Glukose-Tagesprofile und Kontrolluntersuchungen. Katze 24 (*Anhang VII*) stellte hinsichtlich der Zeitpunkte der Probenentnahmen eine Ausnahme dar, da die Katze am Tag 0 zum Glukose-Tagesprofil vorstellig wurde und am Tag 292 eine hochgradige DK diagnostiziert wurde. Da sich die Besitzer aus finanziellen Gründen für eine Euthanasie entschieden, wurde auf weitere Diagnostik (inkl. venöser Blutgasanalyse) verzichtet. Zur Datenanalyse wurden die APP-Konzentrationen am Tag 292 für die Auswertungen der diagnostischen Bedeutung verwendet.

5.2.2 Referenzintervalle

Die Konzentrationen für AGP, SAA und Hp der gesunden Katzen waren nicht normalverteilt ($p \leq 0,03$). Es wurden keine Ausreißer im Test nach Reed identifiziert. Der obere Referenzwert des 95%igen einseitigen Referenzbereiches für AGP betrug 380,2 $\mu\text{g/ml}$ (90% CI 308,4 – 433,3 $\mu\text{g/ml}$) und für SAA 8,3 $\mu\text{g/ml}$ (90% CI 2,8 – 11,3 $\mu\text{g/ml}$). Für Hp betrug das obere Referenzlimit des 95%igen zweiseitigen Referenzbereichs 2,05 mg/ml (Tab. 7). Da bei 12 der 27 Tiere eine Hp-Konzentration unterhalb der unteren Nachweisgrenze nachgewiesen wurde, konnte kein unteres Referenzlimit berechnet werden. Aufgrund der geringen Konzentrationsspanne, der Verteilung der Konzentrationen und der geringen Anzahl an Katzen war ebenfalls kein CI für Hp durch Bootstrapping errechenbar.

Die Häufigkeitsverteilung der APP-Konzentrationen ist in Histogrammen (Abb. 8 A, B und C) dargestellt. Für alle 3 APPs ist im Histogramm eine Linksverschiebung mit einem großen linken Balken erkennbar. Die Mehrheit der Katzen hatte eine SAA-Konzentration von $< 4 \mu\text{g/ml}$. Die höheren SAA-Konzentrationen wurden jedoch nicht als Ausreißer identifiziert.

Es konnten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen weiblichen und männlichen Tieren für SAA und Hp nachgewiesen werden ($p = 0,76$ bzw. $p = 0,28$). Für AGP waren die Konzentrationen der weiblichen Tiere signifikant höher als die der männlichen ($p = 0,01$).

Tab. 7: 95%ige einseitige Referenzintervalle für AGP und SAA und oberes Referenzlimit eines 95% zweiseitigen Referenzintervalls für Hp (n = 27 Katzen). Die Referenzintervalle wurden nach der robusten Methode nach CLSI C28-A3 berechnet. Für Hp war aufgrund von Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze kein unteres Referenzlimit errechenbar.

(AGP, saures α 1-Glykoprotein; CI, Konfidenzintervall; Hp, Haptoglobin; n.e., nicht errechenbar; SAA, Serum-Amyloid-A; SD, Standardabweichung)

	AGP ($\mu\text{g/ml}$)	SAA ($\mu\text{g/ml}$)	Hp (mg/ml)
Median	170,0	1,7	0,38
Mittelwert	180,6	2,8	0,69
SD	115,9	3,7	0,74
Minimum	$< 100^*$	0,9	$< 0,19^*$
Maximum	440	16,1	2,57
Oberes Referenzlimit	380,2	8,3	2,05
90% CI**	308,4 – 433,3	2,8 – 11,3	n.e.***
Shapiro-Wilk-Test: p	0,03	$< 0,0001$	0,0001

* Zur statistischen Auswertung wurden nicht-messbar niedrige Konzentrationen für AGP auf 50 $\mu\text{g/ml}$ und für Hp auf 0,1 mg/ml gesetzt; ** 90%ige Konfidenzintervalle wurden über Bootstrapping ermittelt (100000 Iterationen); *** Für Hp ist die Berechnung des 90%igen Konfidenzintervalls aufgrund der Konzentrationsspanne, der Konzentrationsverteilung und der geringen Anzahl an Katzen nicht möglich.

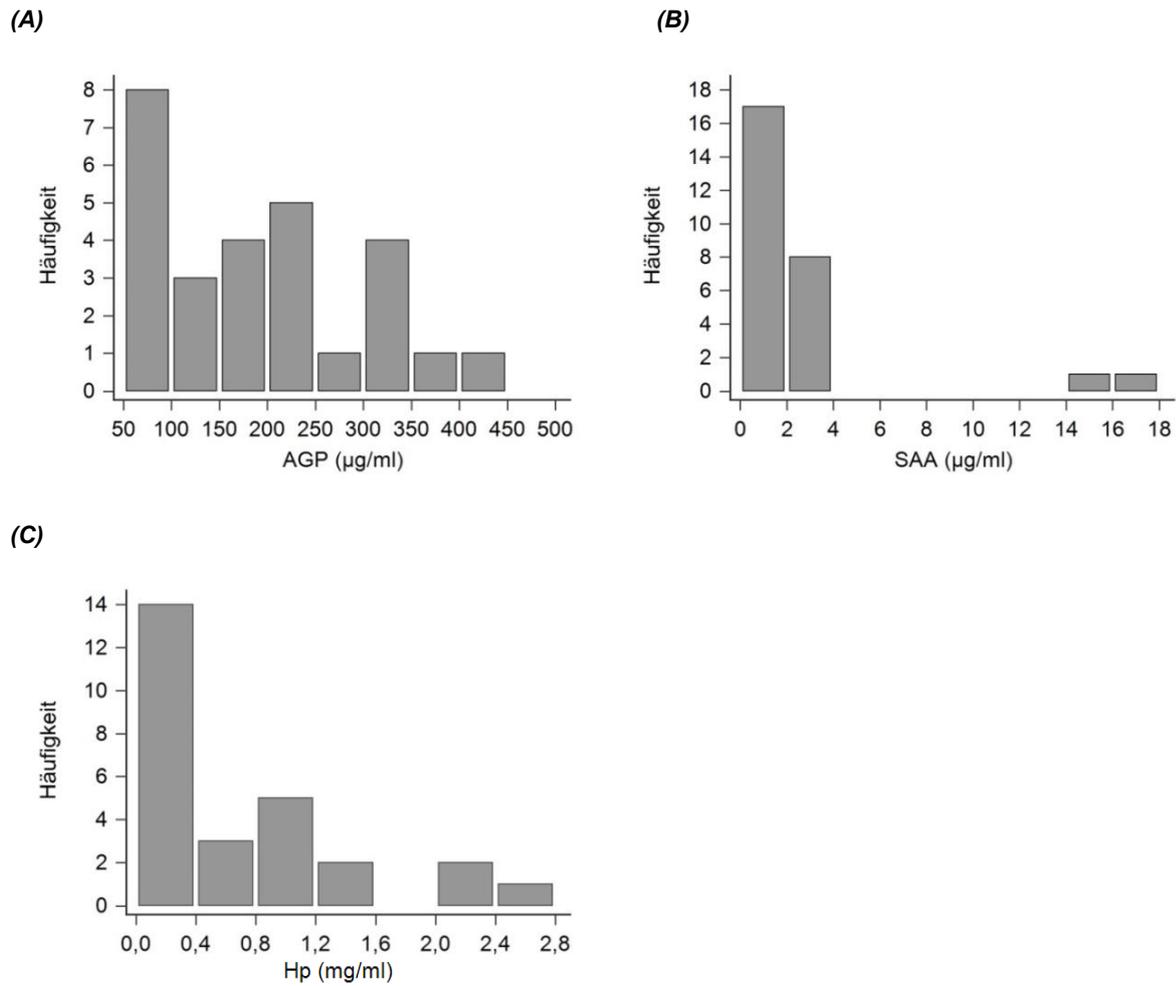


Abb. 8: Histogramme der AGP- (A), SAA- (B) und Hp-Konzentrationen (C) der gesunden Katzen (n = 27). Auf der y-Achse sind die absoluten Häufigkeiten als Anzahl der Katzen angegeben. (AGP, saures α 1-Glykoprotein; Hp, Haptoglobin; SAA, Serum-Amyloid-A)

5.2.3 Diagnostische Bedeutung

5.2.3.1 Obstruktive FLUTD

Für die Gruppe FLUTD_{unkompliziert} wurden am Tag 0 folgende Konzentrationsspannen (Tab. 8) ermittelt: AGP 170 – 1200 µg/ml (Median: 360 µg/ml); SAA 2,7 – 19,2 µg/ml (6,4 µg/ml) und Hp < 0,19 – 3,56 mg/ml (1,32 mg/ml). Für FLUTD_{kompliziert} wurden folgende Konzentrationsspannen gemessen: AGP 110 – 2180 µg/ml (Median: 630 µg/ml); SAA 2,0 – 79,2 µg/ml (5,5 µg/ml) und Hp < 0,19 – 7,24 mg/ml (3,26 mg/ml).

Die Konzentrationsunterschiede zwischen den 3 Gruppen „gesund“, „FLUTD_{unkompliziert}“ und „FLUTD_{kompliziert}“ waren sehr signifikant (AGP: $p = 0,001$; SAA: $p < 0,0001$; Hp: $p = 0,005$). Der Post-Hoc-Test nach Dunn-Bonferroni zeigte, dass sich die Konzentrationen aller 3 APPs zwischen den gesunden und den an einer komplizierten FLUTD erkrankten Katzen sehr signifikant unterschieden (AGP: $p = 0,003$; SAA: $p = 0,002$; Hp: $p = 0,009$; Abb. 9 A, B und C).

Tab. 8: Konzentrationen der Akute-Phase-Proteine AGP, SAA und Hp am Tag der Erstvorstellung bei an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen unterteilt nach ihrem klinischen Verlauf verglichen mit den Konzentrationen der gesunden Katzen.

(AGP, saures α 1-Glykoprotein; FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease; Hp, Haptoglobin; n, Anzahl der Katzen; SAA, Serum-Amyloid-A; SD, Standardabweichung)

APP	Parameter	Gesunde Katzen (n = 27)	FLUTD _{unkompliziert} (n = 7)	FLUTD _{kompliziert} (n = 9)
AGP (µg/ml)	Median	170,0	360,0	630,0
	Mittelwert	180,6	442,9	816,7
	SD	115,9	352,9	695,0
	Minimum	< 100*	170,0	110,0
	Maximum	440	1200,0	2180,0
	Shapiro-Wilk-Test: p	0,03	0,01	0,17
SAA (µg/ml)	Median	1,7	6,4	5,5
	Mittelwert	2,8	7,6	22,7
	SD	3,7	5,7	29,2
	Minimum	0,9	2,7	2,0
	Maximum	16,1	19,2	79,2
	Shapiro-Wilk-Test: p	< 0,0001	0,06	0,004
Hp (mg/ml)	Median	0,38	1,32	3,26
	Mittelwert	0,69	1,72	2,78
	SD	0,74	1,23	2,22
	Minimum	< 0,19*	< 0,19*	< 0,19*
	Maximum	2,57	3,56	7,24
	Shapiro-Wilk-Test: p	< 0,0001	0,51	0,32

* Zur statistischen Auswertung wurden nicht-messbar niedrige Konzentrationen für AGP auf 50 µg/ml und für Hp auf 0,1 mg/ml gesetzt.

Für AGP und SAA waren die Konzentrationsunterschiede zwischen den gesunden und den an einer unkomplizierten FLUTD erkrankten Katzen ebenfalls signifikant (AGP: $p = 0,046$; SAA: $p = 0,004$). Für Hp war der Konzentrationsunterschied zwischen diesen beiden Gruppen nicht signifikant ($p = 0,14$). Es gab keinen signifikanten Konzentrationsunterschied der APPs zwischen den an einer unkomplizierten und an einer komplizierten FLUTD erkrankten Katzen (für AGP, SAA und Hp: $p = 1,0$).

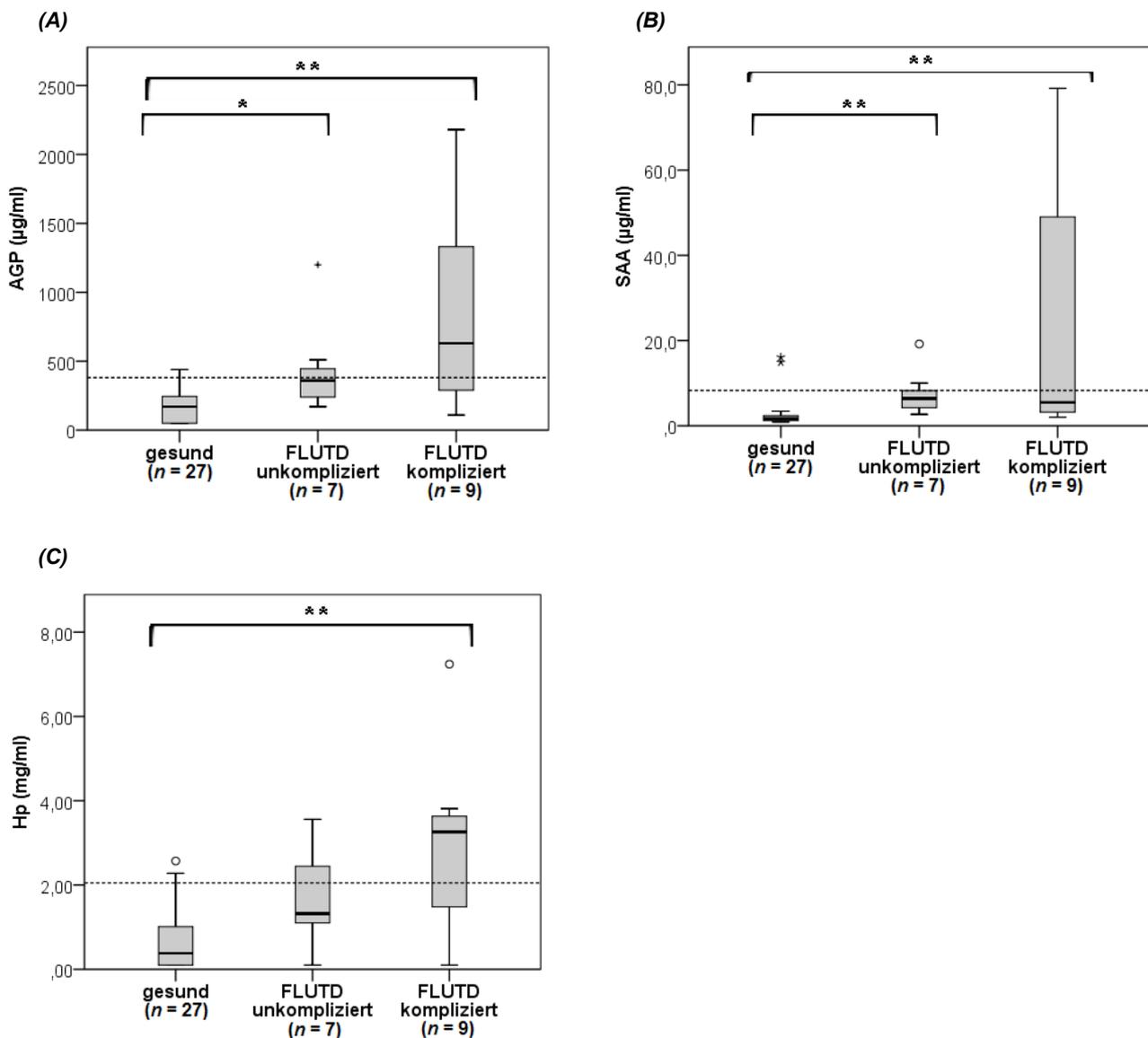


Abb. 9: Box-Whisker-Plots für AGP (A), SAA (B) und Hp (C) am Tag der Erstvorstellung bei gesunden Katzen ($n = 27$) und an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen unterteilt nach ihrem klinischen Verlauf (FLUTD_{unkompliziert}, $n = 7$; FLUTD_{kompliziert}, $n = 9$). Die oberen und unteren Begrenzungen der Boxen entsprechen dem Interquartilsabstand (IQR), die horizontale Linie stellt den Median dar. Das Ende der oberen bzw. der unteren Antenne beschreibt die höchste bzw. niedrigste Konzentration, die innerhalb des 1,5-Fachen des IQR liegt. Ausreißer sind mit einem „O“-Symbol dargestellt und bezeichnen Werte, die zwischen dem 1,5-Fachen und dem 3-Fachen des IQR liegen. Extreme Werte sind mit einem „+“-Symbol dargestellt. Sie beschreiben Werte, die oberhalb des 3-Fachen des IQR liegen. Die gestrichelte Linie stellt das obere Referenzlimit des jeweiligen Akute-Phase-Proteins dar (siehe Tab. 7). Signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen sind mit „*“ oberhalb der Klammern gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,001$). Zur statistischen Auswertung wurden nicht-messbar niedrige Konzentrationen für AGP auf 50 µg/ml und für Hp auf 0,1 mg/ml gesetzt. (AGP, saures α 1-Glykoprotein; FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease; Hp, Haptoglobin; n, Anzahl der Katzen; SAA, Serum-Amyloid-A)**

5.2.3.2 Feliner Diabetes mellitus

Bei den an einem unkomplizierten DM erkrankten Katzen wurden folgende Konzentrationsspannen am Tag 0 bestimmt (Tab. 9): AGP < 100 – 2570 µg/ml (Median: 1095 µg/ml), SAA 1,2 – 13,4 µg/ml (3,4 µg/ml) und Hp 1,51 – 4,57 mg/ml (3,24 mg/ml). Für die an einem komplizierten DM erkrankten Katzen wurden am Tag 0 folgende APP-Konzentrationsspannen gemessen: AGP 260 – 2720 µg/ml (Median: 1450 µg/ml), SAA 37,8 bis > 100,0 µg/ml (100,0 µg/ml) und Hp 3,28 – 8,03 mg/ml (5,40 mg/ml).

Die Konzentrationsunterschiede zwischen den 3 Gruppen „gesund“, „DM_{unkompliziert}“ und „DM_{kompliziert}“ waren hoch signifikant (AGP: $p = 0,001$; SAA: $p = 0,001$; Hp: $p < 0,0001$). Der Post-Hoc-Test nach Dunn-Bonferroni zeigte, dass sich die Konzentrationen der 3 APPs zwischen den gesunden und den an einem komplizierten DM erkrankten Katzen sehr bis hoch signifikant unterschieden (AGP: $p = 0,002$; SAA: $p < 0,0001$; Hp: $p < 0,0001$; Abb. 10 A, B und C). Der Konzentrationsunterschied zwischen den gesunden und den an einem unkomplizierten DM erkrankten Katzen war für Hp ebenfalls signifikant ($p = 0,02$).

Tab. 9: Konzentrationen der Akute-Phase-Proteine AGP, SAA und Hp bei an einem unkomplizierten und komplizierten Diabetes mellitus (DM) erkrankten Katzen am Tag der Erstvorstellung verglichen mit den Konzentrationen der gesunden Katzen.

(AGP, saures α1-Glykoprotein; DM, Diabetes mellitus; Hp, Haptoglobin; n, Anzahl der Katzen; SAA, Serum-Amyloid-A; SD, Standardabweichung)

APP	Parameter	Gesunde Katzen (n = 27)	DM _{unkompliziert} (n = 4)	DM _{kompliziert} (n = 6)
AGP (µg/ml)	Median	170,0	1095,0	1450,0
	Mittelwert	180,6	1202,5	1463,0
	SD	115,9	1046,1	1015,0
	Minimum	< 100,0*	< 100,0*	260,0
	Maximum	440,0	2570,0	2720,0
	Shapiro-Wilk-Test: p	0,03	0,88	0,56
SAA (µg/ml)	Median	1,7	3,4	100,0
	Mittelwert	2,8	5,4	82,7
	SD	3,7	5,7	27,56
	Minimum	0,9	1,2	37,8
	Maximum	16,1	13,4	> 100,0**
	Shapiro-Wilk-Test: p	< 0,0001	0,19	0,006
Hp (mg/ml)	Median	0,38	3,24	5,40
	Mittelwert	0,69	3,14	5,60
	SD	0,74	1,33	1,76
	Minimum	< 0,19*	1,51	3,28
	Maximum	2,57	4,57	8,03
	Shapiro-Wilk-Test: p	< 0,0001	0,93	0,93

* Zur statistischen Auswertung wurden nicht-messbar niedrige Konzentrationen für AGP auf 50 µg/ml und für Hp auf 0,1 mg/ml gesetzt. ** Zur statistischen Auswertung wurden SAA-Konzentrationen von > 100 µg/ml auf 100 µg/ml gesetzt.

Für AGP und SAA war der Konzentrationsunterschied zwischen diesen beiden Gruppen nicht signifikant (AGP: $p = 0,16$; SAA $p = 1,0$). Es gab keinen signifikanten Konzentrationsunterschied der APPs zwischen den an einem unkomplizierten und an einem komplizierten DM erkrankten Katzen (AGP: $p = 1,0$; SAA: $p = 0,07$; Hp: $p = 1,0$).

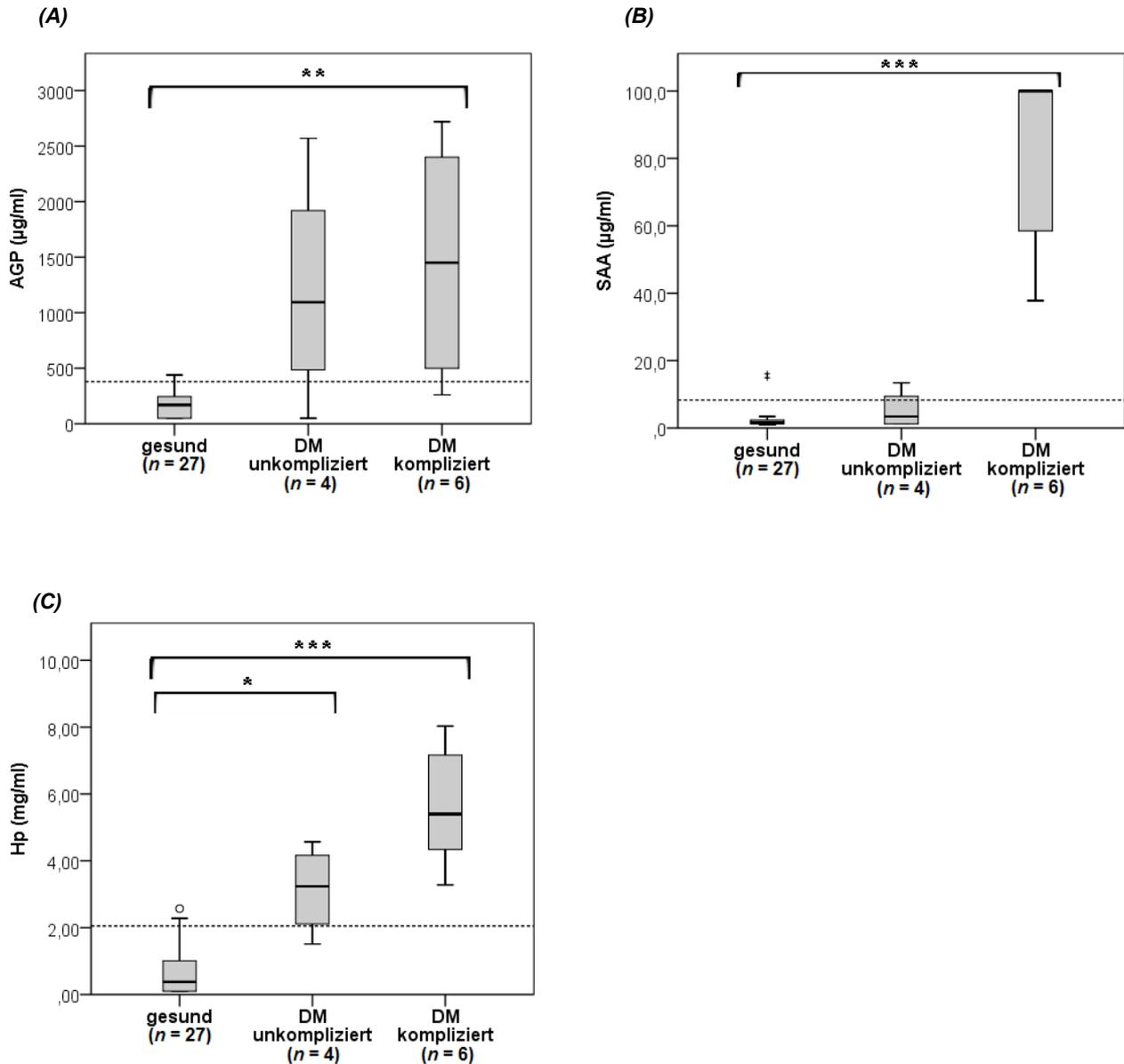


Abb. 10: Box-Whisker-Plots für AGP (A), SAA (B) und Hp (C) am Tag der Erstvorstellung bei gesunden Katzen ($n = 27$) und an einem unkomplizierten und komplizierten Diabetes mellitus (DM) erkrankten Katzen ($n = 4$ bzw. $n = 6$). Für Erklärungen zu Box-Whisker-Plots siehe Abb. 9. Die gestrichelte Linie stellt das obere Referenzlimit des jeweiligen Akute-Phase-Proteins dar (siehe Tab. 7). Signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen sind mit *, ** oberhalb der Klammern gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Zur statistischen Auswertung wurden nicht-messbar niedrige Konzentrationen für AGP auf $50 \mu\text{g/ml}$ und für Hp auf $0,1 \text{ mg/ml}$ gesetzt. SAA-Konzentrationen $> 100 \mu\text{g/ml}$ wurden auf $100 \mu\text{g/ml}$ gesetzt. (AGP, saures $\alpha 1$ -Glykoprotein; DM, Diabetes mellitus; Hp, Haptoglobin; n, Anzahl der Katzen; SAA, Serum-Amyloid-A)

5.2.3.3 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Innerhalb der an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen betrug die diagnostische SE resp. SP zum Erkennen einer komplizierten Verlaufsform für AGP 55,6% bzw. 71,4 %, für SAA 66,7% bzw. 28,6% und für Hp 66,7% bzw. 71,4% (Tab. 10). Innerhalb der an DM erkrankten Katzen ergab sich eine diagnostische SE resp. SP zum Erkennen eines komplizierten DM für AGP von 83,3% bzw. 25,0%, für SAA von 100% bzw. 75,0% und für Hp von 100% bzw. 25,0% (Tab. 10). Die 95%ige CI umfassten aufgrund der kleinen Studienpopulation große Spannen.

Tab. 10: Diagnostische Sensitivität (SE) und Spezifität (SP) und jeweilige 95%ige Konfidenzintervalle (CI) von AGP, SAA und Hp zur Detektion eines komplizierten Verlaufs der FLUTD (FLUTD_{kompliziert}) bzw. eines komplizierten Diabetes mellitus (DM_{kompliziert}) am Tag der Erstvorstellung.

(AGP, saures α 1-Glykoprotein; CI, Konfidenzintervall; DM, Diabetes mellitus; FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease; Hp, Haptoglobin; SAA, Serum-Amyloid-A)

APP	Parameter	FLUTD _{kompliziert}	DM _{kompliziert}
AGP (μ g/ml)	SE (95% CI)	55,6 (21,2 – 86,3) %	83,3 (35,9 – 99,6) %
	SP (95% CI)	71,4 (29,0 – 96,3) %	25,0 (0,6 – 80,6) %
SAA (μ g/ml)	SE (95% CI)	66,7 (29,9 – 92,5) %	100,0 (54,1 – 100,0) %
	SP (95% CI)	28,6 (3,7 – 71,0) %	75,0 (19,4 – 99,4) %
Hp (mg/ml)	SE (95% CI)	66,7 (29,9 – 92,5) %	100,0 (54,1 – 100,0) %
	SP (95% CI)	71,4 (29,0 – 96,3) %	25,0 (0,6 – 80,6) %

5.2.3.4 Korrelationen

Bei den insgesamt 26 erkrankten Katzen wurde am Tag der Erstvorstellung zwischen AGP und Hp eine hoch signifikante stark positive Korrelation nachgewiesen ($r_s = 0,77$; $p < 0,0001$; Abb. 11 A). Eine sehr signifikante mittlere Korrelation lag zwischen SAA und Hp bzw. zwischen AGP und SAA vor ($r_s = 0,62$; $p = 0,002$; Abb. 11 B bzw. $r_s = 0,61$; $p = 0,002$; Abb. 11 C).

Bei 4 Katzen wurde am Tag der Erstvorstellung eine SAA-Konzentration $> 100 \mu\text{g/ml}$ gemessen. Diese wurden aus der Korrelationsberechnung für den Zusammenhang zwischen SAA und AGP bzw. zwischen SAA und Hp ausgeschlossen.

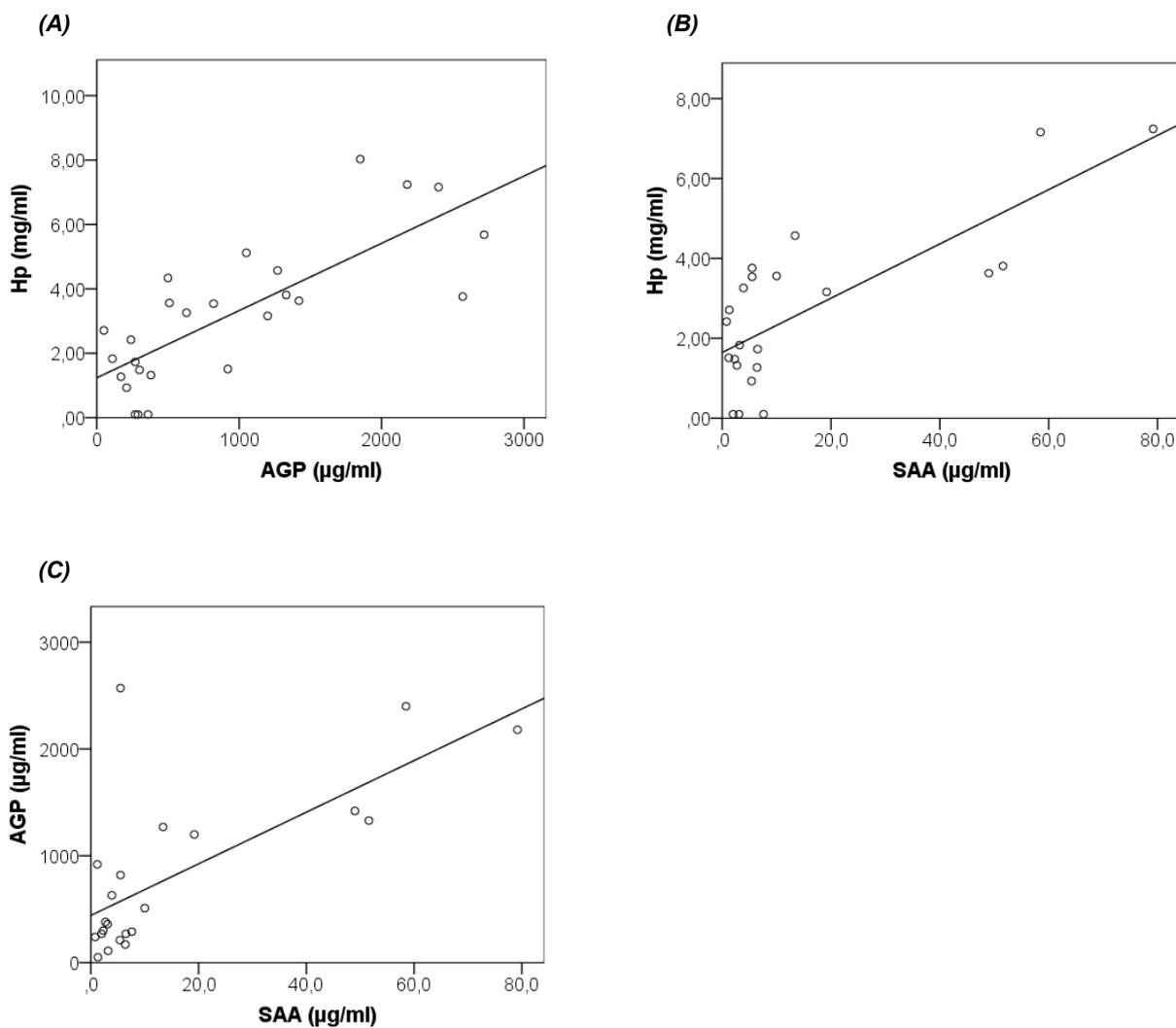


Abb. 11: Streudiagramme zur Darstellung der Korrelationen zwischen den Akute-Phase-Proteinen AGP und Hp (A), zwischen SAA und Hp (B) sowie zwischen AGP und SAA (C) bei erkrankten Katzen am Tag der Erstvorstellung. Die schwarze Linie stellt die Regressionsgerade dar. Die Anzahl der Messungen beträgt für AGP und Hp 26 und für SAA 22. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient r_s betrug zwischen AGP und Hp 0,77; zwischen SAA und Hp 0,62 und zwischen AGP und SAA 0,61. Alle 3 Korrelationen waren sehr bis hoch signifikant. (AGP, saures α 1-Glykoprotein; Hp, Haptoglobin; SAA, Serum-Amyloid-A)

5.2.4 Bedeutung hinsichtlich Monitoring

5.2.4.1 Obstruktive FLUTD

Die Verlaufsmessungen für FLUTD_{unkompliziert} sind in *Abb. 12 A – C* und für FLUTD_{kompliziert} in *Abb. 12 D – F* dargestellt. Bei 11 Katzen wurden insgesamt 2 Messungen, bei 3 Katzen 3 Messungen und bei 2 Katzen 6 Messungen durchgeführt. Informationen zu den einzelnen Katzen sind in *Anhang VII* aufgelistet.

In der Gruppe FLUTD_{unkompliziert} wurde für AGP, SAA und Hp bei 2 Katzen am Tag der Erstvorstellung eine Konzentration oberhalb des Referenzintervalls gemessen (Katze 5 und 7). Bei den restlichen 5 Katzen wurden am Tag 0 keine erhöhten APP-Konzentrationen festgestellt. Trotz klinischer Besserung zeigte sich für AGP bei 4 Katzen ein geringgradiger Konzentrationsanstieg oberhalb des maximalen Referenzlimits (Katze 1, 2, 3, 4). Für SAA wurde nur bei einer Katze ein geringgradiger Anstieg der Konzentration oberhalb des maximalen Referenzlimits festgestellt (Katze 4). Ein geringgradiger Anstieg der Hp-Konzentration jedoch innerhalb des Referenzintervalls wurde bei 2 Katzen nachgewiesen (Katze 1 und 4). Bei Katze 4, für welche ein deutlicher Anstieg von AGP und SAA und nur ein geringgradiger für Hp nachgewiesen wurde, wurde innerhalb des gemessenen Zeitraumes eine perineale Urethrostomie durchgeführt. Für die anderen 3 Katzen (Katze 5, 6, 7), welche operiert wurden, konnte bis auf AGP bei Katze 7 und SAA bei Katze 6 ein Konzentrationsabfall der 3 APPs verzeichnet werden. Ein zeitgleicher Konzentrationsabfall aller 3 APPs war bei Katze 5 festzustellen. Diese Katze war bereits mehrere Tage zuvor beim Haustierarzt in Behandlung wegen einer obstruktiven FLUTD und zeigte am Tag der Erstvorstellung im Vergleich zu den anderen Katzen dieser Gruppe deutlich erhöhte APP-Konzentrationen.

In der Gruppe FLUTD_{kompliziert} waren die Konzentrationen für AGP bzw. Hp bei 5 bzw. 6 Katzen am Tag 0 teilweise hochgradig erhöht (Katze 9 [nur Hp], 10, 11, 12, 14, 16). Für SAA wurde bei 3 Katzen am Tag 0 eine Konzentration deutlich oberhalb des Referenzintervalls gemessen (Katze 10, 12, 16). Zwei der 9 Katzen (Katze 13 und 14) verstarben aufgrund eines Thoraxergusses bzw. Lungenödems. Bei Katze 13 wurde zuvor ein hochgradiger Anstieg aller 3 APPs detektiert, wohingegen bei Katze 14 alle 3 APP-Konzentrationen unter der Behandlung abgefallen waren. Bei den verbliebenen 7 Patienten stiegen die AGP- und Hp-Konzentrationen im Laufe der Behandlung an oder zeigten unverändert hohe Konzentrationen. Für SAA wurde bei 5 der 7 Katzen ein Konzentrationsanstieg verzeichnet, wohingegen bei Katze 8 und 16 ein Konzentrationsabfall nachgewiesen wurde. Bei 2 Katzen (Katze 10, 12) war vor dem hochgradigen Anstieg ein deutlicher Konzentrationsabfall aller 3 APPs zu verzeichnen. Bei Katze 10 waren die Werte anfänglich bis zur Entlassung am Tag 6 gesunken. Zwei Tage später wurde sie erneut vorstellig wegen Inappetenz. Sie wurde stationär aufgenommen und es wurde eine Pankreatitis diagnostiziert. Bei Katze 12 waren die APP-Werte vor der Operation am Tag 4 gesunken und stiegen danach wieder an. Auch bei diesem Patienten wurde eine Pankreatitis festgestellt.

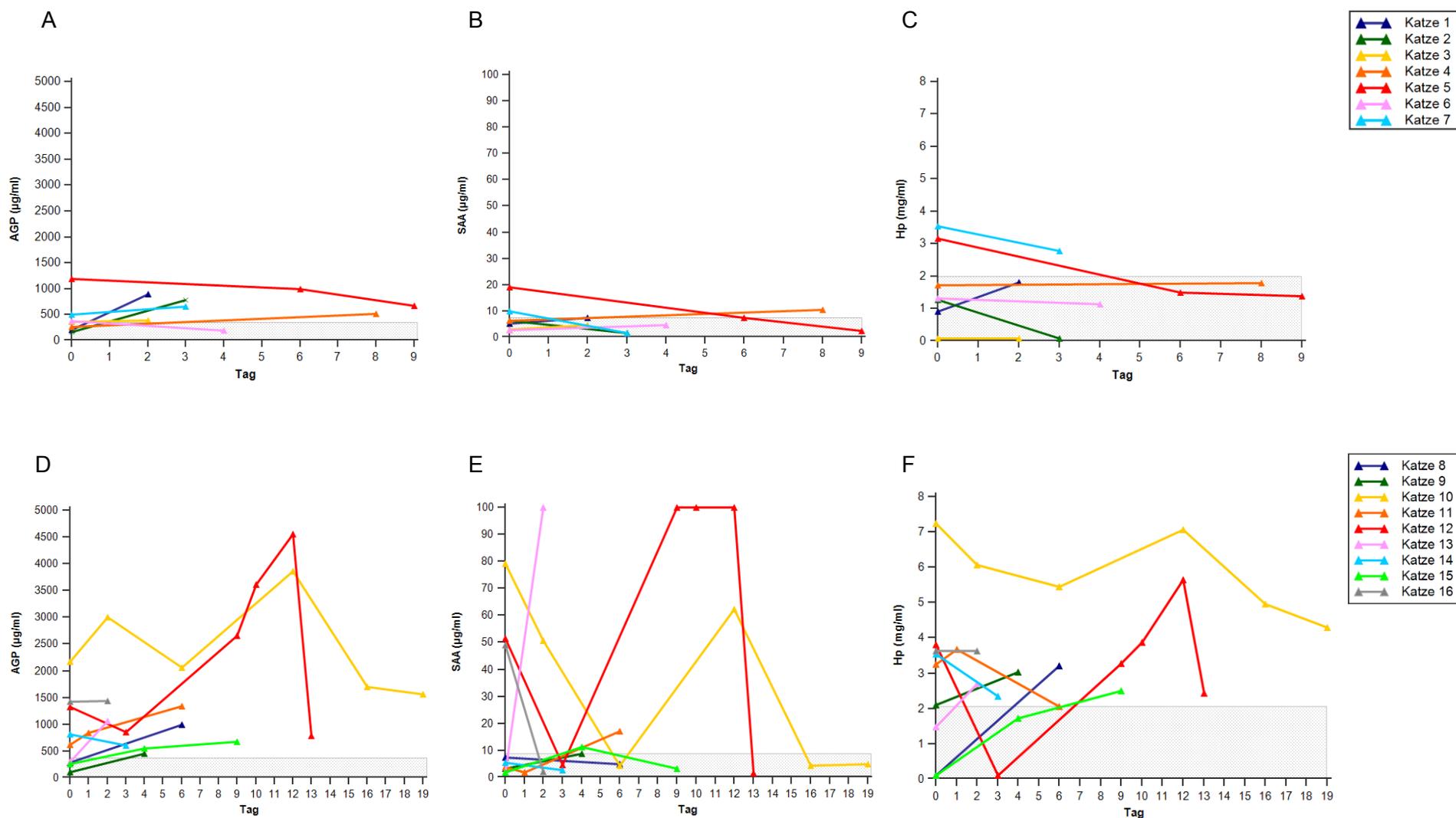


Abb. 12: Verlaufsmessungen von AGP, SAA und Hp bei an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen unterteilt nach ihrem klinischen Verlauf in FLUTD_{unkompliziert} (A, B, C) und FLUTD_{kompliziert} (D, E, F). Probenentnahmen sind durch „▲“-Symbole gekennzeichnet. Der Tag 0 stellt den Tag der Erstvorstellung dar. Der grau-gepunktete Bereich beschreibt den Referenzbereich (Tab. 7). Nicht-messbar niedrige Hp-Konzentrationen wurden auf 0,1 mg/ml gesetzt. SAA-Konzentrationen von > 100 µg/ml wurden auf 100 µg/ml gesetzt.

5.2.4.2 Feliner Diabetes mellitus

Abb. 13 A – C zeigen die Verlaufsmessungen der Gruppe DM_{unkompliziert}, Abb. 13 D – F die der Gruppe DM_{kompliziert}. 2 Messungen wurden bei 2 Katzen, 3 bei 3 Katzen, 4 bei 2 Katzen und 5 Messungen bei einer Katze durchgeführt. Informationen zu den einzelnen Katzen sind in *Anhang VII* aufgelistet.

Bei den 4 Katzen der Gruppe DM_{unkompliziert} war neben des DM mindestens eine weitere Vorerkrankung bekannt (*Anhang VI*, *Anhang VII*). Die höchsten Konzentrationen von SAA und Hp und erhöhte AGP-Konzentrationen wurden bei Katze 19 gemessen, welche hinsichtlich ihrer Glukosewerte gut eingestellt war. Dieser Patient verstarb Zuhause an einer ungeklärten akuten Erkrankung 4 Tage nach der letzten Messung. Die restlichen 3 Katzen dieser Gruppe waren hinsichtlich ihrer Glukose-Werte unter Therapie unbefriedigend eingestellt. Sie zeigten unterschiedliche APP-Verläufe. Bei Katze 17 wurden AGP- und SAA-Werte im Referenzbereich nachgewiesen. Die Hp-Konzentrationen waren deutlich erhöht. Bei ihr wurden eine Hyperthyreose und eine chronische Pankreatitis vor der ersten Entnahme diagnostiziert. Die Katze war jedoch laut der Besitzer bei gutem Allgemeinbefinden. Bei Katze 18 wurden anfänglich hochgradig erhöhte AGP- und mittelgradig erhöhte Hp-Spiegel gemessen, wobei jedoch ein deutlicher Konzentrationsabfall von der ersten zur zweiten Messung zu verzeichnen war. Die SAA-Konzentrationen waren nicht erhöht. Dieser Patient war 14 Tage zuvor an einer DKA und Pankreatitis erkrankt und wurde 7 Tage vor der ersten Probenentnahme aus der Klinik entlassen. Aus der stationären Zeit konnten keine Proben gewonnen werden. Bei Katze 20 wurden über die Zeit abfallende AGP- und Hp-Konzentrationen bis auf einen erneuten geringgradigen Hp-Konzentrationsanstieg festgestellt. Die SAA-Werte waren dauerhaft niedrig. Die Katze war 10 Tage zuvor in Behandlung wegen einer DKA und einer Pankreatitis. Bis auf weiterhin erhöhte Glukose-Konzentrationen zeigte der Patient im Untersuchungszeitraum ein gutes Allgemeinbefinden.

Für DM_{kompliziert} waren die SAA- und Hp-Konzentrationen bei allen 6 Katzen am Tag 0 (bzw. Tag 292 für Katze 24) mittel- bis hochgradig erhöht. Die AGP-Werte waren bei 5 der 6 Katzen zum Teil hochgradig erhöht (keine Erhöhung bei Katze 24). Bei allen Katzen war mindestens eine Vorerkrankung bekannt oder es wurden weitere Erkrankungen diagnostiziert (*Anhang VI*, *Anhang VII*). Bei 3 Katzen (Katze 21, 22 und 23) wurde ein Konzentrationsabfall für AGP, SAA und Hp bis auf Werte geringgradig oberhalb oder innerhalb des Referenzbereiches festgestellt. Katze 24 wurde am Tag 0 für ein Tagesprofil vorgestellt. Bis auf geringgradig erhöhte Hp-Konzentrationen lagen die AGP- und SAA-Werte im Referenzintervall. Am Tag 292 wurde der Patient vorstellig mit einer DK, woraufhin sich die Besitzer ohne weitere Diagnostik zu einer Euthanasie entschieden. Im Vergleich zum Tag 0 waren die SAA- und Hp-Konzentrationen im Gegensatz zum AGP deutlich angestiegen. Bei Katze 25 waren die AGP- und Hp-Konzentration kontinuierlich erhöht ohne eine deutliche Konzentrationsabnahme. Die SAA-

Werte stiegen nach einem Abfall in den Referenzbereich wieder deutlich an. Zwischen der 2. und der 3. Probenentnahme wurde die Katze aus der Klinik entlassen. Sie wurde jedoch 9 Tage (Tag der 3. Probenentnahme) danach erneut mit einer DKA vorstellig, woraufhin sich die Besitzer zu einer Euthanasie entschieden. Bei Katze 26 waren die AGP- und Hp-Konzentrationen trotz eines Abfalls aller 3 APPs weiterhin hochgradig erhöht. Klinisch war der Patient am Tag der letzten Blutentnahme von sehr schlechtem Allgemeinbefinden, woraufhin sich die Besitzer für eine Euthanasie entschieden.

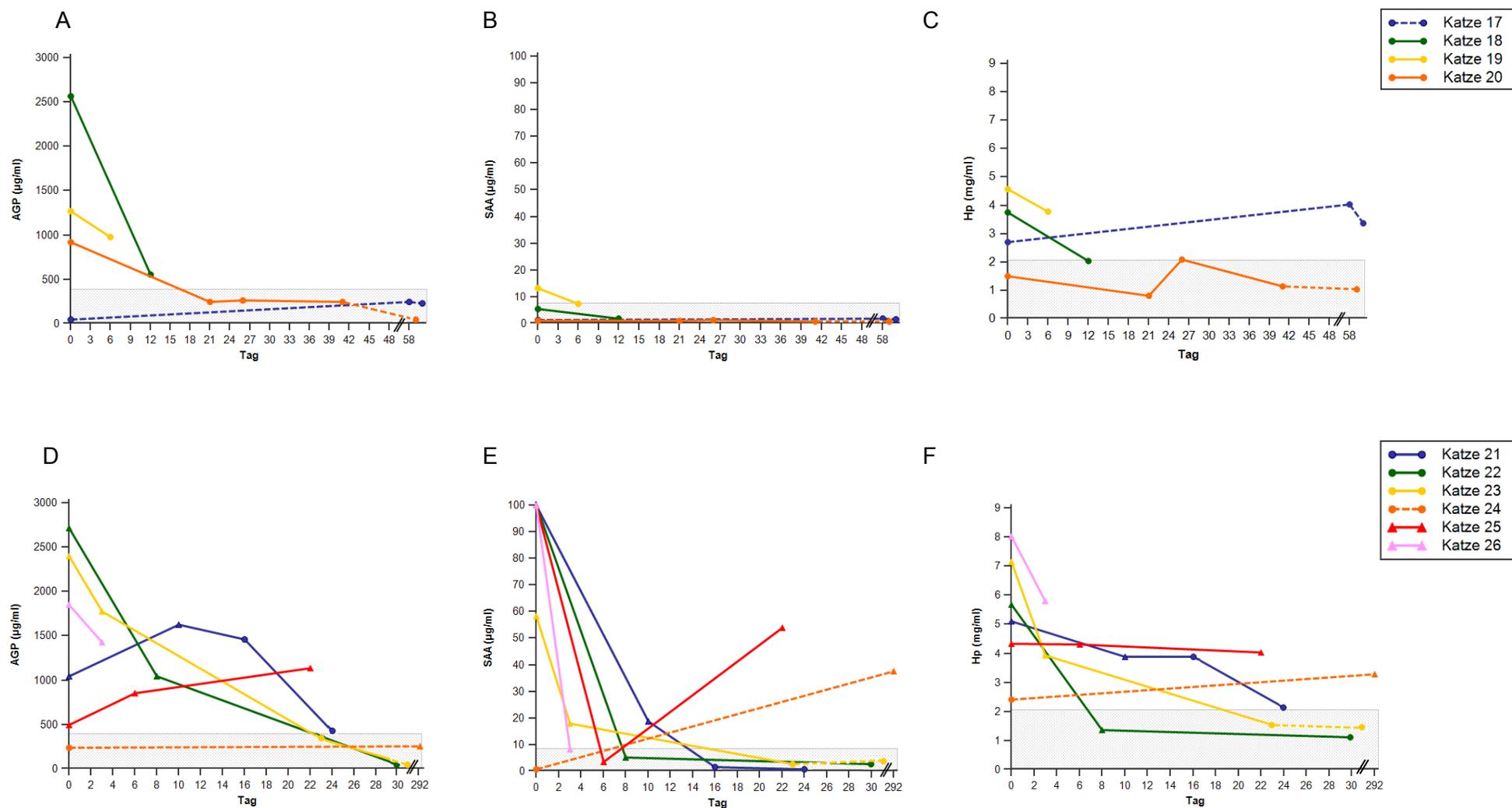


Abb. 13: Verlaufsmessungen von AGP, SAA und Hp bei an einem Diabetes mellitus (DM) erkrankten Katzen unterteilt in $DM_{unkompliziert}$ (A, B, C) und $DM_{kompliziert}$ (D, E, F). „▲“-Symbole stellen Probenentnahmen während der stationären Betreuung dar. Glukose-Tagesprofile oder ambulante Kontrolluntersuchungen sind durch „●“-Symbole gekennzeichnet. Auf der geteilten x-Achse ist die Zeit in Tagen bis Tag 30 bzw. 48 linear und folgend nur der jeweilige Zeitpunkt der Probenentnahme dargestellt. Die gestrichelten Linien kennzeichnen einen zeitlich nicht-linear dargestellten Abstand. Der grau-gepunktete Bereich beschreibt den Referenzbereich (Tab. 7). Nicht-messbar niedrige AGP-Konzentrationen wurden auf 50 µg/ml gesetzt. SAA-Konzentrationen von > 100 µg/ml wurden auf 100 µg/ml gesetzt.

5.2.4.3 Verallgemeinerte lineare Modelle

Um einen linearen Zusammenhang zwischen der abhängigen Variable „Konzentrationsdifferenz zum Tag 0“ und der unabhängigen Variablen „Tag der Probenentnahme“ herzustellen, wurde die Variable „Tag der Probenentnahme“ kubisch transformiert. Als Ergebnis gingen die drei unabhängigen Variablen „Tag“, „Tag²“ und „Tag³“ in die verallgemeinerten linearen Modelle ein. Folgend wurde für „Konzentrationsdifferenz zum Tag 0“ von AGP, SAA und Hp jeweils ein verallgemeinertes lineares Modell angepasst. Die jeweilige Konzentrationsdifferenz war die abhängige Variable, als unabhängige Variablen wurden die kubisch transformierte Variable „Tag“ sowie „Gruppe“ (FLUTD_{unkompliziert}, FLUTD_{kompliziert}, DM_{kompliziert}) zunächst gemeinsam modelliert (Tab. 11). Bei einer signifikanten Beeinflussung der abhängigen Variablen durch nur eine unabhängige Variable wurde ein bivariates Modell in einem 2. Schritt unter Ausschluss der nicht beeinflussenden unabhängigen Variable gebildet (Tab. 12). Da von einigen Tieren mehrere Messungen vorlagen (bis zu 6 Messungen je Katze) wurde die Variable „Tiernummer“ als zufälliger Effekt in die Modelle aufgenommen. Durch die Dummy-Kodierung der Variable „Gruppe“ wurde dessen Ausprägung „FLUTD_{unkompliziert}“ redundant und deshalb auf Null gesetzt. Damit dient sie als Bezugs- oder Basiskategorie für die übrigen Ausprägungen. Die zur Beurteilung der Modellgüte verwendeten Parameter der QICC sind im Anhang aufgeführt (Anhang VIII).

Für AGP wurde ein sehr signifikanter Einfluss des Tages der Probenentnahme auf die Konzentrationsdifferenz zum Tag 0 nachgewiesen ($p = 0,003$; Tab. 11). Das Modell zeigte weiterhin, dass bei den Katzen der Gruppe FLUTD_{kompliziert} die AGP-Konzentrationen am Tag der jeweiligen Probenentnahme im Vergleich zu Tag 0 signifikant angestiegen waren ($p = 0,014$). Die AGP-Konzentrationen der Katzen der Gruppe DM_{kompliziert} waren am Tag der jeweiligen Probenentnahme im Vergleich zum Tag 0 niedriger, jedoch nicht signifikant ($p = 0,38$). Für SAA hatte der Tag der Probenentnahme keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Konzentrationsdifferenz zum Tag 0 ($p = 0,25$; Tab. 11). Folgend wurde ein zweites Modell errechnet unter Ausschluss dieser unabhängigen Variable (Tab. 12). Es konnte in beiden Modellen ein signifikanter Einfluss der Gruppenzugehörigkeit festgestellt werden. Bei den Katzen der Gruppe DM_{kompliziert} war die SAA-Konzentration am Tag der jeweiligen Probenentnahme im Vergleich zu Tag 0 hoch signifikant niedriger ($p < 0,0001$). Für FLUTD_{kompliziert} wurde keine signifikanter Konzentrationsunterschied am Tag der jeweiligen Probenentnahme im Vergleich zu Tag 0 nachgewiesen ($p = 0,87$ bzw. $p = 0,80$). Für Hp wurde ein hoch signifikanter Einfluss des Tages der Probenentnahme auf die Konzentrationsdifferenz zum Tag 0 ermittelt ($p < 0,0001$; Tab. 11 und Tab. 12). Die Gruppenzugehörigkeit hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Hp-Verlauf. Die Hp-Konzentrationen am Tag der jeweiligen Probenentnahme im Vergleich zum Tag 0 waren, wenn auch nicht signifikant, bei den Katzen der Gruppe DM_{kompliziert} niedriger ($p = 0,26$) und bei FLUTD_{kompliziert} erhöht ($p = 0,13$).

Tab. 11: Parameterschätzungen der verallgemeinerten linearen Modelle zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen den Konzentrationsverläufen der jeweiligen Akute-Phase-Proteine (APPs) als abhängige Variable und der Gruppenzugehörigkeit sowie dem Tag der Probenentnahme als unabhängige Variable. Die Konzentrationsverläufe wurden durch die Konzentrationsdifferenz am Tag der Probenentnahme zum Tag der Erstvorstellung (Tag 0) beschrieben. Die untersuchten Gruppen waren FLUTD_{unkompliziert}, FLUTD_{kompliziert} und DM_{kompliziert}. Der Tag der Probenentnahme bezog sich auf Tag 0 (z.B. Tag 1 = 1 Tag nach Erstvorstellung). (AGP, saures α 1-Glykoprotein; CI, Konfidenzintervall; DM; Diabetes mellitus; FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease; Hp, Haptoglobin; SAA, Serum-Amyloid-A)

Abhängige Variable	Unabhängige Variable	Regressionskoeffizient B (AGP und SAA: $\mu\text{g/ml}$, Hp: mg/ml)	Standardfehler (AGP und SAA: $\mu\text{g/ml}$, Hp: mg/ml)	95% Wald - CI (AGP und SAA: $\mu\text{g/ml}$, Hp: mg/ml)	p	
[AGP] _{Tag x} - [AGP] _{Tag 0} ($\mu\text{g/ml}$)	Konstante	387,2	157,9	77,6 – 696,7	0,014	
	Gruppe	FLUTD _{unkompliziert}	0*			
		FLUTD _{kompliziert}	559,4	227,0	114,6 – 1004,2	0,014
		DM _{kompliziert}	-394,8	450,8	-1278,3 – 488,7	0,38
	Tag der Probenentnahme	Tag	-53,3	17,7	-88,0 – 9,1	0,003
		Tag ²	0,5	0,1	0,2 – 0,7	< 0,0001
		Tag ³	-0,001	0,0002	-0,001 – 21,7	< 0,0001
(Skalierung)	923479,1					
[SAA] _{Tag x} - [SAA] _{Tag 0} ($\mu\text{g/ml}$)	Konstante	0,7	5,0	-9,2 – 10,6	0,89	
	Gruppe	FLUTD _{unkompliziert}	0*			
		FLUTD _{kompliziert}	-2,1	13,4	-28,3 – 24,1	0,87
		DM _{kompliziert}	-70,6	11,3	-92,8 bis -48,5	< 0,0001
	Tag der Probenentnahme	Tag	-0,9	0,8	-2,5 – 0,7	0,247
		Tag ²	0,016	0,005	0,005 – 0,03	0,003
		Tag ³	0,000	0,000	0,000 – 0,000	< 0,0001
(Skalierung)	1312,5					
[Hp] _{Tag x} - [Hp] _{Tag 0} (mg/ml)	Konstante	0,06	0,3	-0,6 – 0,7	0,85	
	Gruppe	FLUTD _{unkompliziert}	0*			
		FLUTD _{kompliziert}	0,6	0,5	-0,4 – 1,6	0,26
		DM _{kompliziert}	-1,2	0,8	-2,8 – 0,4	0,13
	Tag der Probenentnahme	Tag	-0,1	0,02	-0,2 bis -0,08	< 0,0001
		Tag ²	0,001	0,0001	0,001 – 53,2	0,000
		Tag ³	0,000	0,000	0,000 – 71,2	< 0,0001
(Skalierung)	2,7					

* Dieser Parameter ist auf Null gesetzt, da er redundant ist.

Tab. 12: Parameterschätzungen der bivariaten verallgemeinerten linearen Modelle zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen den Konzentrationsverläufen der jeweiligen Akute-Phase-Proteine (APPs) als abhängige Variable und der Gruppenzugehörigkeit oder dem Tag der Probenentnahme als jeweils einzige unabhängige Variable. Diese Berechnung ist eine Folgeberechnung der in Tab. 11 aufgeführten Modelle. Für weitere Erklärungen siehe dort.

(AGP, saures α 1-Glykoprotein; CI, Konfidenzintervall; DM; Diabetes mellitus; FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease; Hp, Haptoglobin; SAA, Serum-Amyloid-A)

Abhängige Variable	Unabhängige Variable	Regressionskoeffizient B (SAA: $\mu\text{g/ml}$, Hp: mg/ml)	Standardfehler (SAA: $\mu\text{g/ml}$, Hp: mg/ml)	95% Wald - CI (SAA: $\mu\text{g/ml}$, Hp: mg/ml)	p	
[SAA] _{Tag x} - [SAA] _{Tag 0} ($\mu\text{g/ml}$)	Konstante	-4,0	3,1	-10,0 – 2,0	0,20	
	Gruppe	FLUTD _{unkompliziert}	0*			
		FLUTD _{kompliziert}	-3,8	14,7	-32,7 – 25,10	0,80
		DM _{kompliziert}	-62,0	13,16	-87,7 bis -36,2	< 0,0001
	(Skalierung)	1594,8				
[Hp] _{Tag x} - [Hp] _{Tag 0} (mg/ml)	Konstante	0,43	0,32	-0,20 – 1,07	0,181	
	Tag der Probenentnahme	Tag	-0,16	0,03	-0,22 bis -0,11	< 0,0001
		Tag ²	0,001	0,0002	0,001 – 0,002	< 0,0001
		Tag ³	0,000	0,000	0,000 – 0,000	< 0,0001
	(Skalierung)	3,035				

* Dieser Parameter ist auf Null gesetzt, da er redundant ist.

6 DISKUSSION

Die Etablierung eines neuen Biomarkers kann in 4 Phasen unterteilt werden. Diese sind in der angegebenen Reihenfolge: (1) Evaluierung der analytischen Performance (analytische Validierung der Messmethode), (2) Evaluierung der Konzentrationen bei gesunden und erkrankten Tieren (Overlap Performance, klinische Validierung der Messmethode), (3) Bewertung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität in der klinischen Anwendung und (4) Beurteilung der klinischen Auswirkung und Brauchbarkeit (Kjelgaard-Hansen und Jacobsen, 2011). In der Validierungsstudie wurden die ersten beiden Phasen für einen Sandwich-ELISA zur Messung des felines Hp durchgeführt. Die klinische Studie umfasst die Phasen 3 und 4 für AGP, SAA und Hp bei an obstruktiver FLUTD und an DM erkrankten Katzen.

6.1 Validierungsstudie des Haptoglobin-ELISAs

Ein grundlegender Schritt für die analytische Validierung einer Messmethode ist die vorherige Festlegung von Performance-Zielen. Die durch Konsensbeschluss definierte Hierarchie der analytischen Zielsetzungen umfasst 3 Modelle in der folgenden Reihenfolge: (1) Ziele basierend auf der Auswirkung auf klinische Ergebnisse; (2) Ziele basierend auf der biologischen Variabilität des zu messenden Analyts; (3) Ziele basierend auf dem neuesten Stand der Technik und Wissenschaft (Sandberg et al., 2015). Bisher wurden keine Daten zu Zielsetzungen nach diesen Modellen für felines Hp publiziert.

Daher wurden die Performance-Ziele für Präzision, Bias und Gesamtfehler auf Grundlage der veröffentlichten Daten für die biologische Variabilität des kaninen Hp formuliert (Harr et al., 2013). Gründe dafür sind zum einen, dass Hp in beiden Spezies ein moAPP mit ähnlichen Konzentrationen für gesunde Hunde und Katzen darstellt (Martinez-Subiela et al., 2004; Ceron et al., 2005; Kann et al., 2012). Zum anderen sind die Empfehlungen für $CV_{Des/Min}$, $Bias_{Des/Min}$ und $TE_{Des/Min}$ ähnlich oder sogar strenger als die Empfehlungen für analytische Validierungen von Messmethoden für Hp in der Humanmedizin (Statland et al., 1976; Liappis et al., 1986; Clark und Fraser, 1993) oder für generelle Empfehlungen in der Veterinärmedizin (Jensen und Kjelgaard-Hansen, 2010). Im Allgemeinen sollten bei Erfüllung der festgelegten Performance-Ziele klinische Entscheidungen und somit die Patientenversorgung nicht beeinträchtigt werden.

Die Ergebnisse der Präzisionsanalyse des ELISAs waren nicht wie erwünscht, aber akzeptabel, da alle 3 analytischen CV_{Total} niedriger waren als CV_{Min} . Ein CV_{Total} erreichte sogar einen kleineren Wert als CV_{Des} . Die Werte für CV_{Des} und CV_{Min} resultieren aus dem Konzept, dass die analytische Ungenauigkeit für ein adäquates Monitoring beschränkt werden sollte, sodass sie nur zu einem bestimmten Anteil der Gesamtvariabilität (als Summe aus biologischer und analytischer Variabilität) zusetzt. Demzufolge ist der erwünschte analytische CV_{Des} definiert

als $CV_{Des} < 0,5 \times CV_I$ und der minimal akzeptierbare CV_{Min} als $CV_{Min} < 0,75 \times CV_I$. CV_I stellt die intra-individuelle Varianz dar (Harris, 1979). Alle 3 CV_{Total} erfüllten die Kriterien von CV_{Min} . Dies bedeutet, dass sich die Variabilität des Testergebnisses um maximal 25% erhöht. Hp-Konzentrationen können sich 2- bis 10-fach nach einem Stimulus erhöhen (Ceron et al., 2005; Paltrinieri, 2008; Eckersall und Bell, 2010). Daher sind die CV_{Total} mit Werten $< 12,75\%$ in Relation zur Höhe des Konzentrationsanstiegs akzeptabel für klinische Zwecke, wenn ein zukünftiger klinischer Cut-Off-Wert höher ist als das Hp-Maximum der gesunden Katzen.

Zudem sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vergleichbar mit denen anderer Präzisionsanalysen von Immunassays für maAPPs, die eine ausreichende analytische Performance für die klinische Anwendbarkeit bei Katzen (Kajikawa et al., 1996; Hansen et al., 2006; Christensen et al., 2012) und bei anderen Haustieren (Kjelgaard-Hansen et al., 2003; Jacobsen et al., 2006; Kjelgaard-Hansen et al., 2007) aufwiesen.

Aus logistischen Gründen wurden die 4 Doppelmessungen für die Inter-Assay-Studie in gleichen Teilen in 2 verschiedenen Labors durchgeführt. Daher wurden unterschiedliche Geräte, wie in 4.2.1 beschrieben, benutzt. Die weiteren Messbedingungen (Messprotokolle, Anwendungsbedingungen und durchführende Person) waren jedoch gleich. Unter diesen Voraussetzungen kann ein hoher Inter-Assay-CV durch eine schlechte Wiederholbarkeit im Sinne des englischen Begriffs „repeatability“ (z.B. eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Mikrotiterplatten) und/oder durch eine schlechte Reproduzierbarkeit im Sinne des englischen Terminus „reproducibility“ verursacht sein. Eine mangelhafte Reproduzierbarkeit kann zum einen durch die verschiedenen Geräte zwischen beiden Labors oder zum anderen durch einen präanalytischen Fehler in der Probenvorbereitung hervorgerufen worden sein. Der Einfluss der verschiedenen Geräte auf den Inter-Assay-CV konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beurteilt werden. Er scheint jedoch unerheblich zu sein, da keine tendenziell höheren oder niedrigeren Konzentrationen unter den einen oder den anderen Messbedingungen festgestellt wurden. Ein präanalytischer Fehler in der Probenvorbereitung kann nicht ausgeschlossen werden, da die Serumproben vor jedem Messdurchlauf 1:10000 manuell verdünnt wurden. Weitergehende Untersuchungen sind notwendig um aufzuklären, ob der Inter-Assay-CV reduziert werden kann, wenn dieselben vorverdünnten Proben verwendet werden würden. Die Performance-Ziele für die Linearitäts- und Spike-Studien wurden erfüllt. Dies spiegelt eine befriedigende Richtigkeit des ELISAs für klinische Zwecke wider. Das DL von 0,19 mg/ml liegt im unteren Bereich von Hp-Konzentrationen bei gesunden Katzen, welche in vorherigen Studien mittels anderer Assays gemessen wurden (Duthie et al., 1997; Kajikawa et al., 1999; Giordano et al., 2004; Kann et al., 2012). Folglich weist der ELISA eine ausreichende analytische Sensitivität für den klinischen Gebrauch auf.

Als letzter Schritt der analytischen Validierung wurden die Konzentrationen des ELISAs mit denen des spektrophotometrischen Assays verglichen. Letzterer ist ein multispezies-

spezifischer Test, welcher bereits zur Messung des felines Hp für Diagnosezwecke etabliert ist (z.B. Kann et al., 2012; Korman et al., 2012; Kann et al., 2014). Seine automatisierte Anwendung wurde objektiv für kanines Hp mit guten Ergebnissen hinsichtlich Präzision, Richtigkeit und Sensitivität validiert (Eckersall et al., 1999a; Martinez-Subiela und Ceron, 2005). Eine notwendige Bedingung des Methodenvergleichs ist die Wiederholbarkeit beider Methoden, da die mangelhafte Wiederholbarkeit eines Tests in einer schlechten Übereinstimmung im Methodenvergleich resultieren würde (Mantha et al., 2000). Die Wiederholbarkeit des ELISAs wurde in der Präzisionsstudie nachgewiesen und wurde bestätigt durch ausreichende Ergebnisse im Test auf Wiederholbarkeit nach Bland und Altman. Die Wiederholbarkeit des spektrophotometrischen Assays wurde bisher nicht für die Messung des felines Hp objektiv nachgewiesen. Deswegen wurde der Test nach Bland und Altman durchgeführt, durch welchen eine akzeptable Wiederholbarkeit festgestellt wurde, wenn die Hp-Konzentrationen der diluierten Proben nicht durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor rückgerechnet wurden. Damit wurden die Ergebnisse der vorausgegangenen Studie beim Hund bestätigt.

Der Methodenvergleich ergab zunächst eine sehr starke positive Korrelation zwischen den Konzentrationen gemessen im ELISA und denen gemessen im spektrophotometrischen Assay. Jedoch wurde sowohl in der Passing-Bablok-Regression als auch im Bland-Altman-Diagramm ein systematischer Fehler zwischen beiden Methoden festgestellt. Die Passing-Bablok-Regression ergab einen proportionalen Bias für alle 39 Serumproben und für die Untergruppe der unverdünnten Proben ($n = 25$). Die letztere Analyse sollte mit Vorsicht interpretiert werden aufgrund der niedrigen Fallzahl und hauptsächlich aufgrund der kleinen Konzentrationsspanne ($< 2,5$ mg/ml) der Seren, da kontinuierlich verteilte Daten eine Voraussetzung für die Passing-Bablok-Regression darstellen (Passing und Bablok, 1983). Unter Berücksichtigung dessen kann dennoch geschlussfolgert werden, dass für die Untergruppe der unverdünnten Proben ein systematischer Fehler existiert, auch wenn die Art des Fehlers (konstant oder proportional) nicht mit Sicherheit ermittelt werden konnte. Für die verdünnten Proben kann der Bias durch Rückrechnung der Hp-Konzentrationen verstärkt werden. Die Ergebnisse des Bland-Altman-Diagramms wiesen auf der einen Seite eine ausreichende statistische Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden auf. Auf der anderen Seite lag die obere Übereinstimmungsgrenze deutlich außerhalb des durch TE_{Des} oder TE_{Min} begrenzten Bereichs. Daher ist eine klinische Übereinstimmung zu verwerfen. Der absolute Wert des Bias von -38,9% erfüllte nicht das Performance-Ziel.

Der wahre Bias als Differenz zwischen den Werten gemessen im ELISA und den „wahren Werten“ der Hp-Konzentrationen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt werden, da ein Goldstandard-Verfahren oder eine Referenzmethode zur Messung des felines Hp nicht existiert. Beim Vergleich von 2 Feldmethoden wird ein Bias erwartet, welcher sich aus den analytischen Fehlern beider Methoden ergibt (Flatland et al., 2014). Warum der hier ermittelte

Bias inakzeptabel hoch war, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt werden und benötigt weitergehende Untersuchungen. Ob ein analytischer Fehler durch Verdünnung der Proben im spektrophotometrischen Assay besteht, ist noch nicht vollständig untersucht. Eckersall und Kollegen wiesen einen linearen Zusammenhang zwischen der Hp-Konzentration und der Absorption bis hin zu einer Konzentration von 8 mg/ml nach (Eckersall et al., 1999a). Bei höheren Konzentrationen scheint der Graph vom linearen Verlauf abzuweichen. In zukünftigen Studien sollte untersucht werden, ob für Proben mit Werten von > 8 mg/ml die Rückrechnung durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor zulässig ist.

Die klinischen Konsequenzen des Bias sind die folgenden: (1) Der ELISA und der spektrophotometrische Assay sind nicht austauschbar und sollten nicht abwechselnd verwendet werden, z.B. beim Monitoring von Patienten. (2) Methoden-spezifische Referenzintervalle müssen für den ELISA etabliert werden. Im Falle eines proportionalen Fehlers kann für eine Anpassung eine Regressionsgleichung benutzt werden. (3) Für jede Methode müssen eigene klinische Cut-Off-Werte definiert werden, welche höher im spektrophotometrischen Assay sind (Flatland et al., 2014).

In der 2. Phase der Validierung wurde eine ausreichende diagnostische Performance nachgewiesen, da bei den Katzen mit einer systemischen Entzündung signifikant höhere Hp-Konzentrationen ermittelt wurden. Anhand der Hp-Konzentrationen gemessen im ELISA können Katzen mit einer fulminanten APR von den gesunden Katzen und den erkrankten Katzen ohne eine systemische Entzündung diskriminiert werden. Dies wurde auch schon für kanines Hp nachgewiesen (Eckersall et al., 1999a; Tecles et al., 2007). Wie erwartet waren die gemessenen Konzentrationserhöhungen niedriger als die der maAPPs, wie beispielsweise SAA (Sasaki et al., 2003; Hansen et al., 2006). Trotzdem wird die Messung von Hp zur Erstellung von APP-Profilen empfohlen (Ceron et al., 2008).

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, in der ein kommerziell erhältlicher Assay zur Messung eines positiven moAPPs bei Katzen objektiv validiert wurde. Dies ermöglicht weiterführende Untersuchungen zur Ermittlung der biologischen Variabilität von Hp bei Katzen, um spezies-spezifische Performance-Ziele zu etablieren und zur Bedeutung von Hp im klinischen Einsatz. Der ermittelte Bias verdeutlicht den Bedarf für internationale Standards zur Harmonisierung von Assays für APPs in der Veterinärmedizin. Zusammenfassend wies der neu entwickelte ELISA eine akzeptierbare analytische und klinische Performance auf. Jedoch sollte ausschließlich der ELISA oder der spektrophotometrische Assay aufgrund des ermittelten Bias verwendet werden. Auch wenn der ELISA zeitaufwendiger als der spektrophotometrische Assay ist, erscheint sein größerer Messbereich von 0 – 20 mg/ml von Vorteil, v.a. in Hinblick auf Diagnostik, Prognostik und Monitoring von schwer kranken Katzen.

6.2 Klinische Studie

AGP und SAA stellen bei der Katze maAPPs dar und sind die am meisten untersuchten feline APPs. Hp als moAPP wurde vergleichsweise selten untersucht (Eckersall und Bell, 2010). Die aktuellen Empfehlungen zur Messung von APP-Profilen bestehend aus mindestens einem maAPP und einem moAPP wurden bisher in nur wenigen Studien umgesetzt. Zudem existieren noch weniger Untersuchungen, in denen APPs als Verlaufskontrollen zur Überprüfung des Therapieerfolges bei der Katze bestimmt wurden. Viele Erkrankungen, welche in der feline Medizin von großem wissenschaftlichem und klinischem Interesse sind, wurden bisher nur marginal erforscht und standen nie im Fokus einer Studie. Dazu gehören die obstruktive Form der FLUTD und DM, inklusive der DKA. In der vorliegenden prospektiven klinischen Studie wurden daher APP-Profile bestehend aus AGP, SAA und Hp als Verlaufsmessungen bei an obstruktiver FLUTD und an DM erkrankten Katzen gemessen und ihre Rolle als Biomarker hinsichtlich Diagnostik und Monitoring evaluiert.

6.2.1 Referenzintervalle

Grundlegend für die Interpretation der APP-Konzentrationen bei erkrankten Tieren ist die Kenntnis über physiologische Konzentrationen bei gesunden Individuen und die Etablierung von Referenzintervallen. Laut ASVCP sind Gruppengrößen ab 40 Tieren hierfür optimal. Mindestens müssen jedoch 20 Tiere zur Berechnung von Referenzbereichen zur Verfügung stehen (Friedrichs et al., 2012). Diese Mindestvoraussetzung wurde in der vorliegenden Studie durch Einbeziehung von 27 gesunden Katzen erfüllt. Leider konnte keine höhere Anzahl erzielt werden. Da die Unsicherheit der Schätzung der Referenzlimits mit kleineren Gruppengrößen steigt, müssen Fehlerquellen auf präanalytischer, analytischer und postanalytischer Ebene vermieden bzw. minimiert werden. Zur Optimierung der präanalytischen Bedingungen wurden zum einen nur sorgfältig ausgewählte Katzen auf Grundlage strenger Einschlusskriterien aufgenommen. Zum anderen wurden lipämische oder hämolytische Seren von der Messung ausgeschlossen. Zur analytischen Fehlervermeidung wurden nur objektiv validierte Assays mit guter Präzision und Richtigkeit zur Messung verwendet. Zudem erfolgte die Testdurchführung durch dieselbe Person. Auf postanalytischer Ebene wurden die Referenzintervalle über die robuste Methode nach CLSI C28-A3 für nicht normalverteilte Daten errechnet und alle weiteren Empfehlungen der ASVCP für kleine Gruppen eingehalten (Friedrichs et al., 2012). Trotz dieser Maßnahmen sollten die Referenzintervalle unter Berücksichtigung der limitierten Anzahl an Katzen interpretiert und durch zusätzliche Messungen bei gesunden Katzen erweitert werden.

In dieser Arbeit wurde für AGP und SAA je ein einseitiges Referenzintervall berechnet. Dies ist zum einen auf dem Ablauf der APR begründet, welche lediglich mit einem Anstieg der positiven APPs einhergeht. Zum anderen sind bisher für die Katze wie auch für andere Haus-

tiere keine Erkrankungen beschrieben, welche einen Abfall der AGP- und SAA-Konzentration zur Folge haben. In anderen veterinär- und humanmedizinischen Arbeiten wurden folglich ebenfalls für positive APPs einseitige Referenzintervalle ermittelt (z.B. für kanines CRP in der Studie von Klenner et al., 2010). Für die Katze existieren nur 2 Untersuchungen, in denen Referenzbereiche für APPs berechnet worden. Tamamoto und sein Team ermittelten von 26 Katzen einen einseitigen Referenzbereich für SAA (Tamamoto et al., 2008). Duthie und Kollegen errechneten aus Konzentrationen von 40 Katzen zweiseitige Referenzintervalle für AGP und Hp (Duthie et al., 1997). Warum ein unteres Referenzlimit für AGP ermittelt wurde, wurde von den Autoren nicht begründet und ist nach aktuellem Kenntnisstand nicht angezeigt. Im Gegensatz zu AGP und SAA ist für Hp die Erstellung eines zweiseitigen Referenzbereiches indiziert. Dessen Plasmakonzentration sinkt während einer intravaskulären Hämolyse, da es durch Bindung mit Hb vom retikuloendothelialen System eliminiert wird (Harvey und Gaskin, 1978; Ascenzi et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit war die Berechnung eines unteren Referenzlimits eines zweiseitigen Referenzintervalls jedoch aufgrund der analytischen Sensitivität des ELISAs nicht möglich. Bei 12 von 27 gesunden Katzen wurde eine Konzentration unterhalb der unteren Nachweisgrenze von 0,19 mg/ml im ELISA gemessen. In der Studie von Duthie et al. (1997) konnte ein unteres Referenzlimit für Hp von 0,04 mg/ml ermittelt werden. Die Messung erfolgte mit einem nicht kommerziell erhältlichen spektrophotometrischen Assay. Eine untere Nachweisgrenze des Tests wurde jedoch nicht angegeben.

Der Vergleich der Konzentrationen von gesunden Katzen gemessen in dieser Arbeit mit denen aus anderen Studien zeigt einerseits vergleichbare Werte, aber auch deutliche Unterschiede auf (*Anhang I*). Ein Beispiel für ähnliche Konzentrationen sind die AGP-Werte von Correa et al. (Konzentrationsspanne in dieser Arbeit: < 100 – 440 µg/ml; Correa et al., 2001: 100 – 440 µg/ml, $n = 25$ Katzen). In den anderen Studien sind die AGP-Konzentrationen jedoch höher als die hier gemessenen. Ein Beispiel dafür sind die oberen Referenzlimits für AGP (in dieser Arbeit: 380,2 µg/ml; Duthie et al., 1997: 480 µg/ml, $n = 40$ Katzen). Auch für Hp gibt es zwar vergleichbare Werte (z.B. Mittelwert \pm SD in dieser Arbeit: 0,69 \pm 0,74 mg/ml; Kajikawa et al., 1999: 0,42 \pm 0,37 mg/ml, $n = 20$ Katzen), jedoch sind die hier gemessenen Konzentrationen tendenziell niedriger als die Konzentrationen anderer Studien (z.B. oberes Referenzlimit in dieser Arbeit: 2,05 mg/ml; Duthie et al., 1997: 3,84 mg/ml). Die in dieser Arbeit gemessenen SAA-Konzentrationen sind sowohl höher (z.B. oberes Referenzlimit in dieser Arbeit: 8,3 µg/ml; Tamamoto et al., 2008: 0,82 µg/ml, $n = 26$ Katzen) als auch niedriger als in anderen Studien (z.B. Mittelwert \pm SD in dieser Arbeit: 2,8 \pm 3,7 µg/ml; Giordano et al., 2004: 10,21 \pm 8,32 µg/ml, $n = 24$ Katzen). Die teilweise hochgradigen Konzentrationsunterschiede sind einerseits erklärbar durch verschiedene Messsysteme und damit unterschiedliche analytische Sensitivitäten und Spezifitäten. Beispielsweise wurde in der Studie von Tamamoto et al. (2008) ein TIA für humanes SAA verwendet im Gegensatz zu multispezies-spezifischen ELISAs in den restlichen

Studien. Andererseits sind die verschiedenen Konzentrationsbereiche durch unterschiedlich strenge Einschlusskriterien zur Klassifikation von gesunden Katzen verursacht. Zum Beispiel erhielten die Katzen in der Studie von Giordano und Kollegen (2004) keine Blutuntersuchungen zum Ausschluss einer subklinischen Erkrankung. Die Mehrheit der selektierten gesunden Katzen stammte zudem aus einem Mehrkatzenhaushalt.

Alles in allem entsprechen die hier gemessenen oberen Referenzlimits und Konzentrationen der gesunden Katzen den Konzentrationen aus anderen Studien, welche ebenfalls vergleichsweise niedrigere Konzentrationen ermittelt hatten. Ein exakter Vergleich ist jedoch nicht möglich, da es keine Studie mit den gleichen Assays des gleichen Herstellers und mit übereinstimmenden Einschlusskriterien gibt. Dieser „Dschungel“ an Konzentrationen bei gesunden Katzen verdeutlicht erstens die Notwendigkeit von internationalen Referenzpräparaten zur Standardisierung und Harmonisierung der APP-Messungen. Zweitens hebt es den Bedarf an größeren Populationen zur Etablierung von Referenzintervallen hervor.

6.2.2 Signalement

Die Untersuchung auf Konzentrationsunterschiede zwischen den Geschlechtern ergab für AGP, dass die gesunden weiblichen Tiere signifikant höhere Konzentrationen aufwiesen als die männlichen. Das Ergebnis muss mit Vorsicht interpretiert werden, da die Gruppengrößen sehr klein waren (weibliche Tiere, $n = 13$; männliche Tiere, $n = 14$) und da laut ASVCP nur Untergruppen untersucht werden sollten, wenn diese aus mindestens 40 Tieren bestehen oder wenn es zwingende Gründe für diese Unterteilung gibt (Friedrichs et al., 2012). Es war nicht Ziel dieser Untersuchung eine allgemeingültige Schlussfolgerung zum Geschlechtereinfluss aufzustellen, sondern primär eine These von Kann et al. (2012) zu untersuchen. In dieser Studie wurde herausgefunden, dass SAA-Konzentrationen bei weiblichen Katzen signifikant höher wären. Da die Voraussetzung einer Mindestgruppengröße in dieser Studie ($n = 34$ gesunde Katzen) ebenfalls nicht erfüllt wurde, sind die Schlussfolgerungen folglich unter Berücksichtigung dieser Limitation zu interpretieren. In der vorliegenden Arbeit gab es keinen signifikanten SAA-Konzentrationsunterschied zwischen den Geschlechtern. Auch Kajikawa et al. (1999) konnte keinen signifikanten Konzentrationsunterschied für SAA zwischen weiblichen und männlichen Tieren bei 20 Katzen feststellen. Der in dieser Arbeit festgestellte Konzentrationsunterschied für AGP wird wiederum nicht durch die Studie von Kann et al. (2012) bestätigt. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse und aufgrund der geringen Studienpopulationen kann ein Geschlechtereinfluss auf die APP-Konzentrationen weder bestätigt noch ausgeschlossen werden und bleibt weiterhin Gegenstand zukünftiger Forschung. Beim Hund konnte zumindest kein Geschlechtereinfluss auf die CRP- und AGP-Konzentrationen festgestellt werden (Yamamoto et al., 1994b; Kuribayashi et al., 2003a; Kuribayashi et al., 2003b; Klenner et al., 2010).

Falls die Konzentrationen von SAA oder AGP bei weiblichen Katzen höher wären als bei männlichen Tieren, würde dies die Ergebnisse beeinflussen? Nur in der Gruppe DM_{kompliziert} waren signifikant mehr Katzen weiblichen Geschlechts vertreten. Die AGP- und SAA-Werte dieser Gruppe waren signifikant höher als die der gesunden Katzen. Dieses Ergebnis könnte somit durch einen Geschlechtereinfluss verzerrt sein. Der Konzentrationsunterschied zwischen den Gruppen „gesund“ und „DM_{kompliziert}“ ist jedoch sehr groß, wohingegen ein möglicher Konzentrationsunterschied zwischen weiblichen und männlichen Tieren wesentlich geringer wäre. Daher ist zu schlussfolgern, dass der signifikante Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Gruppen nicht ausschließlich durch die unterschiedliche Geschlechterverteilung zwischen den Gruppen erklärt werden kann und dass er mit hoher Wahrscheinlichkeit weiterhin signifikant wäre bei einer dem Geschlechterverhältnis angepassten Kontrollgruppe. In der Studie von Kann et al. (2012) wurde weiterhin herausgefunden, dass ältere Katzen höhere Konzentrationen von SAA aufwiesen. Die Autoren erklärten diesen Zusammenhang mit einer höheren Inzidenz an subklinischen Erkrankungen bei älteren Tieren, die zu einer Induktion der APR führten. Die in dieser Studie eingeschlossenen gesunden Katzen wurden aufgrund einer unauffälligen Anamnese und klinischen Allgemeinuntersuchung aufgenommen. Sie erhielten keine Blutuntersuchung. Daher wäre zu diskutieren, ob ältere Katzen, bei denen subklinische Erkrankungen nicht ausgeschlossen werden können und sie als Ursache einer erhöhten APP-Konzentration interpretiert werden, als gesund klassifiziert werden können. Die Einschlusskriterien spiegeln sich auch in den vergleichsweise hohen APP-Konzentrationen der gesunden Katzen wider. Für felines AGP wurde in einer anderen Studie keine altersabhängige Konzentrationsveränderung festgestellt (Selting et al., 2000). Untersuchungen beim Hund konnten ebenfalls keine altersbedingten Konzentrationsunterschiede für CRP nachweisen (Yamamoto et al., 1994b; Kuribayashi et al., 2003a). In der vorliegenden Arbeit konnte diese Fragestellung aufgrund der geringen Anzahl an Katzen nicht untersucht werden. Falls es eine altersabhängige Konzentrationserhöhung für SAA bei Katzen gäbe, hätte dies jedoch kaum Einfluss auf die Studienergebnisse. Die Katzen der Gruppe DM_{kompliziert} waren signifikant älter als die gesunden Katzen. Der SAA-Konzentrationsunterschied ist jedoch sehr groß, sodass er nicht nur durch den Altersunterschied zwischen den Gruppen erklärt werden kann und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch bei einer dem Alter angepassten Kontrollgruppe weiterhin signifikant wäre.

In der vorliegenden Arbeit sind 9 Rassen vertreten, wobei EKH in allen Gruppen die häufigste darstellt. Rasseabhängige Konzentrationsunterschiede konnten aufgrund der Vielzahl an Rassen und der kleinen Studienpopulation nicht untersucht werden. Bisher wurden in anderen Studien keine rassespezifischen Konzentrationsunterschiede für APPs für die hier vertretenen Rassen beschrieben. Nach aktuellem Kenntnisstand sind die Ergebnisse dieser Studie daher nicht durch rasseabhängige Konzentrationsunterschiede der APPs bedingt oder beeinflusst.

6.2.3 Obstruktive FLUTD

Der Komplex der unteren Harnwegserkrankungen bei der Katze ist Gegenstand aktueller Forschungen und aufgrund der steigenden Prävalenz von großem klinischem Interesse (Buffington et al., 2014). Die vorliegende Arbeit stellt die bisher erste Studie dar, welche AGP und Hp bei an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen untersucht und welche neben der diagnostischen Bedeutung die APPs (inklusive SAA) hinsichtlich ihrer Rolle als Biomarker zum Monitoring erforscht.

6.2.3.1 Diagnostische Bedeutung

Bisher wurde SAA nur marginal in 2 Studien bei an FLUTD erkrankten Katzen mit jedoch unterschiedlichen Ergebnissen untersucht (Sasaki et al., 2003; Tamamoto et al., 2013). Die Konzentrationen dieser 2 Studien sind begrenzt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar, da erstens in dieser Arbeit nur an obstruktiver FLUTD erkrankte Katzen untersucht wurden und da zweitens die Messmethoden verschieden sind. Bei Sasaki et al. (2003) wurden SAA-Konzentrationen bei 27 an FLUTD erkrankten Katzen mithilfe eines nicht kommerziell erhältlichen ELISAs untersucht. Es wurde nicht näher beschrieben, zu welchem Zeitpunkt die Proben entnommen wurden und ob und wieviel Katzen an einem Harnröhrenverschluss erkrankt waren. Die bei Sasaki et al. gemessenen Konzentrationen sind geringgradig höher als die Konzentrationen der Gruppe FLUTD_{kompliziert} (Mittelwert \pm SD in dieser Arbeit: $22,7 \pm 29,2$ $\mu\text{g/ml}$, Sasaki et al., 2003: $27,99 \pm 62,59$ $\mu\text{g/ml}$). Sie waren signifikant höher als die der gesunden Katzen. In der Studie von Tamamoto und Kollegen (2013) wurden SAA-Konzentrationen bei 7 Katzen mit Zystitis am Tag der Erstvorstellung untersucht. Die Messung erfolgte durch einen zuvor validierten TIA für humanes SAA. Nur bei einer Katze wurde eine erhöhte SAA-Konzentration ($> 0,82$ $\mu\text{g/ml}$) festgestellt. Diese unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den beiden Studien verdeutlichen, dass FLUTD einen heterogenen Krankheitskomplex darstellt, der sowohl eine schwache als auch eine intensive APR verursachen kann.

Die obstruktive Form der FLUTD kann mit einer bisweilen starken Immunantwort des Körpers einhergehen, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen. Die statistisch signifikantesten Konzentrationsanstiege der Gruppe FLUTD_{unkompliziert} und FLUTD_{kompliziert} im Vergleich zu den gesunden Katzen am Tag der Erstvorstellung wurden für SAA nachgewiesen. Dies ist vermutlich durch die Kinetik des Proteins begründbar. Nach einer experimentell induzierten Entzündung bei Katzen wurde für SAA der schnellste Konzentrationsanstieg festgestellt (Kajikawa et al., 1999). SAA scheint demzufolge ein sehr sensitiver Marker der durch eine obstruktive FLUTD ausgelösten APR zu sein, jedoch unabhängig vom folgenden klinischen Verlauf. Die gemessenen AGP-Konzentrationen der Gruppen FLUTD_{unkompliziert} und FLUTD_{kompliziert} waren signifikant resp. sehr signifikant erhöht gegenüber den gesunden Katzen.

Für Hp konnte ein sehr signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den gesunden Katzen und denen der Gruppe FLUTD_{kompliziert} nachgewiesen werden. Trotzdem zeigten die Konzentrationen der 3 APPs eine starke Streuung innerhalb der Gruppen mit Werten im Referenzintervall. Der SAA-Median der Gruppe FLUTD_{unkompliziert} war sogar geringgradig höher als der der Gruppe FLUTD_{kompliziert}. Diese niedrigen Werte können entweder erklärt werden durch eine lediglich schwach verlaufende APR, z.B. bei einer lokalen Entzündung, oder durch einen zu frühen Zeitpunkt der Probenentnahme noch vor Anstieg des APPs. Die APP-Konzentrationen (bis auf SAA-Median) der Gruppe FLUTD_{kompliziert} am Tag 0 waren trotzdem tendenziell höher als die der Gruppe FLUTD_{unkompliziert}. Dies kann verursacht sein durch eine schwerwiegendere Entzündungsreaktion der unteren Harnwege, durch eine weitere lokale oder durch eine systemische Entzündung bei den Katzen der Gruppe FLUTD_{kompliziert}, was im weiteren Verlauf zu Komplikationen geführt haben kann. Jedoch konnte bei keinem APP ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen FLUTD_{unkompliziert} und FLUTD_{kompliziert} nachgewiesen werden. Hp war das einzige APP, dessen Konzentration zwischen den gesunden Katzen und denen der Gruppe FLUTD_{unkompliziert} nicht signifikant verschieden war. Es weist die höchste diagnostische Sensitivität mit 66,7% und Spezifität mit 71,4% hinsichtlich der Diagnose einer komplizierten obstruktiven FLUTD auf. War Hp bei einer an obstruktiver FLUTD erkrankten Katze über das hier ermittelte obere Referenzlimit von 2,05 mg/ml erhöht, dann konnten ca. 2 von 3 Katzen richtig als FLUTD_{kompliziert} klassifiziert werden. War Hp in solchen Fällen nicht erhöht, so konnten rund 3/4 der an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen korrekt als FLUTD_{unkompliziert} diagnostiziert werden. Für AGP konnte die gleiche diagnostische Spezifität, jedoch eine geringere Sensitivität und für SAA die gleiche diagnostische Sensitivität bei niedrigerer Spezifität nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Anzahl an erkrankten Katzen sind diese Parameter unter Berücksichtigung der Konfidenzintervalle und unter Vorbehalt zu interpretieren. Die großen Konzentrationsspannen der Konfidenzintervalle verdeutlichen, dass weitere Studien mit einer größeren Anzahl an Katzen benötigt werden, um sichere Aussagen zu Spezifität und Sensitivität treffen und um Cut-Off-Werte erstellen zu können.

Trotz der Limitation der geringen Studienpopulation kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass Hp als moAPP großes Potential als diagnostischer Marker einer FLUTD_{kompliziert} bei an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen am Tag der Erstvorstellung hat. Eine mögliche Erklärung dafür stellt die unterschiedliche Kinetik der APPs dar. Bei Katzen erfolgte ein deutlicher Hp-Konzentrationsanstieg durch eine experimentell induzierte Entzündung später als SAA (Hp nach 24 Stunden, SAA nach 8 Stunden) und die Hp-Konzentrationen waren im Gegensatz zum AGP und zum SAA 11 Tage nach der Entzündung noch ca. auf das Doppelte der Ausgangskonzentration erhöht (Kajikawa et al., 1999). Dies ist vermutlich durch längere Halbwertszeiten des Hp verursacht, welche jedoch nicht für die Katze untersucht

wurden. Beim Menschen sind Halbwertszeiten von Hp von 4 – 5 Tagen beschrieben (Moretti et al., 1963). Für humanes SAA wurden Halbwertszeiten von 0,5 – 9 Stunden und für humanes AGP von 3 Tagen angegeben (Brée et al., 1986; Rosenthal et al., 1986). Eine erhöhte Hp-Konzentration am Tag der Erstvorstellung kann daher eine Noxe widerspiegeln, die schon vor mehr als 10 Tagen vor Blutentnahme eintrat. Dies kann eine lokale Ursache, beispielsweise eine zunächst nur partielle Obstruktion, als auch eine systemische Erkrankung sein. Die Folgen einer länger bestehenden lokalen Schleimhautreizung, wie beispielsweise Schleimhautschwellung und Muskelspasmen, können zu Komplikationen während der Therapie führen (Osborne et al., 2011). Als Teil eines systemischen Krankheitskomplexes werden chronisch-rezidivierende Formen der FLUTD verstanden, bei denen Erkrankungen anderer Organe nicht als Folge der FLUTD, sondern als Begleiterkrankung auftreten (Buffington et al., 2014). Begleiterkrankungen sind z.B. kardiovaskuläre, gastrointestinale Erkrankungen oder Verhaltensprobleme. Bei Katze 10 kann beispielsweise retrospektiv eine systemische anstatt einer lokalen Erkrankung schon am Tag der Erstvorstellung vermutet werden. Bei ihr wurden am Tag 0 hochgradig erhöhte Konzentrationen von AGP, SAA und Hp gemessen. Während der stationären Betreuung wurde u.a. eine Pankreatitis diagnostiziert. Es kann spekuliert werden, dass die Pankreatitis schon am Tag der Erstvorstellung eine Begleiterkrankung der FLUTD war und weniger die Folge des Erkrankungsprozesses.

Zusammenfassend formuliert führte die obstruktive FLUTD zu einer meist gering- bis mittelgradigen Konzentrationserhöhung von AGP, SAA und Hp am Tag der Erstvorstellung. Die stärksten Konzentrationsanstiege in beiden Gruppen wurden für SAA nachgewiesen. Bei Katzen mit einer komplizierten Verlaufsform der FLUTD wurden am Tag der Erstvorstellung tendenziell höhere Konzentrationen als bei Katzen mit einer raschen klinischen Besserung nachgewiesen. Es konnte jedoch kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden. Hp scheint unter Berücksichtigung der kleinen Studienpopulation ein besserer diagnostischer Biomarker zur Detektion der komplizierten Verlaufsform bei an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen zu sein als AGP und SAA. Hochgradige Konzentrationserhöhungen können zudem Hinweis auf weitere Begleiterkrankungen geben, welche häufig bei chronisch-rezidivierenden Harnwegserkrankungen vorkommen. Eine einmalige Messung der APPs ist jedoch nicht ausreichend, um am Tag der Erstvorstellung Katzen der Gruppe FLUTD_{unkompliziert} von Katzen der Gruppe FLUTD_{kompliziert} eindeutig zu diskriminieren.

6.2.3.2 Bedeutung hinsichtlich Monitoring

Zur Untersuchung der Bedeutung der APPs hinsichtlich Monitoring wurden Verlaufsmessungen durchgeführt. Im Gegensatz zu den Einzelmessungen konnte bei den Verlaufsmessungen ein signifikanter Unterschied zwischen den Katzen der Gruppe FLUTD_{unkompliziert}

und den Katzen der Gruppe FLUTD_{kompliziert} nachgewiesen werden. Die AGP-Konzentrationen bei FLUTD_{kompliziert} waren im Vergleich zu FLUTD_{unkompliziert} am Tag der jeweiligen Probenentnahme signifikant zum Tag der Erstvorstellung angestiegen. Für SAA und für Hp konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Konzentrationsverlauf festgestellt werden. Für SAA ist dies durch die heterogenen Konzentrationsverläufe innerhalb der Gruppe FLUTD_{kompliziert} mit zeitgleichen hochgradigen Abfällen und Anstiegen bedingt, welche im verallgemeinerten linearen Modell zusammengefasst werden. Der Hp-Verlauf der Gruppe FLUTD_{kompliziert} ist ähnlich dem AGP-Verlauf dieser Gruppe. Aufgrund der unterschiedlichen Kinetik zwischen maAPP und moAPP sind jedoch die Konzentrationsanstiege und -abfälle weniger ausgeprägt bei Hp, weshalb im verallgemeinerten linearen Modell kein signifikanter Unterschied zwischen den Hp-Verläufen der beiden Gruppe festgestellt werden konnte.

Die deskriptive Beschreibung der Verlaufsmessungen ermöglicht eine detailliertere Auswertung im Hinblick auf die Übereinstimmung der klinischen Entwicklung der Patienten und der APP-Konzentrationsverläufe. Bisher wurde in nur 2 weiteren Studien die Korrelation zwischen Verlaufsmessungen von APPs und der klinischen Verbesserung bei Katzen untersucht (Tamamoto et al., 2009; Gil et al., 2014), wobei in der Studie von Gil et al. (2014) die APR von an FIV erkrankten Katzen unter immunmodulierender Therapie beschrieben wurde. Das Studiendesign und die Ergebnisse sind daher kaum mit denen der hier vorliegenden Arbeit vergleichbar. Bei Tamamoto und seinem Team (2009) wurde nachgewiesen, dass SAA einen guten Biomarker zur Überwachung des Therapieerfolgs bei einer an Pankreatitis erkrankten Katze darstellt. In einer Studie beim Hund wurde gezeigt, dass CRP als Indikator hinsichtlich Diagnostik und Monitoring bei experimentell induzierten bakteriellen Zystitiden verwendet werden kann (Seo et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde in Gruppe FLUTD_{unkompliziert} nur bei einer Katze (Katze 5) ein gemeinsamer Konzentrationsabfall der 3 APPs verzeichnet. Bei den anderen 6 Katzen dieser Gruppe wurde trotz klinischer Besserung ein geringgradiger Anstieg der Konzentration von mindestens einem APP gemessen, v.a. für AGP. Dies kann zum einen verursacht sein durch die Latenzzeit von der Induktion der APR bis zum messbaren Anstieg im Plasma (Kjelgaard-Hansen und Jacobsen, 2011). Zum anderen können auch Stress und operative Eingriffe zum Konzentrationsanstieg der APPs geführt haben (Sasaki et al., 2003; Moldal et al., 2012; Fazio et al., 2015). Stress kann z.B. durch die stationäre Betreuung verursacht worden sein. Bei den Katzen der Gruppe FLUTD_{kompliziert} wurde bei 5 der 9 Katzen (Katze 9 – 13) eine Übereinstimmung der Konzentrationsverläufe aller 3 APPs mit der klinischen Entwicklung nachgewiesen. Die zum Teil hochgradigen Konzentrationsanstiege gingen zeitlich mit dem Einsetzen oder der Verschlechterung der klinischen Symptome einher. So wurde beispielsweise ein Konzentrationsanstieg bei Katze 10 nachgewiesen, als sie nach Entlassung wieder vorstellig wurde wegen Inappetenz. Bei 3 der 9 Katzen (Katze 8, 15 und 16) wurde

zwar eine Konzentrationserhöhung von AGP und Hp, jedoch auch ein Abfall von SAA trotz Komplikationen detektiert. Es verdeutlicht, dass SAA aufgrund seiner Kinetik zwar einerseits schnell einen Therapieerfolg und ein Scheitern anzeigen kann, dass aber andererseits die anderen beiden Proteine zum Monitoring einbezogen werden sollten. Bei Katze 14 korrelierte der Konzentrationsabfall aller 3 APPs nicht mit dem klinischen Verlauf. Sie verstarb perakut, sodass womöglich ein Konzentrationsanstieg im Blut aufgrund der Latenzzeit noch nicht detektiert werden konnte.

Von den 7 überlebenden Katzen erhielten alle eine perineale Urethrostomie, wohingegen nur 4 Katzen der Gruppe FLUTD_{unkompliziert} operiert wurden. Daher könnte argumentiert werden, dass die stärkeren Konzentrationsanstiege bei FLUTD_{kompliziert} durch die häufigeren chirurgischen Eingriffe erklärbar sind. Jedoch sind in der Literatur nur geringgradige SAA-Konzentrationsanstiege bei Operationen, wie einer Kastration, beschrieben (Sasaki et al., 2003; Moldal et al., 2012). Zudem zeigte von den 4 Katzen der Gruppe FLUTD_{unkompliziert}, welche eine perineale Urethrostomie erhielten, nur 1 Katze (Katze 4) einen Anstieg aller 3 APPs. Daher können zwar die stärkeren Konzentrationsanstiege von FLUTD_{kompliziert} teilweise bedingt sein durch die häufigeren operativen Eingriffe, aber sie können vermutlich nicht ausschließlich darüber begründet werden.

Die stärksten Konzentrationsanstiege der Gruppe FLUTD_{kompliziert} wurden bei den Katzen detektiert, welche auch an einer Pankreatitis erkrankt waren. Eine hochgradige Konzentrationserhöhung kann daher ein Hinweis auf weitere Erkrankungen neben der obstruktiven FLUTD sein. Ferner ist bei genauer Betrachtung der Daten erkennbar, dass der Konzentrationsverlauf zwischen den APPs nicht immer korreliert, beispielsweise wenn die Konzentration von AGP angestiegen und SAA dahingegen abgefallen ist. Für Erklärungen zur Korrelation siehe Kapitel 6.2.5. Daher entspricht z.B. bei Katze 1 der SAA-Verlauf und bei Katze 8 der AGP-Verlauf eher der klinischen Entwicklung. Aus den Ergebnissen der Verlaufsmessungen kann jedoch nicht geschlussfolgert werden, dass ein APP besser zum Monitoring geeignet ist als ein anderes. Sie bestätigen vielmehr die Empfehlung anderer Autoren (Eckersall, 2004; Ceron et al., 2008) zur Messung von APP-Profilen bestehend aus mindestens einem maAPP und einem moAPP. Jedes APP spiegelt aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften in Schnelle und Höhe des Konzentrationsanstiegs bzw. -abfalls und durch eventuell verschiedene Sensitivitäten auf Stimuli eine eigene Information zur ablaufenden APR wider. Gemeinsam stellen sie daher am besten den Entzündungsprozess dar. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Verlaufsmessungen, dass AGP, SAA und Hp als Biomarker zum Monitoring und zur Überprüfung des Therapieerfolgs bei an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen Anwendung finden können unter Einbeziehung von mindestens 2 APPs in die Messungen und unter Berücksichtigung von 2 Limitationen: (1) die Latenzzeiten vom Einsetzen der APR bis zum detektierbaren Anstieg der APPs; (2) die unspezifische

Induzierbarkeit der APR. Ein gemeinsamer Konzentrationsabfall bzw. -anstieg kann frühzeitig ein Ansprechen bzw. ein Scheitern der Therapie widerspiegeln. Jedoch können geringgradige Konzentrationsanstiege auch beispielsweise durch Stress oder operative Eingriffe verursacht sein und müssen nicht zwangsläufig ein Scheitern der Therapie widerspiegeln. Auf der anderen Seite gehen hochgradige APP-Konzentrationserhöhungen mit einer klinischen Verschlechterung einher, welche zudem hinweisend auf zusätzliche Entzündungsprozesse im Körper sein können.

6.2.4 Feliner Diabetes mellitus

Feliner Diabetes mellitus ist wie FLUTD eine Erkrankung mit steigender Prävalenz in den letzten Jahren. Die Therapie schließt eine regelmäßige Kontrolle von Blutparametern bei den erkrankten Katzen ein, da es zu einer Vielzahl an Komplikationen kommen kann. Zu diesen zählt die DKA, welche eine akute, lebensbedrohliche Entgleisung des Stoffwechsels darstellt (Reusch, 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden AGP, SAA und Hp bei an DM, inkl. DKA, erkrankten Katzen untersucht. Damit stellt sie die erste Untersuchung von AGP und Hp bei diabetischen Katzen dar. Weiterhin ist es die erste Studie, in der Verlaufsmessungen der APPs (inklusive SAA) bei dieser Krankheit durchgeführt wurden.

6.2.4.1 Diagnostische Bedeutung

In denselben Untersuchungen, in denen auch schon SAA bei an FLUTD erkrankten Katzen gemessen wurde, erfolgte der Nachweis dieses APPs bei diabetischen Katzen. Wie schon beschrieben sind die Ergebnisse nur begrenzt mit denen in der vorliegenden Arbeit ermittelten vergleichbar. Bei Sasaki et al. (2003) wurde im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Konzentrationsunterschied zu den gesunden Katzen festgestellt. Die mit einem nicht kommerziell erhältlichen ELISA gemessenen Werte der 6 diabetischen Katzen bei Sasaki et al. sind höher als die Werte der Gruppe DM_{unkompliziert} (Mittelwert \pm SD in dieser Arbeit: $5,4 \pm 5,7 \mu\text{g/ml}$, Sasaki et al., 2003: $7,85 \pm 4,37 \mu\text{g/ml}$). Bei Tamamoto et al. (2008 und 2013) wurden 8 bzw. 7 diabetische Katzen untersucht. Von diesen wurde bei 3 bzw. 2 Katzen eine zum Teil deutlich erhöhte SAA-Konzentration nachgewiesen. Auch wenn kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den diabetischen Katzen und den gesunden Katzen festgestellt werden konnte, so war das gemessene Konzentrationsmaximum vergleichsweise höher als das bei Sasaki et al. (2003) ermittelte. In den 2 Studien und in der vorliegenden Arbeit ist die Anzahl der diabetischen Katzen sehr gering. Daher müssen alle Ergebnisse unter Einbeziehung dieser Limitation interpretiert und diskutiert werden. Zudem wurden in den Studien von Sasaki et al. (2003) und von Tamamoto et al. (2008 und 2013) die diabetischen

Katzen hinsichtlich weiterer Untersuchungsergebnisse und der Therapie nicht näher beschrieben. Demzufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Katzen mit chronischen Komplikationen eines DM oder gegebenenfalls weiteren Erkrankungen eingeschlossen wurden, was wiederum die unterschiedlichen Studienergebnisse erklären könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass die Diagnose DM nicht ausreichend ist, um die APP-Konzentrationen zu interpretieren. Der Einschluss der 4 diabetischen Katzen in die Gruppe DM_{unkompliziert} erfolgte nicht anhand des Ausschlusses weiterer Erkrankungen und/oder Komplikationen eines DM, sondern lediglich anhand des Ausschlusses einer DKA oder möglichen Vorstufen einer DKA (mittel- bis hochgradige Ketose oder schlechtes Allgemeinbefinden bei β -HB > 0). Bei den 4 Patienten wurden zusätzliche Krankheiten diagnostiziert und 3 der 4 Patienten waren hinsichtlich der Insulin-Therapie nicht gut eingestellt. Wünschenswert für diese Gruppe wären Katzen gewesen, welche an keinen weiteren Krankheiten erkrankt und hinsichtlich der Insulin-Therapie gut eingestellt gewesen wären. Dass keine der 4 Katzen diese Idealkriterien erfüllte, ist vermutlich erklärbar durch den hohen Anteil der an der Kleintierklinik vorgestellten und überwiesenen Katzen mit einem schwer einstellbaren DM („brittle diabetes“) oder mit weiteren Erkrankungen. Die in der Gruppe DM_{unkompliziert} gemessenen hohen APP-Konzentrationen müssen daher unter Einbeziehung der weiteren Erkrankungen interpretiert werden.

Bei der ersten Probe im Untersuchungszeitraum der Gruppe DM_{unkompliziert} wurden für AGP und für SAA keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zu den gesunden Katzen festgestellt. Trotz einer großen Konzentrationsspanne waren die zentralen Tendenzen von AGP deutlich höher als die der gesunden Katzen, wohingegen die SAA-Konzentrationen vergleichbar mit denen der gesunden Katzen waren. Für Hp wurde im Gegensatz zu AGP und SAA ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Katzen der Gruppe DM_{unkompliziert} und den gesunden Katzen nachgewiesen. Die erhöhten AGP- und Hp-Konzentrationen der Gruppe DM_{unkompliziert} können durch die beschriebenen Vorerkrankungen der Katzen erklärt werden. Die Hp-Konzentrationen waren jedoch vergleichsweise höher angestiegen als die AGP-Konzentrationen, was sich in dem signifikanten Konzentrationsunterschied des Hp widerspiegelt. Eine mögliche Begründung wäre, dass Hp auch bei chronischen Erkrankungen, wie dem DM, im Gegensatz zu AGP und SAA erhöht sein kann, was u.a. durch die schon beschriebenen unterschiedlichen Halbwertszeiten begründet werden könnte. Dies würde sich zudem mit den Ergebnissen der an FLUTD erkrankten Katzen decken, da sich Hp hier als scheinbar bester diagnostischer Marker für die Katzen der Gruppe FLUTD_{kompliziert} dargestellt hat, bei welchen zumindest teilweise eine chronische Harnwegserkrankung vermutet werden kann. Eine andere Erklärung wäre, dass Hp neben der Leber auch von anderen Organen oder Geweben synthetisiert wird. In humanmedizinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Hp von Adipozyten exprimiert wird, was wiederum bei Adipositas, einem Risikofaktor für

DM vom Typ-2, verstärkt ist (Chiellini et al., 2002). Zukünftige Studien sind notwendig, um solche Hypothesen für das feline Hp zu untersuchen. SAA war lediglich bei einer Katze geringgradig erhöht, welche im Untersuchungszeitraum an einer anderen Erkrankung verstarb. Die SAA-Konzentrationen der Gruppe DM_{unkompliziert} waren zudem niedriger als die der Gruppen FLUTD_{unkompliziert} und FLUTD_{kompliziert}. Warum die SAA-Konzentrationen im Gegensatz zu AGP und Hp trotz der beschriebenen Vorerkrankungen niedrig waren, könnte wiederum durch die unterschiedlichen Halbwertszeiten der APPs verursacht sein. Niedrige SAA-Konzentrationen bei erhöhten AGP- und/oder Hp-Konzentrationen könnten demzufolge Noxen widerspiegeln, die schon vor mehreren Tagen eingetreten waren. Dies schlussfolgerten auch Humblet et al. (2006), die erhöhte Hp-Konzentrationen bei physiologischen SAA-Werten bei Kühen nachwies.

Da die Anzahl der Katzen in der Gruppe DM_{unkompliziert} jedoch sehr gering ist, müssen die geschlussfolgerten Aussagen unter Vorbehalt getroffen werden. Es bedarf weiterer Studien mit einer größeren Anzahl an diabetischen Katzen, welche im optimalen Fall keine zusätzliche Erkrankungen haben, um definitive Schlüsse bezüglich der durch einen DM induzierten APR ziehen zu können. Aufgrund der Vorerkrankungen der Katzen kann keine Aussage getroffen werden, ob eine APR auch bei einem DM ohne weitere Erkrankungen oder Komplikationen ausgelöst wird und ob sich die APPs in diesem Fall eventuell unterschiedlich verhalten. In einer humanmedizinischen Studie konnte ein signifikanter Konzentrationsunterschied des CRPs zwischen gesunden Probanden und Diabetikern ohne DKA und ohne weiteren Erkrankungen nachgewiesen werden (Ma et al., 2012). Die Autoren schlussfolgerten, dass DM bei diesen Patienten, welche an keiner Komplikation erkrankt waren, zu einer chronischen geringgradigen APR führe. Diese Folgerung wird von weiteren aktuellen humanmedizinischen Studien bestätigt, in denen DM vom Typ-2 mit geringgradigen chronischen Entzündungen in Verbindung gebracht wird, wobei Fettgewebe als sezernierendes Organ hier eine zentrale Rolle spielt (Badawi et al., 2010).

Am Tag der Erstvorstellung waren die Konzentrationen von AGP bei den Katzen der Gruppe DM_{kompliziert} sehr signifikant erhöht gegenüber den gesunden Katzen. SAA und Hp waren sogar hoch signifikant erhöht. Die höchsten Konzentrationsanstiege wurden wie auch bei den an FLUTD erkrankten Katzen für SAA nachgewiesen. In der eben genannten humanmedizinischen Studie wurde auch ein signifikanter Konzentrationsunterschied des CRPs zwischen gesunden Probanden und Diabetikern mit einer DKA festgestellt. Zudem waren auch die CRP-Konzentrationen zwischen den Diabetikern mit und ohne DKA signifikant verschieden (Ma et al., 2012). In der vorliegenden Studie gab es jedoch keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen DM_{unkompliziert} und DM_{kompliziert}. Für SAA wurden Konzentrationen > 100 µg/ml auf 100 µg/ml festgesetzt, da auf weitere Messungen mit höher verdünnten Seren verzichtet wurde und um falsch positive Aussagen zu vermeiden. Insgesamt wurden bei 4 von

6 Katzen am Tag der Erstvorstellung SAA-Werte von $> 100 \mu\text{g/ml}$ gemessen. Trotz der Festsetzung der SAA-Werte auf $100 \mu\text{g/ml}$ war der Konzentrationsunterschied zwischen den gesunden Katzen und denen der Gruppe $\text{DM}_{\text{kompliziert}}$ für dieses Protein hoch signifikant. Zudem wurde ein p -Wert im Kruskal-Wallis-Test zwischen $\text{DM}_{\text{unkompliziert}}$ und $\text{DM}_{\text{kompliziert}}$ von 0,07 festgestellt. Daher kann vermutet werden, dass mit SAA-Werten von $> 100 \mu\text{g/ml}$ ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen diesen beiden Gruppen errechnet worden wäre. Dies wird auch in den ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten der APPs verdeutlicht. SAA hatte eine 100%ige Sensitivität und eine 75%ige Spezifität bezüglich der Diagnose einer DKA bei diabetischen Katzen. Für Hp ergab sich die gleiche Sensitivität bei einer niedrigeren Spezifität von 25%. Mit einer Sensitivität von 83,3% und einer Spezifität von 25% stellte sich AGP als vergleichsweise ungeeigneter diagnostischer Marker zum Erkennen einer DKA bei diabetischen Katzen dar. Die hohe Sensitivität und Spezifität für SAA und die niedrigeren Werte für AGP können erneut durch die schon beschriebene Kinetik der Proteine erklärt werden. Die geringe Sensitivität für AGP ergibt sich aus einer AGP-Konzentration, welche innerhalb des Referenzintervalls lag. Diese wurde bei Katze 24 gemessen, bei welcher am Tag der Diagnosestellung schon erhöhte SAA-Werte gemessen wurden. Daher ist zu vermuten, dass der niedrige AGP-Wert durch die Latenzzeit bis zum detektierbaren AGP-Anstieg im Serum zu erklären ist. Wie schon bei den an FLUTD erkrankten Katzen beschrieben, müssen aufgrund der geringen Anzahl an erkrankten Katzen diese Parameter unter Berücksichtigung der Konfidenzintervalle und unter Vorbehalt interpretiert werden. Die großen Konzentrationsspannen der Konfidenzintervalle verdeutlichen erneut, dass weitere Studien mit einer größeren Anzahl an Katzen benötigt werden.

Von allen untersuchten Gruppen in der vorliegenden Studie ($\text{FLUTD}_{\text{unkompliziert}}$, $\text{FLUTD}_{\text{kompliziert}}$, $\text{DM}_{\text{unkompliziert}}$ und $\text{DM}_{\text{kompliziert}}$) wurden die höchsten Konzentrationen für AGP, SAA und für Hp am Tag der Erstvorstellung bei den Katzen mit einer DKA gemessen. Die Folge der Stoffwechsellage während einer DKA sind Bildung von freien Radikalen und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (Hoffman et al., 2003; Wei et al., 2009). Die resultierende fulminante APR ist einer nicht-infektiösen systemischen Entzündungsreaktion („Systemic Inflammatory Response Syndrome“, SIRS) gleichzusetzen (Dalton et al., 2003). Damit stellt die bei einer DKA ausgelösten APR im Vergleich zu den anderen hier untersuchten die stärkste Immunantwort des Körpers dar.

Zusammenfassend formuliert führte ein nicht ketoazidotischer DM vermutlich aufgrund von Begleiterkrankungen und Komplikationen zu einer gering- bis mittelgradigen Konzentrationserhöhung von hauptsächlich AGP und Hp, weniger von SAA. Ob ein DM ohne weitere Komplikationen ebenfalls eine geringgradige APR verursacht, konnte nicht geklärt werden. Im Gegensatz dazu führte eine DKA am Tag der Erstvorstellung zu einem hochgradigen Konzentrationsanstieg dieser 3 APPs, welcher Ausdruck einer fulminanten APR ist. Es konnte

kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Gruppen $DM_{\text{unkompliziert}}$ und $DM_{\text{kompliziert}}$ festgestellt werden, wobei jedoch das Ergebnis für SAA vermutlich ein falsch negatives Resultat aufgrund des Studiendesigns darstellt. SAA scheint unter Berücksichtigung der kleinen Studienpopulation ein guter diagnostischer Biomarker zur Detektion einer DKA am Tag der Erstvorstellung bei diabetischen Katzen zu sein.

6.2.4.2 Bedeutung hinsichtlich Monitoring

Die APP-Verlaufsmessungen der Gruppe $DM_{\text{unkompliziert}}$ stimmten bei 3 der 4 Katzen mit der klinischen Entwicklung der Patienten überein. Für Katze 18 und 20, welche zuvor an einer DKA und an einer Pankreatitis erkrankt waren, wurden anfänglich höhere APP-Konzentrationen für AGP und Hp gemessen. Dies spiegelt vermutlich das Ende der während der hyperglykämischen Krise ablaufenden APR wider. Weder für Katze 18 noch für Katze 20 wurden erhöhte SAA-Werte gemessen, was wiederum durch die Kinetik des Proteins erklärt werden kann. Die beiden Katzen waren bei den ambulanten Kontrollen von gutem Allgemeinbefinden und hatten sich von der DKA und der Pankreatitis erholt. Katze 17 wurde in größeren Abständen vorstellig und war zu keinem Vorstellungstermin akut erkrankt. Jedoch litt sie an chronischen Krankheiten (DM und chronische Pankreatitis). Bei ihr wurden stets gering- bis mittelgradig erhöhte Hp-Konzentrationen nachgewiesen. Die AGP- und SAA-Konzentrationen lagen innerhalb des Referenzintervalls. Warum nur Hp bei dieser Katze erhöht war, konnte durch die vorliegende Arbeit nicht geklärt werden. Mögliche Erklärungen, wie erhöhte Hp-Konzentrationen bei chronischen Erkrankungen durch eine längere Halbwertszeit oder weitere Synthesorte für Hp, wurden bereits diskutiert. Bei Katze 19 stimmte der Konzentrationsverlauf nicht mit dem Outcome überein. Bei ihr wurden in der ersten Probe deutlich erhöhte Konzentrationen aller 3 APPs gemessen, welche bei der 2. Probe 12 Tage später gesunken waren. Diese Katze verstarb 4 Tage später akut Zuhause. Die Latenzzeit vom Einsetzen einer APR bis zum nachweisbaren Konzentrationsanstieg im Blut könnte daher bei einem akuten Geschehen erklären, warum der Konzentrationsverlauf nicht mit dem klinischen Ausgang übereinstimmte. Zudem könnten die anfänglich erhöhten Konzentrationen retrospektiv hinweisend sein auf eine zusätzliche Erkrankung, welche trotz Konzentrationsabfall zum Versterben der Katze führte. Diese Ergebnisse der Verlaufskontrollen der 4 nicht ketoazidotischen Katzen zeigen, dass APPs zum Monitoring hinsichtlich Begleiterkrankungen und/oder Komplikationen bei diesen Patienten verwendet werden können, jedoch müssen die beschriebenen Limitationen (Latenzzeiten, unspezifische Induzierbarkeit) der APPs auch hier beachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht untersucht, inwieweit die APPs mit den Glukose- oder Fruktosamin-Werten korrelieren. Jedoch lässt sich aus den Ergebnissen dieser 4 Katzen erkennen, dass schlecht eingestellte diabetische Katzen APP-Konzentrationen innerhalb des Referenzintervalls aufweisen können (z.B. Tagesprofile von

Katze 20) und umgekehrt (z.B. Katze 19).

Die APP-Verlaufsmessungen der Gruppe DM_{kompliziert} stimmten bei 5 der 6 Katzen mit der klinischen Entwicklung und dem Therapieerfolg überein. Katze 21, 22 und 23 konnten erfolgreich behandelt werden. Für sie wurden für AGP, SAA und Hp stetig abfallende Konzentrationen bis auf Konzentrationen im Referenzintervall gemessen. Eine Ausnahme stellt lediglich Katze 21 dar, bei welcher vom Tag der Erstvorstellung bis zur 2. Probe ein AGP-Anstieg trotz klinischer Besserung zu verzeichnen war. Der folgende abfallende AGP-Verlauf entspricht jedoch dem klinischen Bild. Der anfängliche Konzentrationsverlauf könnte erneut durch die Latenzzeit von der APR zum detektierbaren Anstieg im Serum verursacht sein. Vermutlich wurde der Konzentrationspeak für AGP 2 – 3 Tage nach Erstvorstellung erreicht. In diesem Zeitraum wurde jedoch kein Serum zur Probenmessung gewonnen. Vergleicht man den anfänglichen Hp- und den AGP-Verlauf der Katze 21 miteinander, scheint Hp schon vor AGP den Konzentrationspeak erreicht zu haben, obwohl Hp ein moAPP darstellt und die beiden Proteine zumindest einen zeitgleichen Konzentrationshöhepunkt erfahren (Kajikawa et al., 1999). Das könnte begründbar sein durch einen bereits vor Erstvorstellung erhöhten Hp-Level. Ähnlich war bei Katze 24 zu dem Zeitpunkt des Tagesprofils nur die Hp-Konzentration erhöht. Ungefähr ein Dreivierteljahr später wurde die Katze mit einer hochgradigen Ketose vorstellig. Eine Blutgasanalyse wurde aufgrund des Besitzerwunschs zur Euthanasie nicht mehr durchgeführt. Mit einer β -HB-Konzentration von 5,8 war die Katze jedoch mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an einer DKA erkrankt (Weingart et al., 2012a). Zu diesem Zeitpunkt waren nur die Konzentrationen von SAA und Hp erhöht. Die AGP-Konzentration war kaum angestiegen. Bei Katze 25 wurde für SAA ein Konzentrationsabfall innerhalb des Referenzintervalls bei der 2. Probe detektiert, woraufhin ein deutlicher Anstieg folgte. Dies korreliert ebenfalls mit der klinischen Entwicklung, da sie zwischen der 2. und 3. Probe entlassen, jedoch erneut am Tag der 3. Probenentnahme vorstellig wurde mit einer DKA. Im Gegensatz dazu waren die AGP-Konzentrationen stets gestiegen und das Hp-Level war annähernd konstant. Es bestätigt die schon bei den an FLUTD erkrankten Katzen getroffene Schlussfolgerung, dass SAA nicht alleinig zum Monitoring gemessen werden sollte. Ein ähnliches Fazit kann auch aus dem Verlauf der Katze 26 gezogen werden, deren Outcome nicht mit dem Konzentrationsabfall der 3 APPs übereinstimmte. Jedoch waren die Konzentrationen von AGP und Hp weiterhin hochgradig erhöht, wohingegen SAA schon deutlich gesunken war.

Der schnelle SAA-Abfall unabhängig von der klinischen Besserung oder Verschlechterung wird auch durch das Ergebnis der verallgemeinerten linearen Modelle bestätigt. Hier war SAA am Tag der jeweiligen Probenentnahme im Vergleich zu Tag 0 hoch signifikant niedriger. Für AGP und Hp wurde dagegen kein signifikanter Anstieg oder Abfall nachgewiesen, was durch die Heterogenität der einzelnen Verläufe zu erklären ist, welche in den Modellen zusammengefasst werden. Dies bestätigt, dass zum Monitoring mindestens 2 APPs verwendet und inter-

pretiert werden sollten. In der vorliegenden Arbeit wurde bei den Katzen, welche sich von der DKA erholt hatten, ein deutlicher Konzentrationsabfall von SAA und mindestens einem weiteren APP nachgewiesen.

Zusammenfassend zeigten die Verlaufskontrollen der an einem nicht ketoazidotischen DM erkrankten Katzen, dass AGP, SAA und Hp zum Monitoring hinsichtlich des Nachweises von möglichen Begleiterkrankungen und/oder Komplikationen Anwendung finden können. Gering- bis mittelgradige Konzentrationserhöhungen von AGP, SAA und Hp können hinweisend auf akute Begleiterkrankungen und/oder Komplikation des DM sein. Tendenziell wurden alleinige Hp-Konzentrationserhöhungen bei chronischen Erkrankungen nachgewiesen. Zur Überprüfung dieser Hypothese bedarf es jedoch zukünftige Studien. Bei an DKA erkrankten Katzen können gemeinsame Verlaufsmessungen von mindestens 2 der 3 APPs zur Überprüfung des Behandlungserfolges verwendet werden. Die schon beschriebenen Limitationen (unspezifische Induzierbarkeit und Latenzzeit bis zum nachweisbaren Konzentrationsanstieg) müssen weiterhin beachtet werden.

6.2.5 Korrelationen und beeinflussende Faktoren

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass jedes einzelne APP aufgrund der unterschiedlichen Kinetik eine eigene Information zur ablaufenden APR liefert. Wie schon beschrieben stellt SAA bei der Katze das Protein mit dem schnellsten Anstieg und dem schnellsten Abfall dar, wohingegen der Konzentrationsanstieg von AGP und Hp später erfolgt. Die Konzentrationen von Hp sind jedoch länger als die von AGP erhöht (Kajikawa et al., 1999). Diese Unterschiede und Gemeinsamkeiten spiegeln sich auch in den errechneten Korrelationen bei den erkrankten Katzen am Tag der Erstvorstellung wider. Die stärkste Korrelation mit einem r_s von 0,77 wurde zwischen AGP und Hp festgestellt. Auch bei Kann et al. (2012) wurde zwischen diesen beiden APPs die stärkste Korrelation nachgewiesen ($r_s = 0,73$). Eine annähernd gleiche Korrelation mittleren Grades wurde zwischen SAA und Hp ($r_s = 0,62$) und AGP und SAA ($r_s = 0,61$) ermittelt. Bei Kann et al. (2012) wurde hingegen eine stärkere Korrelation zwischen AGP und SAA ($r_s = 0,67$) festgestellt, wobei die Korrelation zwischen SAA und Hp ($r_s = 0,61$) der in der vorliegenden Arbeit errechneten annähernd entspricht. Bei Strom Holst et al. (2011) wurde zwischen AGP und SAA sogar nur ein Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,60 berechnet. Zwischen welchen APPs die schwächste Korrelation besteht scheint zu variieren. Es kann jedoch geschlussfolgert werden, dass bei der Messung von APP-Profilen bestehend aus mindestens einem maAPP und einem moAPP die Messung von SAA und Hp mehr Informationen liefert als die von AGP und Hp, da durch die hohe Korrelation zwischen AGP und Hp ähnliche Verläufe der beiden APPs zu erwarten sind.

Mögliche beeinflussende Faktoren der Korrelation können unterschiedliche Reaktionen der APPs je nach immunologischen Stimulus und die Zeitpunkte der Probenentnahme darstellen.

Beispiele, dass APPs verschieden stark je nach Krankheit auf die Noxe reagieren können, sind beim Hund beschrieben. Bei einer Infektion mit *Bordetella bronchiseptica* wurde ein deutlich stärkerer CRP-Anstieg im Gegensatz zu einem schwächeren SAA-Anstieg nachgewiesen (Yamamoto et al., 1994a; Yamamoto et al., 1994b; Martinez-Subiela et al., 2002). Bei einer kaninen Parvovirose zeigte jedoch SAA den stärksten Anstieg, wohingegen CRP weniger stark angestiegen war (Yamamoto et al., 1993; Yule et al., 1997).

Dass der Zeitpunkt der Probenentnahme einen wesentlichen Einfluss auf die ermittelten APP-Konzentrationen und damit auch auf Korrelationen zwischen den APPs hat, wurde durch die Ergebnisse der verallgemeinerten linearen Modelle bestätigt. Für AGP und Hp wurde ein statistisch signifikanter Einfluss des Tages der Probenentnahme auf die Konzentrationsdifferenz zum Tag 0 für die Gruppen FLUTD_{unkompliziert}, FLUTD_{kompliziert} und DM_{kompliziert} nachgewiesen. Für SAA konnte dies statistisch nicht festgestellt werden vermutlich aufgrund der heterogenen Verläufe der einzelnen Katzen, welche im Modell zusammengefasst werden. Bei Betrachtung der Verlaufskurven in den 3 Gruppen zeigt sich jedoch, dass SAA infolge der Kinetik die schnellsten Konzentrationsanstiege und -abfälle aufweist. Der Zeitpunkt der Probenentnahme hat daher wesentlichen Einfluss auf die gemessene Konzentration. Einzelmessungen liefern nur eine „Momentaufnahme“ einer sich schnell verändernden Serumkonzentration der APPs, weshalb von vielen Autoren die Durchführung von Verlaufsmessungen anstatt einer einmaligen Messung angeraten wird (Ceron et al., 2008; Eckersall und Schmidt, 2014).

Verknüpft man diese Empfehlung mit der zur gemeinsamen Messung von mindestens einem maAPP und einem moAPP können individuelle APP-Verlaufsprofile erstellt werden, anhand derer die ablaufende APR hinsichtlich diagnostischer Fragestellungen und der Überprüfung des Therapieerfolgs beurteilt werden kann. Ein Beispiel für ein APP-Verlaufsprofil ist im Anhang für Katze 25 dargestellt (*Anhang IX*). An diesem Profil ist zu erkennen, dass die APPs aufgrund einer unterschiedlichen Kinetik verschiedene Verläufe zeigen. Während AGP stetig ansteigt, ist die Hp-Konzentration annähernd konstant. Die SAA-Werte hingegen fallen zunächst und steigen dann wieder an. Es verdeutlicht erstens, dass jedes APP seine eigene Information zur APR liefert und daher die gemeinsame Messung angeraten ist und zweitens, dass einmalige Messungen aufgrund der sich schnell verändernden Konzentration abzulehnen sind.

6.2.6 Limitationen der klinischen Studie

Eine erste Limitation der vorliegenden klinischen Studie stellt die kleine Studienpopulation dar. Für die Etablierung von Referenzintervallen wurde dies bereits diskutiert. In kleinen Stichproben ist die Wahrscheinlichkeit einer unbeobachteten Heterogenität höher (Prein et al., 1994). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Studien mit einer höheren Anzahl

an Katzen bestimmte typische APP-Konzentrationen nachgewiesen werden würden, die in der vorliegenden Arbeit nicht vertreten waren. Trotzdem sind die Katzen dieser Studie in ihrem Signalement und ihrem klinischen Verlauf sehr heterogen und können daher als repräsentativ für die Klinikpopulation angesehen werden. Zudem zeigten Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Studien ähnliche Konzentrationen und Schlussfolgerungen auf (Sasaki et al., 2003; Tamamoto et al., 2008). Ein zweites Problem bei kleinen Stichproben beruht darauf, dass die statistische Power, d.h. die Wahrscheinlichkeit signifikante Ergebnisse zu erhalten, von der Größe der Stichprobe abhängt (Prein et al., 1994). Demzufolge führen stärkere Zusammenhänge nicht zur Zurückweisung der Nullhypothese. Es besteht daher die Möglichkeit, dass kleine Effekte in dieser Studie nicht nachgewiesen wurden, wie beispielsweise statistisch signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den erkrankten Katzen. Aufgrund der Einschlusskriterien, d.h. dass nur Serumreste verwendet wurden und dass mindestens 2 Proben zur Verfügung standen (davon eine vom Tag der Erstvorstellung bei den akut erkrankten Katzen), konnten nicht mehr Katzen im Untersuchungszeitraum eingeschlossen werden. Zudem wurden Konfidenzintervalle für die Referenzintervalle und die Sensitivitäten bzw. Spezifitäten angegeben, um diesem Aspekt der kleinen Gruppengröße Rechnung zu tragen. Eine zweite Limitation ist die Heterogenität der Katzen. Sie erhöht zwar einerseits die Repräsentativität der Stichproben. Auf der anderen Seite können die APP-Konzentrationen auch durch Signalement und weitere Erkrankungen beeinflusst sein. Um diesen Aspekt zu berücksichtigen wurden diese Parameter individuell für jede Katze im Anhang (*Anhang VII*) aufgelistet und es wurden die Kruskal-Wallis-Tests am Tag der Erstvorstellung sowie die Verlaufsmessungen unter Einbeziehung dieser Variablen ausgewertet und diskutiert. Drittens waren die Zeitpunkte der Probenentnahme bis auf den Tag der Erstvorstellung für jede Katze verschieden. Dies erschwerte eine einheitliche Auswertung. Durch die Verwendung der verallgemeinerten linearen Modelle für die akut erkrankten Katzen wurde versucht, diesen Aspekt zu berücksichtigen. Viertens waren die Katzen der Gruppe $DM_{\text{unkompliziert}}$ zwar nicht an einem entgleisten DM erkrankt, aber alle Katzen hatten mindestens eine weitere Vorerkrankung. Daher konnte, wie bereits diskutiert, keine Aussage bezüglich einer APR, welche alleinig durch einen DM ausgelöst wird, getroffen werden. Eine weitere Limitation ist die Festsetzung von SAA-Konzentrationen $> 100 \mu\text{g/ml}$ auf $100 \mu\text{g/ml}$. Für eine genaue Bestimmung der Werte hätten die Seren nach einer ersten und zweiten Dilution nochmals verdünnt werden müssen, worauf aufgrund des relativ hohen benötigten Probenvolumens bei einem begrenzten Gesamtvolumen der einzelnen Proben verzichtet werden musste. Daraus ergibt sich ein womöglich falsch negatives Ergebnis im Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zwischen $DM_{\text{unkompliziert}}$ und $DM_{\text{kompliziert}}$. Auf der anderen Seite wurde der große Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Gruppen durch die hohe Sensitivität und Spezifität des SAAs zum Nachweis einer DKA bei diabetischen Katzen repräsentiert. Daher hat diese Limitation nur einen geringgradigen

Informationsverlust zur Folge. Die Proben mit einer festgesetzten SAA-Konzentration von 100 µg/ml wurden für die Korrelationsberechnung ausgeschlossen. Daraus ergibt sich eine letzte Limitation, da dieser statistische Test ebenfalls von der Stichprobengröße abhängig ist und für AGP und Hp 26, für SAA jedoch nur 22 Proben einbezogen wurden. Eine hinsichtlich der Probenanzahl angegliche Korrelationsberechnung mit nur je 22 Proben für alle 3 APPs würde jedoch ähnliche Korrelationskoeffizienten in der gleichen Reihenfolge ergeben (Ergebnisse nicht aufgeführt). Die Ergebnisse der Korrelationsberechnung sind daher nur unwesentlich verzerrt.

6.2.7 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Alles in allem konnte in der vorliegenden klinischen Studie gezeigt werden, dass AGP, SAA und Hp bei an obstruktiver FLUTD erkrankten und bei diabetischen Katzen als Biomarker hinsichtlich Diagnostik und Monitoring verwendet werden können. Vom praktischen Standpunkt aus betrachtet können eine Harnröhrenobstruktion sowie eine DKA durch andere Parameter diagnostiziert werden, welche im klinischen Alltag schneller und günstiger durchführbar sind als die Messungen der APPs. Zudem wird der diagnostische Nutzen der APPs durch die unspezifische Induzierbarkeit der APR limitiert (Ceron et al., 2008; Eckersall und Bell, 2010). Aus dieser Perspektive bedarf es keiner Messung von APPs zu diagnostischen Zwecken bei den hier untersuchten Erkrankungen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch, dass das diagnostische Potential eher im Nachweis von Komplikationen einer schon detektierten Erkrankung liegt. Beispielsweise scheint Hp ein guter diagnostischer Indikator zum Nachweis von komplizierten obstruktiven Formen der FLUTD am Tag der Erstvorstellung zu sein. Ein anderes Beispiel ist die Messung von CRP beim Hund zur Detektion einer pulmonären Hypertension bei Infektion mit *Dirofilaria immitis* (Venco et al., 2014). Durch eine spezifischere diagnostische Zielsetzung, d.h. dem Nachweis von Komplikationen bei einer schon diagnostizierten Grunderkrankung, können höhere Sensitivitäten und Spezifitäten ermittelt werden (Venco et al., 2014), da der diagnostische Nachteil, die unspezifische Induzierbarkeit der APR, begrenzt wird. Trotzdem waren die berechneten Sensitivitäten und Spezifitäten bei den an obstruktiver FLUTD erkrankten Katzen nicht optimal. Eine höhere diagnostische Güte ergibt sich, wenn im Gegensatz zur eigentlichen Erkrankung die Komplikationen eine fulminante APR verursachen, wie beispielsweise bei den ketoazidotischen Katzen in der vorliegenden Arbeit.

Vom praktischen Standpunkt aus betrachtet sollten zum Monitoring eines erkrankten Tieres immer das Allgemeinbefinden und die klinische Allgemeinuntersuchung an erster Stelle stehen. Dies ist jedoch beispielsweise erschwert bei ängstlichen oder gestressten Katzen, welche während der stationären Betreuung häufig von reduziertem Befinden sind. Die Messung der APPs kann daher von Vorteil sein, um zu unterscheiden, ob z.B. Inappetenz bei

einer an FLUTD erkrankten Katze ein Zeichen von Angst oder ein Symptom einer Komplikation oder weiteren Erkrankungen ist. Durch den schnellen Konzentrationsanstieg und -abfall der APPs spiegeln Verlaufsmessungen die ablaufende APR und somit die Krankheitsaktivität wider und könnten zeitnah ein mögliches Scheitern oder einen Erfolg der Therapie vorhersagen. Bei schwerkranken Katzen mit einem stark reduzierten Allgemeinbefinden, wie den ketoazidotischen Katzen, könnten daher fallende Konzentrationen erste Hinweise auf einen Therapieerfolg noch vor einer deutlichen klinischen Besserung geben.

Zusammenfassend können Verlaufprofile von APPs vom praktischen Nutzen hinsichtlich Diagnostik und Monitoring sein für an FLUTD erkrankte und diabetische Katzen. In der Humanmedizin gehört die Messung von CRP zur routinemäßigen blutchemischen Untersuchung (Eckersall et al., 1999b). In der Veterinärmedizin sind die praktizierenden Tierärzte mit einem Mangel an schnellen und validierten Testsystemen, mit fehlenden Referenzpräparaten und einer fehlenden Qualitätssicherung der Messung konfrontiert (Eckersall, 2004). Für den Hund gab es in den letzten Jahren viele Fortschritte auf dem Gebiet der Messsysteme und der klinischen Anwendung (z.B. Venco et al., 2014; Jasensky et al., 2015). Für die Katze besteht hier weiterhin reichlich Forschungsbedarf. Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag dar, AGP, SAA und Hp bei erkrankten Katzen als Biomarker hinsichtlich Diagnostik und Monitoring zu etablieren. In der Zukunft sind jedoch weitere Studien notwendig, um das Potential der APPs in der veterinärmedizinischen Praxis umzusetzen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Validierung eines ELISAs zur Messung des feline Haptoglobins und Untersuchung der Bedeutung von Akute-Phase-Proteinen als Biomarker bei erkrankten Katzen

Biomarker stellen Parameter biologischer Prozesse dar, welche objektiv gemessen und als Indikatoren hinsichtlich Diagnostik, Prognostik und zur Überwachung des Therapieerfolges verwendet werden können. Als Akute-Phase-Proteine (APPs) werden Plasmaproteine definiert, deren Serumkonzentrationen sich um mindestens 25% im Rahmen einer unspezifischen systemischen Immunantwort verändern. Bei der Katze zählen das saure α 1-Glykoprotein (AGP), Serum-Amyloid-A (SAA) und Haptoglobin (Hp) zu den APPs, wobei aufgrund ihrer Kinetik AGP und SAA als „major“ und Hp als „moderate“ APPs klassifiziert werden. Um diese Proteine als Biomarker bei Katzen zu etablieren, war das erste Ziel der vorliegenden Arbeit die objektive Validierung eines Sandwich-ELISAs zur Messung des feline Hp. Das zweite Ziel umfasste die Untersuchung und Evaluierung von AGP, SAA und Hp als Indikatoren hinsichtlich Diagnostik und Monitoring bei an einer obstruktiven Form der unteren Harnwegserkrankung (obstruktive FLUTD) und an Diabetes mellitus (DM) erkrankten Katzen. Es wurden Serumproben von 56 Katzen gesammelt, welche in einem Zeitraum von Juni 2012 bis Januar 2014 an der Klinik für kleine Haustiere vorgestellt wurden. Die Validierungsstudie des Hp-ELISAs beinhaltete die Erhebung der Präzision und der Richtigkeit ($n = 6$ Katzen), der Nachweisgrenze, einen Methodenvergleich mit einem spektrophotometrischen Assay ($n = 39$) sowie eine Overlap Performance ($n = 47$). Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von deskriptiver Statistik, Spearman Rangkorrelation (r_s), Passing-Bablok-Regression, Bland-Altman-Diagrammen und einem Kruskal-Wallis-Test. Die klinische Studie umfasste die Ermittlung von Referenzintervallen für AGP, SAA und Hp bei gesunden Katzen ($n = 27$) sowie die Messung dieser 3 APPs bei erkrankten Katzen mit obstruktiver FLUTD ($n = 16$) und DM ($n = 10$). Die Konzentrationen von SAA und Hp wurden mittels ELISA, von AGP mittels radialer Immundiffusion bestimmt. Von den erkrankten Katzen wurden Proben am Tag der Erstvorstellung und bei folgenden Kontrolluntersuchungen gewonnen. Die an obstruktiver FLUTD erkrankten Patienten wurden hinsichtlich der Diagnose weiterer Erkrankungen im Behandlungszeitraum und die an DM erkrankten Katzen bezüglich der Diagnose einer hochgradigen Ketose oder diabetischen Ketoazidose in je 2 Gruppen unterteilt (FLUTD_{unkompliziert}, $n = 7$; FLUTD_{kompliziert}, $n = 9$; DM_{unkompliziert}, $n = 4$; DM_{kompliziert}, $n = 6$). Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von deskriptiver Statistik, der Berechnung von ein- bzw. zweiseitigen 95%igen Referenzintervallen nach einer robusten Methode sowie Analysen der APP-Konzentrationen der erkrankten Katzen am Tag der Erstvorstellung (Kruskal-Wallis-Tests, diagnostische Sensitivität und Spezifität mit 95%igen Konfidenzintervallen, Spearman Rangkorrelation r_s)

und der Verlaufskontrollen (verallgemeinerte lineare Modelle). Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha \leq 0,05$ festgesetzt.

Die Ergebnisse der Validierungsstudie des Hp-ELISAs ergaben für die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten (CVs) der 3 felinen Serumproben Werte von 2,5% bis 4,7% bzw. 7,1% bis 11,6%. Bei der Verdünnungsstudie von 4 Proben wurden Wiederherstellungsraten von 108,1% bis 118,4% ermittelt. Die Wiederfindungsraten der 4 aufgestockten Proben ergaben Quotienten von 90,8% bis 94,0%. Die Nachweisgrenze betrug 0,19 mg/ml. Im Methodenvergleich konnte eine sehr starke positive Korrelation ($r_s = 0,95$; $p < 0,0001$) und ein proportionaler Bias von -38,9% zwischen beiden Assays festgestellt werden. Die Übereinstimmung zwischen den Tests war für klinische Zwecke nicht ausreichend. Die Overlap Performance des ELISAs war zufriedenstellend. Zusammenfassend wies der kommerziell erhältliche Sandwich-ELISA eine akzeptierbare analytische und klinische Performance auf. Jedoch sollte ausschließlich der ELISA oder der spektrophotometrische Assay aufgrund des ermittelten Bias verwendet werden.

In der klinischen Studie wurde für AGP ein oberes Limit des einseitigen 95%igen Referenzintervalls von 380,2 $\mu\text{g/ml}$ und für SAA von 8,3 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Für Hp konnte lediglich ein oberes Limit eines zweiseitigen 95%igen Referenzintervalls von 2,05 mg/ml bestimmt werden. Ein unteres Limit konnte aufgrund von Hp-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze nicht berechnet werden. Die Auswertung der APP-Konzentrationen der gesunden und der erkrankten Katzen ergab mehrere signifikante Konzentrationsunterschiede. Am Tag der Erstvorstellung waren die AGP- und SAA-Konzentrationen der Gruppen FLUTD_{unkompliziert}, FLUTD_{kompliziert} und DM_{kompliziert} signifikant im Vergleich zu den gesunden Katzen erhöht. Für Hp wurden signifikante Konzentrationserhöhungen im Vergleich zu den gesunden Katzen bei den Gruppen FLUTD_{kompliziert}, DM_{unkompliziert} und DM_{kompliziert} nachgewiesen. Die stärksten Konzentrationserhöhungen der 3 APPs wurden am Tag der Erstvorstellung bei den Katzen der Gruppe DM_{kompliziert} ermittelt. Für SAA wurde bei den Katzen der Gruppen FLUTD_{unkompliziert}, FLUTD_{kompliziert} und DM_{kompliziert} der höchste Konzentrationsanstieg im Vergleich zu AGP und Hp bestimmt. Unter Berücksichtigung der kleinen Studienpopulation scheint Hp ein besserer diagnostischer Biomarker als AGP und SAA zur Detektion von Katzen der Gruppe FLUTD_{kompliziert} am Tag der Erstvorstellung zu sein. Bei den diabetischen Katzen stellte sich SAA als ein sehr guter diagnostischer Indikator zum Nachweis von an einem komplizierten DM erkrankten Katzen dar. Eine starke Korrelation wurde bei den erkrankten Katzen am Tag der Erstvorstellung zwischen AGP und Hp festgestellt ($r_s = 0,77$; $p < 0,0001$), wohingegen SAA und Hp bzw. AGP und SAA fast annähernd gleiche, mittlere Korrelationen aufwiesen ($r_s = 0,62$; $p = 0,002$ bzw. $r_s = 0,61$; $p = 0,002$).

Durch Auswertung der Verlaufsmessungen wurde eine gute Übereinstimmung der klinischen Entwicklung der Patienten mit den APP-Konzentrationsverläufen aufgezeigt. Bei der Interpretation waren die unspezifische Induzierbarkeit der Akute-Phase-Reaktion, die Latenzzeit vom immunologischen Stimulus bis zum nachweisbaren Konzentrationsanstieg zu berücksichtigen sowie die Konzentrationsverläufe von mindestens 2 APPs einzubeziehen. Die kleine Studienpopulation stellte eine wichtige Limitation der vorliegenden Arbeit dar, welche in die Interpretation der Ergebnisse einbezogen wurde.

Zusammenfassend können AGP, SAA und Hp bei an obstruktiver FLUTD und bei an DM erkrankten Katzen als Biomarker hinsichtlich Diagnostik und Monitoring Anwendung finden. Die Ergebnisse bestätigen die Empfehlungen zur Durchführung von Verlaufsmessungen und zur Messung von APP-Profilen bestehend aus mindestens einem „major“ und einem „moderate“ APP. Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zur Etablierung von AGP, SAA und Hp als Biomarker bei erkrankten Katzen dar. Zukünftige Studien hinsichtlich der Entwicklung und Validierung schneller Testsysteme sowie dem klinischen Nutzen sind jedoch notwendig, um das Potential der APPs in der veterinärmedizinischen Praxis umzusetzen.

8 SUMMARY

Validation of an ELISA for measurement of feline haptoglobin and evaluation of acute phase proteins and their role as biomarkers in diseased cats

Biomarkers are defined as parameters of biological processes that can be objectively measured and used in diagnosis, prognosis, and in monitoring response to therapy. Acute phase proteins (APPs) are plasma proteins whose serum concentration changes by at least 25% as part of a nonspecific systemic immune response. In cats, α 1-acid glycoprotein (AGP), serum amyloid A (SAA), and haptoglobin (hp) are recognized as acute phase reactants. According to their kinetics in this species, AGP and SAA are classified as major, and hp as a moderate APP. To establish these proteins as biomarkers in cats, the first aim of this study was to objectively validate a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of feline hp. The second aim was to examine and evaluate the use of AGP, SAA, and hp as diagnostic indicators and parameters for monitoring in cats with an obstructive urinary tract disease (obstructive FLUTD) and diabetes mellitus (DM).

Serum samples were obtained from 56 cats from June 2012 until January 2014 at the Clinic of Small Animals. The validation study of the ELISA for measurement of hp included an assessment of precision and accuracy ($n = 6$ cats), detection limit, method comparison with the spectrophotometric assay ($n = 39$), and evaluation of the overlap performance ($n = 47$). Statistical analysis was performed using descriptive statistics, Spearman's rank correlation (r_s), Passing-Bablok regression, Bland-Altman difference plot and Kruskal-Wallis analysis. The clinical study comprised the establishment of reference intervals for AGP, SAA, and hp in healthy cats ($n = 27$) as well as measurements of these 3 APPs in diseased cats diagnosed with obstructive FLUTD ($n = 16$) and DM ($n = 10$). SAA and hp concentrations were measured using ELISA, AGP was determined by radial immunodiffusion. Samples from diseased cats were collected on the day of initial presentation and on follow-ups. Cats with obstructive FLUTD were subdivided based on the diagnosis of concurrent disorders during treatment (FLUTD_{uncomplicated}, $n = 7$; FLUTD_{complicated}, $n = 9$). Cats with DM were classified according to the diagnosis of a severe ketosis or diabetic ketoacidosis (DM_{uncomplicated}, $n = 4$; DM_{complicated}, $n = 6$). Statistical analysis included descriptive statistics, the calculation of 1- and 2-sided 95% reference intervals using a robust method, and analysis of the APP-concentrations of the diseased cats on the day of initial presentation (Kruskal-Wallis analysis, diagnostic sensitivity and specificity with 95% confidence intervals, Spearman's rank correlation r_s) and of serial measurements (generalized linear models). Variables with p values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

The results of the validation study revealed coefficients of variation from 2.5 to 4.7% for intra-assay variability and from 7.1 to 11.6% for inter-assay variability. The ratio of observed to expected dilutional parallelism of 4 serum samples was 108.1 to 118.4%. The ratio of observed to expected spike recovery of 4 serum samples was 90.8 to 94.0%. The detection limit was 0.19 mg/ml. Method comparison revealed a strong positive correlation ($r_s = 0.95$, $p < 0.0001$) and a proportional bias between the methods of -38.9%. Agreement between the methods was not clinically acceptable. Overlap performance of the ELISA was deemed satisfactory. The commercially available sandwich ELISA measures feline haptoglobin with an analytical and overlap performance acceptable for clinical purposes. Given the observed bias, the ELISA cannot be used interchangeably with the spectrophotometric assay.

In the clinical study, the upper limit of a 1-sided 95% reference interval for AGP was calculated as 380.2 $\mu\text{g/ml}$ and for SAA as 8.3 $\mu\text{g/ml}$. For hp, the upper limit of a 2-sided 95% reference interval was 2.05 mg/ml. A lower limit could not be determined due to hp-concentrations below the detection limit. The evaluation of the APP-concentrations in healthy and diseased cats revealed several significant differences. On the day of first presentation, the levels of AGP and SAA of the groups FLUTD_{uncomplicated}, FLUTD_{complicated}, and DM_{complicated} were significantly elevated in comparison to concentrations measured in healthy cats. For hp, a significant elevation in concentration in comparison to the healthy cats was detected for FLUTD_{complicated}, DM_{uncomplicated}, and DM_{complicated}. The highest increases in concentrations of all 3 APPs on the day of first presentation were noted in cats of the group DM_{complicated}. SAA was revealed as the APP with the highest increase in concentration in cats of FLUTD_{uncomplicated}, FLUTD_{complicated}, and DM_{complicated}. In consideration of the limited study population, hp seems to be a better diagnostic biomarker than AGP and SAA at detecting cats of the group FLUTD_{complicated} on the day of first presentation. In the diabetic cats, SAA was deemed to be an excellent diagnostic indicator at detecting cats with a complicated DM. A strong correlation was revealed between the concentrations of AGP and hp in the diseased cats on the day of first presentation ($r_s = 0.77$; $p < 0.0001$). Medium correlations were determined between SAA and hp and between AGP and SAA ($r_s = 0.62$, $p = 0.002$; and $r_s = 0.61$; $p = 0.002$, respectively).

The interpretation of the follow-up measurements of each patient showed a good agreement between the response to treatment and the corresponding APP-concentration profiles over time. For a correct evaluation, it was necessary to consider the nonspecific nature of an induced acute phase reaction, the latent period from an immunological stimulus to a measurable increase in concentration, and to include concentration profiles of at least 2 APPs. The small study population was deemed as an important limitation, which was taken into account when interpreting the results of this study.

In summary, AGP, SAA, and hp can be used as diagnostic and monitoring biomarkers in cats with obstructive FLUTD and DM. The results of the study confirm the recommendations of

performing serial measurements and APP-profiles consisting of at least one major and one moderate APP. The current study contributes in establishing AGP, SAA, and hp as biomarkers in cats. Future studies regarding the development and validation of rapid assay kits and the clinical applicability are necessary to realize the potential of APPs in veterinary practice.

9 LITERATURVERZEICHNIS

Abernethy, T. J. und O. T. Avery (1941). The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood: I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C polysaccharide of Pneumococcus. *J Exp Med* 73: 173-182.

Ascenzi, P., A. Bocedi, P. Visca, F. Altruda, E. Tolosano, T. Beringhelli und M. Fasano (2005). Hemoglobin and heme scavenging. *IUBMB Life* 57(11): 749-759.

Badawi, A., A. Klip, P. Haddad, D. E. Cole, B. G. Bailo, A. El-Soheymy und M. Karmali (2010). Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Diabetes Metab Syndr Obes* 3: 173-186.

Baumann, H. und J. Gauldie (1994). The acute phase response. *Immunol Today* 15(2): 74-80.

Bence, L. M., D. D. Addie und P. D. Eckersall (2005). An immunoturbidimetric assay for rapid quantitative measurement of feline alpha-1-acid glycoprotein in serum and peritoneal fluid. *Vet Clin Pathol* 34(4): 335-341.

Bland, J. M. und D. G. Altman (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1(8476): 307-310.

Bland, J. M. und D. G. Altman (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 8(2): 135-160.

Bloom, C. A. und J. Rand (2014). Feline diabetes mellitus: clinical use of long-acting glargine and detemir. *J Feline Med Surg* 16(3): 205-215.

Brady, C. A., C. M. Otto, T. J. Van Winkle und L. G. King (2000). Severe sepsis in cats: 29 cases (1986-1998). *J Am Vet Med Assoc* 217(4): 531-5.

Brée, F., G. Houin, J. Barré, J. L. Moretti, V. Wirquin und J. P. Tillement (1986). Pharmacokinetics of intravenously administered ¹²⁵I-labelled human alpha 1-acid glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 11(4): 336-342.

Buffington, C. A., J. L. Westropp, D. J. Chew und R. R. Bolus (2006). Clinical evaluation of multimodal environmental modification (MEMO) in the management of cats with idiopathic cystitis. *J Feline Med Surg* 8(4): 261-268.

Buffington, C. A. T., J. L. Westropp und D. J. Chew (2014). From FUS to Pandora syndrome: where are we, how did we get here, and where to now? *J Feline Med Surg* 16(5): 385-394.

Ceciliani, F., A. Giordano und V. Spagnolo (2002). The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett* 9(3): 211-223.

Ceciliani, F., C. Grossi, A. Giordano, V. Pocacqua und S. Paltrinieri (2004). Decreased sialylation of the acute phase protein alpha1-acid glycoprotein in feline infectious peritonitis (FIP). *Vet Immunol Immunopathol* 99(3-4): 229-236.

Ceciliani, F. und V. Pocacqua (2007). The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Curr Protein Pept Sci* 8(1): 91-108.

- Ceron, J. J., P. D. Eckersall und S. Martinez-Subiela** (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol* 34(2): 85-99.
- Ceron, J. J., S. Martinez-Subiela, K. Ohno und M. Caldin** (2008). A seven-point plan for acute phase protein interpretation in companion animals. *Vet J* 177(1): 6-7.
- Chiellini, C., A. Bertacca, S. E. Novelli, C. Z. Gorgun, A. Ciccarone, A. Giordano, H. Xu, A. Soukas, M. Costa, D. Gandini, R. Dimitri, P. Bottone, P. Cecchetti, E. Pardini, L. Perego, R. Navalesi, F. Folli, L. Benzi, S. Cinti, J. M. Friedman, G. S. Hotamisligil und M. Maffei** (2002). Obesity modulates the expression of haptoglobin in the white adipose tissue via TNFalpha. *J Cell Physiol* 190(2): 251-258.
- Christensen, M., S. Jacobsen, T. Ichiyanagi und M. Kjelgaard-Hansen** (2012). Evaluation of an automated assay based on monoclonal anti-human serum amyloid A (SAA) antibodies for measurement of canine, feline, and equine SAA. *Vet J* 194(3): 332-337.
- Christoffersen, M., C. D. Baagoe, S. Jacobsen, A. M. Bojesen, M. R. Petersen und H. Lehn-Jensen** (2010). Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. *Vet Immunol Immunopathol* 138(1-2): 95-105.
- Clark, G. H. und C. G. Fraser** (1993). Biological variation of acute phase proteins. *Ann Clin Biochem* 30 (Pt 4): 373-376.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** (2008). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline, document C28-A3. 3. Edition.
- Correa, S. S., G. N. Mauldin, G. E. Mauldin und S. C. Mooney** (2001). Serum alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 37(2): 153-158.
- Cox, K. L., V. Devanarayan, A. Kriauciunas, J. Manetta, C. Montrose und S. Sittampalam** (2004-2012 May 1 [updated 2014 Dec 24]). Immunoassay Methods. Assay Guidance Manual [Internet], Bethesda (MD), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Cray, C., J. Zaias und N. H. Altman** (2009). Acute phase response in animals: a review. *Comp Med* 59(6): 517-526.
- Dalton, R. R., W. H. Hoffman, G. G. Passmore und S. L. Martin** (2003). Plasma C-reactive protein levels in severe diabetic ketoacidosis. *Ann Clin Lab Sci* 33(4): 435-442.
- De Gruttola, V. G., P. Clax, D. L. DeMets, G. J. Downing, S. S. Ellenberg, L. Friedman, M. H. Gail, R. Prentice, J. Wittes und S. L. Zeger** (2001). Considerations in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials. summary of a National Institutes of Health workshop. *Control Clin Trials* 22(5): 485-502.
- DiBartola, S. P., J. A. Reiter, J. B. Cornacoff, G. J. Kociba und M. D. Benson** (1989). Serum amyloid A protein concentration measured by radial immunodiffusion in Abyssinian and non-Abyssinian cats. *Am J Vet Res* 50(8): 1414-1417.
- Dillman, R. C. und E. H. Coles** (1966). A canine serum fraction analogous to human C-reactive protein. *Am J Vet Res* 27(121): 1769-1775.
- Dobryszczycka, W.** (1997). Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35(9): 647-654.

Dorsch, R., C. Remer, C. Sauter-Louis und K. Hartmann (2014). Feline lower urinary tract disease in a German cat population. A retrospective analysis of demographic data, causes and clinical signs. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 42(4): 231-239.

Duthie, S., P. D. Eckersall, D. D. Addie, C. E. Lawrence und O. Jarrett (1997). Value of alpha 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet Rec* 141(12): 299-303.

Eckersall, P. D., S. Duthie, S. Safi, D. Moffatt, N. U. Horadagoda, S. Doyle, R. Parton, D. Bennett und J. L. Fitzpatrick (1999a). An automated biochemical assay for haptoglobin: Prevention of interference from albumin. *Comp Haematol Int* 9(3): 117-124.

Eckersall, P. D., S. Duthie, M. J. Toussaint, E. Gruys, P. Heegaard, M. Alava, C. Lipperheide und F. Madec (1999b). Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. *Adv Vet Med* 41: 643-655.

Eckersall, P. D. (2004). The time is right for acute phase protein assays. *Vet J* 168(1): 3-5.

Eckersall, P. D. und R. Bell (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* 185(1): 23-27.

Eckersall, P. D. und E. M. Schmidt (2014). The final hurdles for acute phase protein analysis in small animal practice. *J Small Anim Pract* 55(1): 1-3.

Fazio, F., S. Casella, C. Giannetto, E. Giudice und G. Piccione (2015). Characterization of acute phase proteins and oxidative stress response to road transportation in the dog. *Exp Anim* 64(1): 19-24.

Flatland, B., K. R. Friedrichs und S. Klenner (2014). Differentiating between analytical and diagnostic performance evaluation with a focus on the method comparison study and identification of bias. *Vet Clin Pathol* 43(4): 475-486.

Fournier, T., N. Medjoubi-N und D. Porquet (2000). Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2): 157-171.

Friedrichs, K. R., K. E. Harr, K. P. Freeman, B. Szlodovits, R. M. Walton, K. F. Barnhart und J. Blanco-Chavez (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol* 41(4): 441-453.

Gabay, C. und I. Kushner (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340(6): 448-454.

Gatt, M. E., S. Urieli-Shoval, L. Preciado-Patt, M. Fridkin, S. Calco, Y. Azar und Y. Matzner (1998). Effect of serum amyloid A on selected in vitro functions of isolated human neutrophils. *J Lab Clin Med* 132(5): 414-420.

Gerber, B., F. S. Boretti, S. Kley, P. Luluha, C. Muller, N. Sieber, S. Unterer, M. Wenger, M. Fluckiger, T. Glaus und C. E. Reusch (2005). Evaluation of clinical signs and causes of lower urinary tract disease in European cats. *J Small Anim Pract* 46(12): 571-577.

Gerber, B., S. Eichenberger und C. E. Reusch (2008). Guarded long-term prognosis in male cats with urethral obstruction. *J Feline Med Surg* 10(1): 16-23.

- Gil, S., R. O. Leal, D. McGahie, N. Sepulveda, A. Duarte, M. M. Niza und L. Tavares** (2014). Oral Recombinant Feline Interferon-Omega as an alternative immune modulation therapy in FIV positive cats: clinical and laboratory evaluation. *Res Vet Sci* 96(1): 79-85.
- Giordano, A., V. Spagnolo, A. Colombo und S. Paltrinieri** (2004). Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *Vet J* 167(1): 38-44.
- Gunn-Moore, D.** (2014). Urethral obstruction in feline lower tract disease. *Veterinary Times* (6): 7 - 10.
- Hansen, A. E., M. K. Schaap und M. Kjelgaard-Hansen** (2006). Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidimetric immunoassay for determination of feline SAA concentration. *Vet Res Commun* 30(8): 863-872.
- Harr, K. E., B. Flatland, M. Nabity und K. P. Freeman** (2013). ASVCP guidelines: allowable total error guidelines for biochemistry. *Vet Clin Pathol* 42(4): 424-436.
- Harris, E. K.** (1979). Statistical principles underlying analytic goal-setting in clinical chemistry. *Am J Clin Pathol* 72(2 Suppl): 374-382.
- Harvey, J. W.** (1976). Quantitative determinations of normal horse, cat, and dog haptoglobin. *Theriogenology* 6(2-3): 133-151.
- Harvey, J. W. und J. M. Gaskin** (1978). Feline Haptoglobin. *Am J Vet Res* 39(4): 549-553.
- Hochepped, T., F. G. Berger, H. Baumann und C. Libert** (2003). Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(1): 25-34.
- Hoffman, W. H., C. L. Burek, J. L. Waller, L. E. Fisher, M. Khichi und L. B. Mellick** (2003). Cytokine response to diabetic ketoacidosis and its treatment. *Clin Immunol* 108(3): 175-181.
- Hostutler, R. A., D. J. Chew und S. P. DiBartola** (2005). Recent concepts in feline lower urinary tract disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 35(1): 147-170, vii.
- Humblet, M. F., H. Guyot, B. Boudry, F. Mbayahi, C. Hanzen, F. Rollin und J. M. Godeau** (2006). Relationship between haptoglobin, serum amyloid A, and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period. *Vet Clin Pathol* 35(2): 188-193.
- Hurlimann, J., G. J. Thorbecke und G. M. Hochwald** (1966). The liver as the site of C-reactive protein formation. *J Exp Med* 123 365-378.
- Jabs, W. J., B. A. Logering, P. Gerke, B. Kreft, E. M. Wolber, M. H. Klinger, L. Fricke und J. Steinhoff** (2003). The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. *Eur J Immunol* 33(1): 152-161.
- Jacobsen, S., M. Kjelgaard-Hansen, H. Hagbard Petersen und A. L. Jensen** (2006). Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. *Vet J* 172(2): 315-319.
- Jain, S., V. Gautam und S. Naseem** (2011). Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci* 3(1): 118-127.

- Jasensky, A. K., S. Klenner, R. Einspanier und B. Kohn** (2015). Evaluation of three different point-of-care tests for quantitative measurement of canine C-reactive protein. *Vet Clin Pathol* 44(2): 205-214.
- Jensen, A. L. und M. Kjelgaard-Hansen** (2006). Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol* 35(3): 276-286.
- Jensen, A. L. und M. Kjelgaard-Hansen** (2010). Diagnostic test validation. *Schalm's veterinary hematology*. D. J. Weiss and K. J. Wardrop. Ames, USA, Wiley-Blackwell: 1027-1033.
- Kajikawa, T., A. Furuta, T. Onishi und S. Sugii** (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of feline serum amyloid A protein by use of immunological cross-reactivity of polyclonal anti-canine serum amyloid A protein antibody. *J Vet Med Sci* 58(11): 1141-1143.
- Kajikawa, T., A. Furuta, T. Onishi, T. Tajima und S. Sugii** (1999). Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Vet Immunol Immunopathol* 68(1): 91-98.
- Kann, R. K., J. M. Seddon, J. Henning und J. Meers** (2012). Acute phase proteins in healthy and sick cats. *Res Vet Sci* 93(2): 649-654.
- Kann, R. K., J. M. Seddon, M. T. Kyaw-Tanner, J. Henning und J. Meers** (2014). Association between feline immunodeficiency virus (FIV) plasma viral RNA load, concentration of acute phase proteins and disease severity. *Vet J* 201(2): 181-183.
- Kisilevsky, R. und P. N. Manley** (2012). Acute-phase serum amyloid A: perspectives on its physiological and pathological roles. *Amyloid* 19(1): 5-14.
- Kjelgaard-Hansen, M., A. L. Jensen und A. T. Kristensen** (2003). Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Vet Clin Pathol* 32(2): 81-87.
- Kjelgaard-Hansen, M., S. Martinez-Subiela, H. H. Petersen, A. L. Jensen und J. J. Ceron** (2007). Evaluation and comparison of two immunoturbidimetric assays for the heterologous determination of porcine serum C-reactive protein. *Vet J* 173(3): 571-577.
- Kjelgaard-Hansen, M. und S. Jacobsen** (2011). Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. *Clin Lab Med* 31(1): 51-70.
- Klenner, S., N. Bauer und A. Moritz** (2010). Evaluation of three automated human immunoturbidimetric assays for the detection of C-reactive protein in dogs. *J Vet Diagn Invest* 22(4): 544-552.
- Korman, R. M., J. J. Ceron, T. G. Knowles, E. N. Barker, P. D. Eckersall und S. Tasker** (2012). Acute phase response to *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' infection in FIV-infected and non-FIV-infected cats. *Vet J* 193(2): 433-438.
- Kruger, J. M., C. A. Osborne, S. M. Goyal, S. L. Wickstrom, G. R. Johnston, T. F. Fletcher und P. A. Brown** (1991). Clinical evaluation of cats with lower urinary tract disease. *J Am Vet Med Assoc* 199(2): 211-216.

Kuribayashi, T., T. Shimada, M. Matsumoto, K. Kawato, T. Honjyo, M. Fukuyama, Y. Yamamoto und S. Yamamoto (2003a). Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. *Exp Anim* 52(5): 387-390.

Kuribayashi, T., M. Shimizu, T. Shimada, T. Honjyo, Y. Yamamoto, K. Kuba und S. Yamamoto (2003b). Alpha 1-acid glycoprotein (AAG) levels in healthy and pregnant beagle dogs. *Exp Anim* 52(5): 377-381.

Kushner, I. (1982). The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci* 389: 39-48.

Leal, R. O., S. Gil, N. Sepulveda, D. McGahie, A. Duarte, M. M. Niza und L. Tavares (2014). Monitoring acute phase proteins in retrovirus infected cats undergoing feline interferon-omega therapy. *J Small Anim Pract* 55(1): 39-45.

Liappis, N., R. Fuchs und P. Reimnitz (1986). Physiologische Schwankungen der Konzentrationen von Gesamteiweiß, Transferrin, Haptoglobin, saurem α 1-Glykoprotein, α 2-Makroglobulin, Properdin Faktor B, C3-Komplement, C4-Komplement, IgA, IgG, IgM, α 1-Antitrypsin und Coeruloplasmin in Nüchternserum gesunder Männer. *Ärztl Lab* 32: 286-292.

Logdberg, L. und L. Wester (2000). Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2): 284-297.

Lund, E. M., P. J. Armstrong, C. A. Kirk, L. M. Kolar und J. S. Klausner (1999). Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 214(9): 1336-1341.

Ma, S. G., Y. Jin, W. Xu, W. Hu, F. Bai und X. J. Wu (2012). Increased serum levels of ischemia-modified albumin and C-reactive protein in type 1 diabetes patients with ketoacidosis. *Endocrine* 42(3): 570-576.

Mackiewicz, A. (1997). Acute phase proteins and transformed cells. *Int Rev Cytol* 170: 225-300.

Macleod, C. M. und O. T. Avery (1941). The Occurrence during Acute Infections of a Protein Not Normally Present in the Blood : Iii. Immunological Properties of the C-Reactive Protein and Its Differentiation from Normal Blood Proteins. *J Exp Med* 73(2): 191-200.

Makimura, S. und N. Suzuki (1982). Quantitative determination of bovine serum Haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Nihon Juigaku Zasshi* 44(1): 15-21.

Mancini, G., A. O. Carbonara und J. F. Heremans (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2(3): 235-254.

Mantha, S., M. F. Roizen, L. A. Fleisher, R. Thisted und J. Foss (2000). Comparing methods of clinical measurement: reporting standards for bland and altman analysis. *Anesth Analg* 90(3): 593-602.

Martinez-Subiela, S., F. Tecles, P. D. Eckersall und J. J. Ceron (2002). Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec* 150(8): 241-244.

Martinez-Subiela, S., P. J. Ginel und J. J. Ceron (2004). Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Vet Rec* 154(26): 814-817.

- Martinez-Subiela, S. und J. J. Ceron** (2005). Analytical validation of commercial assays for the determination of haptoglobin, C-reactive protein and serum amyloid A in dogs. *Arch Med Vet* 37(1): 61-66.
- Meachem, M. D., E. R. Snead, B. A. Kidney, M. L. Jackson, R. Dickinson, V. Larson und E. Simko** (2015). A comparative proteomic study of plasma in feline pancreatitis and pancreatic carcinoma using 2-dimensional gel electrophoresis to identify diagnostic biomarkers: A pilot study. *Can J Vet Res* 79(3): 184-189.
- Moldal, E. R., J. Kirpensteijn, A. T. Kristensen, H. A. Haga, A. Nodtvedt und T. Eriksen** (2012). Evaluation of inflammatory and hemostatic surgical stress responses in male cats after castration under general anesthesia with or without local anesthesia. *Am J Vet Res* 73(11): 1824-1831.
- Mominoki, K., N. Nakagawa-Tosa, M. Morimatsu, B. Syuto und M. Saito** (1995). Haptoglobin in Carnivora: a unique molecular structure in bear, cat and dog haptoglobins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 110(4): 785-789.
- Moretti, J., J. Borel, W. Dobryszczyka und M.-F. Jayle** (1963). Détermination de la demi-vie de l'haptoglobine plasmatique humaine. *Biochim Biophys Acta* 69: 205-211.
- Nelson, R. W.** (2015). Diabetic Ketoacidosis. *Canine and feline endocrinology* E. C. Feldman, R. W. Nelson, C. E. Reusch and J. C. R. Scott-Moncrieff. St. Louis, Mo., Elsevier Saunders. 4. Ed.: 315-347.
- Ohno, K., M. Terado, H. Iwata, H. Inokuma und T. Onishi** (1999). Expression of recombinant feline serum amyloid A (SAA) protein. *J Vet Med Sci* 61(8): 915-920.
- Ohwada, K. und K. Tamura** (1993). Usefulness of alpha 1 acid glycoprotein (alpha 1-AG) values in screening pound dogs acquired from animal shelters for experimental use. *Jikken Dobutsu* 42(4): 627-630.
- Osborne, C. A., J. M. Kruger und J. P. Lulich** (1996). Feline lower urinary tract disorders. Definition of terms and concepts. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 26(2): 169-179.
- Osborne, C. A., J. P. Lulich und D. J. Polzin** (2011). Feline urethral obstruction. *Nephrology and Urology of Small Animals*. J. W. Bartges and D. J. Polzin. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell: 367 - 374.
- Ottenjann, M., C. Weingart, G. Arndt und B. Kohn** (2006). Characterization of the anemia of inflammatory disease in cats with abscesses, pyothorax, or fat necrosis. *J Vet Intern Med* 20(5): 1143-1150.
- Paltrinieri, S., A. Giordano, V. Tranquillo und S. Guazzetti** (2007a). Critical assessment of the diagnostic value of feline alpha1-acid glycoprotein for feline infectious peritonitis using the likelihood ratios approach. *J Vet Diagn Invest* 19(3): 266-272.
- Paltrinieri, S., C. Metzger, M. Battilani, V. Pocacqua, M. E. Gelain und A. Giordano** (2007b). Serum alpha1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. *J Feline Med Surg* 9(4): 271-277.
- Paltrinieri, S.** (2008). The feline acute phase reaction. *Vet J* 177(1): 26-35.
- Paltrinieri, S., M. E. Gelain, F. Ceciliani, A. M. Ribera und M. Battilani** (2008). Association between faecal shedding of feline coronavirus and serum alpha1-acid glycoprotein sialylation. *J Feline Med Surg* 10(5): 514-518.

- Paltrinieri, S., I. Marchini und M. E. Gelain** (2012). Flow cytometric detection of alpha-1-acid glycoprotein on feline circulating leucocytes. *Aust Vet J* 90(8): 291-296.
- Paltrinieri, S., G. Sironi, L. Giori, S. Faverezani und M. Longeri** (2015). Changes in serum and urine SAA concentrations and qualitative and quantitative proteinuria in Abyssinian cats with familial amyloidosis: a five-year longitudinal study (2009-2014). *J Vet Intern Med* 29(2): 505-512.
- Pancierera, D. L., C. B. Thomas, S. W. Eicker und C. E. Atkins** (1990). Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in cats: 333 cases (1980-1986). *J Am Vet Med Assoc* 197(11): 1504-1508.
- Passing, H. und Bablok** (1983). A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 21(11): 709-720.
- Petersen, H. H., J. P. Nielsen und P. M. H. Heegaard** (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 35(2): 163-87.
- Pocacqua, V., E. Provasi, S. Paltrinieri, E. Gelain, C. Comunian und F. Cecilian** (2005). Glycan moiety modifications of feline alpha1-acid glycoprotein in retrovirus (FIV, FeLV) affected cats. *Vet Immunol Immunopathol* 107(1-2): 17-26.
- Prahl, A., L. Guptill, N. W. Glickman, M. Tetrick und L. T. Glickman** (2007). Time trends and risk factors for diabetes mellitus in cats presented to veterinary teaching hospitals. *J Feline Med Surg* 9(5): 351-358.
- Prein, G., S. Kluge und U. Kelle** (1994). *Strategien zur Sicherung von Repräsentativität und Stichprobenvalidität bei kleinen Samples*. Bremen Der Vorstand des Sfb 186
- Rand, J. S.** (2013). Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic state in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 43(2): 367-379.
- Raynes, J. G.** (1994). The acute phase response. *Biochem Soc Trans* 22(1): 69-74.
- Reed, A. H., R. J. Henry und W. B. Mason** (1971). Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem* 17(4): 275-284.
- Reusch, C. E.** (2015). Feline Diabetes mellitus. *Canine and feline endocrinology* E. C. Feldman, R. W. Nelson, C. E. Reusch and J. C. R. Scott-Moncrieff. St. Louis, Mo. , Elsevier Saunders. 4. Ed.: 258-314.
- Roomp, K. und J. Rand** (2009). Intensive blood glucose control is safe and effective in diabetic cats using home monitoring and treatment with glargine. *J Feline Med Surg* 11(8): 668-682.
- Rosenthal, C. J., N. Solomon und M. E. Martin** (1986). Kinetics of Human Serum Amyloid A. *Amyloidosis*. G. G. Glenner, E. F. Osserman, E. P. Benditt et al. New York u.a, Plenum Pr.: 69-77.
- Rossbacher, J., L. Wagner und M. S. Pasternack** (1999). Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity. *Scand J Immunol* 50(4): 399-404.

- Saevik, B. K., C. Trangerud, N. Ottesen, H. Sorum und A. V. Eggertsdottir** (2011). Causes of lower urinary tract disease in Norwegian cats. *J Feline Med Surg* 13(6): 410-417.
- Sandberg, S., C. G. Fraser, A. R. Horvath, R. Jansen, G. Jones, W. Oosterhuis, P. H. Petersen, H. Schimmel, K. Sikaris und M. Panteghini** (2015). Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 53(6): 833-835.
- Sasaki, K., Z. Ma, T. S. Khatlani, M. Okuda, H. Inokuma und T. Onishi** (2003). Evaluation of feline serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker. *J Vet Med Sci* 65(4): 545-548.
- Segev, G., H. Livne, E. Ranen und E. Lavy** (2011). Urethral obstruction in cats: predisposing factors, clinical, clinicopathological characteristics and prognosis. *J Feline Med Surg* 13(2): 101-108.
- Selting, K. A., G. K. Ogilvie, S. E. Lana, M. J. Fettman, K. L. Mitchener, R. A. Hansen, K. L. Richardson, J. A. Walton und M. A. Scherk** (2000). Serum alpha 1-acid glycoprotein concentrations in healthy and tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med* 14(5): 503-506.
- Seo, K. W., J. B. Lee, J. O. Ahn, H. W. Lee, C. Y. Hwang, H. Y. Youn und C. W. Lee** (2012). C-reactive protein as an indicator of inflammatory responses to experimentally induced cystitis in dogs. *J Vet Sci* 13(2): 179-185.
- Skinner, J. G.** (2001): International standardization of acute phase proteins. *Vet Clin Pathol* 30(1): 2-7.
- Statland, B. E., P. Winkel und L. M. Killingsworth** (1976). Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents: Physiological day-to-day variation in concentrations of 10 specific proteins in sera of healthy subjects. *Clin Chem* 22(10): 1635-1638.
- Stoddart, M. E., J. T. Whicher und D. A. Harbour** (1988). Cats inoculated with feline infectious peritonitis virus exhibit a biphasic acute phase plasma protein response. *Vet Rec* 123(24): 622-624.
- Strom Holst, B., L. Krook, S. Englund, A. S. Lagerstedt und G. Bolske** (2011). Shedding of chlamydiae in relation to titers of serum chlamydiae-specific antibodies and serum concentrations of two acute-phase proteins in cats without conjunctivitis. *Am J Vet Res* 72(6): 806-812.
- Suffredini, A. F., G. Fantuzzi, R. Badolato, J. J. Oppenheim und N. P. O'Grady** (1999). New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol* 19(4): 203-214.
- Tamamoto, T., K. Ohno, A. Ohmi, Y. Goto-Koshino und H. Tsujimoto** (2008). Verification of measurement of the feline serum amyloid A (SAA) concentration by human SAA turbidimetric immunoassay and its clinical application. *J Vet Med Sci* 70(11): 1247-1252.
- Tamamoto, T., K. Ohno, A. Ohmi, I. Seki und H. Tsujimoto** (2009). Time-course monitoring of serum amyloid A in a cat with pancreatitis. *Vet Clin Pathol* 38(1): 83-86.
- Tamamoto, T., K. Ohno, M. Takahashi, K. Nakashima, Y. Fujino und H. Tsujimoto** (2013). Serum amyloid A as a prognostic marker in cats with various diseases. *J Vet Diagn Invest* 25(3): 428-432.

- Tamamoto, T., K. Ohno, Y. Goto-Koshino und H. Tsujimoto** (2014). Serum amyloid A promotes invasion of feline mammary carcinoma cells. *J Vet Med Sci* 76(8): 1183-1188.
- Tecles, F., S. M. Subiela, G. Petrucci, C. G. Panizo und J. J. Ceron** (2007). Validation of a commercially available human immunoturbidimetric assay for haptoglobin determination in canine serum samples. *Vet Res Commun* 31(1): 23-36.
- TerWee, J., A. Y. Lauritzen, M. Sabara, K. J. Dreier und K. Kokjohn** (1997). Comparison of the primary signs induced by experimental exposure to either a pneumotropic or a 'limping' strain of feline calicivirus. *Vet Microbiol* 56(1-2): 33-45.
- TerWee, J., M. Sabara, K. Kokjohn, J. Sandbulte, P. Frenchick und K. J. Dreier** (1998). Characterization of the systemic disease and ocular signs induced by experimental infection with Chlamydia psittaci in cats. *Vet Microbiol* 59(4): 259-281.
- Tillett, W. S. und T. Francis** (1930). Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of Pneumococcus. *J Exp Med* 52(4): 561-571.
- Trey, J. E. und I. Kushner** (1995). The acute phase response and the hematopoietic system: the role of cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol* 21(1-3): 1-18.
- Tvarijonaviciute, A., J. J. Ceron, S. L. Holden, P. J. Morris, V. Biourge und A. J. German** (2012). Effects of weight loss in obese cats on biochemical analytes related to inflammation and glucose homeostasis. *Domest Anim Endocrinol* 42(3): 129-141.
- van der Linde-Sipman, J. S., T. A. Niewold, P. C. Tooten, M. de Neijs-Backer und E. Gruys** (1997). Generalized AA-amyloidosis in Siamese and Oriental cats. *Vet Immunol Immunopathol* 56(1-2): 1-10.
- Venco, L., W. Bertazzolo, G. Giordano und S. Paltrinieri** (2014). Evaluation of C-reactive protein as a clinical biomarker in naturally heartworm-infected dogs: a field study. *Vet Parasitol* 206(1-2): 48-54.
- Wei, W., Q. Liu, Y. Tan, L. Liu, X. Li und L. Cai** (2009). Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications. *Hemoglobin* 33(5): 370-377.
- Weingart, C., F. Lotz und B. Kohn** (2012a). Measurement of beta-hydroxybutyrate in cats with nonketotic diabetes mellitus, diabetic ketosis, and diabetic ketoacidosis. *J Vet Diagn Invest* 24(2): 295-300.
- Weingart, C., F. Lotz und B. Kohn** (2012b). Validation of a portable hand-held whole-blood ketone meter for use in cats. *Vet Clin Pathol* 41(1): 114-118.
- Woo, P., M. Edbrooke, J. Betts, G. Watson und P. Francis** (1993). Serum amyloid A gene regulation. *Acute phase proteins. Molecular biology, biochemistry and clinical application*. A. Mackiewicz, I. Kushner and H. Baumann. Boca Raton (FL), CRC Press. 1. ed.: 397-408.
- Xu, L., R. Badolato, W. J. Murphy, D. L. Longo, M. Anver, S. Hale, J. J. Oppenheim und J. M. Wang** (1995). A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion. *J Immunol* 155(3): 1184-1190.
- Yamamoto, S., T. Shida, S. Miyaji, H. Santsuka, H. Fujise, K. Mukawa, E. Furukawa, T. Nagae und M. Naiki** (1993). Changes in Serum C-Reactive Protein-Levels in Dogs with Various Disorders and Surgical Traumas. *Vet Res Commun* 17(2): 85-93.

Yamamoto, S., S. Miyaji, Y. Ashida, K. Otabe, E. Momotani und Y. Rikihisa (1994a). Preparation of anti-canine serum amyloid A (SAA) serum and purification of SAA from canine high-density lipoprotein. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 41(1-2): 41-53.

Yamamoto, S., T. Shida, T. Okimura, K. Otabe, M. Honda, Y. Ashida, E. Furukawa, M. Sarikaputi und M. Naiki (1994b). Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test. *Vet Q* 16(2): 74-77.

Yule, T. D., M. B. Roth, K. Dreier, A. F. Johnson, M. Palmer-Densmore, K. Simmons und R. Fanton (1997). Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. *Vaccine* 15(6-7): 720-729.

10 ANHANG

Anhang I: Tabellarische Darstellung von bisher publizierten Konzentrationen für AGP, SAA und Hp bei gesunden Katzen und die verwendete Messmethode.
 (AGP, saures α 1-Glykoprotein; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Hp, Haptoglobin; M, Median; MW, Mittelwert; R, Range; RI, Referenzintervall; SAA, Serum-Amyloid-A; SD, Standardabweichung; SRID; Single Radial Immunodiffusion; TIA, turbidimetrischer Immunassay)

Literatur	AGP		SAA		Hp	
	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Assay	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Assay	Konzentration (mg/ml)	Assay
Correa et al. 2001	M: 220 R: 100 – 440	SRID	-	-	-	-
Duthie et al. 1997	RI: 100 – 480	SRID	-	-	RI: 0,04 – 3,84	Spektrophotometrischer Assay, nicht kommerziell
Giordano et al. 2004	MW \pm SD: 1200 \pm 620	SRID	MW \pm SD: 10,21 \pm 8,32	ELISA	MW \pm SD: 1,3 \pm 0,64	Spektrophotometrischer Assay
Kajikawa et al. 1999	MW \pm SD: 244,1 \pm 96,1	SRID	MW \pm SD: 16,6 \pm 11,4	ELISA	MW \pm SD: 0,416 \pm 0,367	SRID
Kann et al. 2012	M: 515,0; MW \pm SD: 532,8 \pm 204,1; R: 195 – 1120	SRID	M: 1,2 MW \pm SD: 1,8 \pm 2,3; R: 0,1 – 12,7	ELISA	M: 1,8 MW \pm SD: 2,5 \pm 2,1 R: 0,1 – 7,4	Spektrophotometrischer Assay
Sasaki et al. 2003	-	-	MW \pm SD: 0,6 \pm 1,06 R: \leq 0,34 – 3,6	ELISA	-	-
Selting et al. 2000	MW \pm SD: 501 \pm 377	SRID	-	-	-	-
Tamamoto et al. 2008	-	-	MW: 0,14 R: 0,0 - 0,9 RI: < 0,82	TIA für humanes SAA	-	-

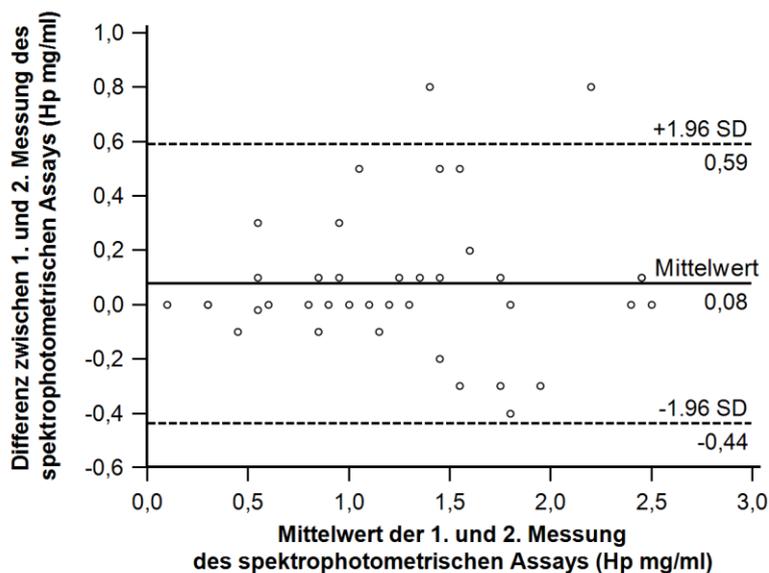
Anhang II: Auflistung der bisher untersuchten Erkrankungen und der gemessenen Akute-Phase-Proteine (AGP, saures α 1-Glykoprotein; Hp, Haptoglobin; SAA, Serum-Amyloid-A)

Erkrankung	Untersuchte APP	Literatur
Amyloidose bei orientalischen Katzen	SAA*	DiBartola et al., 1989; Paltrinieri et al., 2015
Anämie bei entzündlichen Erkrankungen (lokale purulente Prozesse)	AGP, Hp, Albumin	Ottenjann et al., 2006
Bronchopneumonie	SAA	Tamamoto et al., 2008
Cholangitis	SAA	Tamamoto et al., 2008; Tamamoto et al., 2013
Dermatitis	SAA	Tamamoto et al., 2013
Diabetes mellitus	SAA	Sasaki et al., 2003; Tamamoto et al., 2008; Tamamoto et al., 2013
Epilepsie	SAA	Tamamoto et al., 2013
Experimentelle Entzündung	AGP, SAA, Hp	Harvey und Gaskin et al., 1978; Kajikawa et al., 1999
Felines Asthma	SAA	Tamamoto et al., 2013
Feline Calicivirus Infektion	AGP	TerWee et al., 1997
Feline Chlamydiose	AGP, SAA	TerWee et al., 1998; Strom Holst et al., 2011
Feline Coronavirus-Infektion: nicht-symptomatisch	AGP*, SAA, Hp	Ceciliani et al., 2004; Giordano et al., 2004; Paltrinieri et al., 2007b
Felines Immunodefizienz-Virus (FIV)	AGP*, SAA, Hp, CRP, Albumin	Duthie et al., 1997; Paltrinieri et al., 2012; Gil et al., 2014; Kann et al., 2014; Leal et al., 2014
Feline Infektiöse Peritonitis (FIP)	AGP*, SAA, Hp	Harvey und Gaskin, 1978; Stoddart et al., 1988; Duthie et al., 1997; Kajikawa et al., 1999; Ceciliani et al., 2004; Giordano et al., 2004; Bence et al., 2005; Ceciliani und Pocacqua, 2007; Paltrinieri et al., 2007a; Paltrinieri et al., 2008; Paltrinieri et al., 2012
Felines Leukämie-Virus (FeLV)	AGP*	Duthie et al., 1997; Pocacqua et al., 2005
Gastroenteritis	SAA	Tamamoto et al., 2008; Tamamoto et al., 2013
Harnwegserkrankungen	SAA	Sasaki et al., 2003; Tamamoto et al., 2013
Hepatitis	SAA	Tamamoto et al., 2013
Hospitalisation	AGP, SAA, Hp	Kajikawa et al., 1999
Hyperthyreoidismus	SAA	Tamamoto et al., 2008; Tamamoto et al., 2013
Immunhämolytische Anämie	SAA	Tamamoto et al., 2008
Kardiomyopathie	SAA	Tamamoto et al., 2013
Lymphom	AGP, SAA	Correa et al., 2001; Tamamoto et al., 2008
Mykoplasmen-Infektion	AGP, SAA, Hp	Korman et al., 2012
Neoplasie	AGP, SAA	Selting et al., 2000; Sasaki et al., 2003; Hansen et al., 2006; Paltrinieri et al., 2012; Tamamoto et al., 2013; Tamamoto et al., 2014; Meachem et al., 2015
Nephropathie	SAA	Sasaki et al., 2003; Tamamoto et al., 2008; Tamamoto et al., 2013
Operativer Eingriff	AGP, SAA, Hp	Kajikawa et al., 1999; Sasaki et al., 2003; Moldal et al., 2012
Pankreatitis	AGP, SAA	Tamamoto et al., 2008; Tamamoto et al., 2009; Meachem et al., 2015
Rhinitis	SAA	Tamamoto et al., 2013
Splenektomie	Hp	Harvey und Gaskin, 1978
Verletzung	SAA	Sasaki et al., 2003

*Strukturelle Veränderungen der Proteine wurden ebenfalls nachgewiesen.

Anhang III: Wiederholbarkeit nach Bland und Altman für 39 feline Serumproben gemessen als Duplikate im spektrophotometrischen Assay ohne Rückrechnung der verdünnten Proben.

Die durchgehende schwarze Linie stellt den Mittelwert der Differenzen zwischen den Doppelmessungen der gleichen Probe, die 2 gestrichelten Linien stellen den Mittelwert der Differenzen $\pm 1,96 \times$ Standardabweichung (SD) des Mittelwertes der Differenz dar. Der Mittelwert der Differenzen zwischen den Doppelmessungen war 0,08 mg/ml mit einem 95% Konfidenzintervall (95% CI) von -0,01 – 0,16 mg/ml. SD war 0,26 mg/ml, die obere bzw. untere Grenze betrug 0,59 mg/ml resp. -0,44 mg/ml (95% CI 0,44 – 0,74 mg/ml bzw. -0,58 bis -0,29 mg/ml). Zwei Proben (d.h. 5% von 39 Serumproben) lagen außerhalb der oberen Grenze. Ohne Rückrechnung der verdünnten Proben ($n = 14$) wies der spektrophotometrische Assay eine akzeptable Wiederholbarkeit auf. (Hp, Haptoglobin; SD, Standardabweichung)



Anhang IV: Tabellarische Darstellung des Signalements der gesunden Katzen (n = 27) und erkrankten Katzen (n = 26).

(BKH, Britisch Kurzhaar; EKH, Europäisch Kurzhaar; FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease; m, männlich; mk, männlich kastriert; n, Anzahl der Katzen; Norw. WK, Norwegische Waldkatze; SD, Standardabweichung; w, weiblich; wk, weiblich kastriert)

Gruppe		Klinisch gesunde Katzen	Obstruktive FLUTD	Diabetes mellitus
Anzahl der Katzen (n)		27	16	10
Geschlecht (n)		mk (13), wk (12), m (1), w (1)	mk (16)	mk (5), wk (4), w (1)
Rassen		EKH (19), BKH (2), Maine-Coon (2), Maine-Coon-Mix (2), Perser (1), Ragdoll (1)	EKH (8), Norw. WK (2), Perser (2), BKH (1), Karthäuser (1), Karthäuser-Mix (1), Maine-Coon (1)	EKH (8), BKH (1), Perser (1)
Alter in Jahren	Median	5,0	8,0	11,0
	Mittelwert	4,9	7,1	10,7
	SD	3,5	2,8	3,4
	Minimum	0,5	3,0	6,0
	Maximum	12	11,0	16,0
	Shapiro-Wilk-Test: p	0,021	0,058	0,64

Anhang V: Tabellarische Darstellung des Signalements der erkrankten Katzen (n = 26) nach Gruppen unterteilt.

(BKH, Britisch Kurzhaar; DM, Diabetes mellitus; EKH, Europäisch Kurzhaar; FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease; m, männlich; mk, männlich kastriert; n, Anzahl der Katzen; Norw. WK, Norwegische Waldkatze; SD, Standardabweichung; w, weiblich; wk, weiblich kastriert)

Gruppe		FLUTD _{unkompliziert}	FLUTD _{kompliziert}	DM _{unkompliziert}	DM _{kompliziert}
Anzahl der Katzen (n)		7	9	4	6
Geschlecht (n)		mk (7)	mk (9)	mk (4)	wk (4), mk (1), w (1)
Rassen		EKH (3), BKH, Karthäuser-Mix, Norw. WK, Perser (je 1)	EKH (5), Karthäuser, Maine-Coon, Norweg. WK, Perser (je 1)	EKH (4)	EKH (4), BKH, Perser (je 1)
Alter in Jahren	Median	8,0	9,0	11,0	11,0
	Mittelwert	6,1	7,8	11,0	10,5
	SD	2,3	3,1	5,2	2,1
	Minimum	3	3	6	8
	Maximum	8	11	16	13
	Shapiro-Wilk-Test: p	0,008	0,11	0,15	0,25

Anhang VI: Beschreibung der an obstruktiver FLUTD und an Diabetes mellitus erkrankten Katzen.
(DM, Diabetes mellitus; FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease; n, Anzahl der Katzen)

Gruppe (n)		Obstruktive FLUTD (n = 16)		Diabetes mellitus (n = 10)	
Gruppe		FLUTD _{unkompliziert}	FLUTD _{kompliziert}	DM _{unkompliziert}	DM _{kompliziert}
Anzahl der Katzen (n)		7	9	4	6
Anzahl (n) verstorbener/euthanasierter Katzen		0	2	1	3
Diagnostizierte Vorerkrankungen (n Katzen)*		Futtermittel-Allergie (1), Katzenschnupfen (1), Obstruktive FLUTD (1)	Akute Zystitis (2), Rezidivierende Zystitiden (1)	Pankreatitis (3), DKA (2), Hyperthyreose (2), Futtermittel-Allergie (1)	Kardiomyopathie (1), Nephropathie (1)
Weitere Primär- und/oder Sekundärerkrankungen**			Anämie unter Therapie (6), Pankreatitis (2), Bakterielle Harnwegsinfektion*** bei Erstvorstellung (2) und nach Therapie (1), Rezidiv Harnabsatzbeschwerden nach Operation (2), Thoraxerguss (1), Lungenödem (1)	Hüftarthrose (1), Zystitis (1)	Anämie unter Therapie (5), Hepatopathie (5), Pankreatitis (4), Bakterielle Harnwegsinfektion*** (2), Nephropathie (1)
Anzahl der stationären Betreuung****	Median	5	10	für Glukose-Tagesprofil je 1 Tag	8
	Minimum	4	7		6
	Maximum	14	28		9
Anzahl der gemessenen Proben (n Katzen)		2 Proben (6), 3 Proben (1)	2 Proben (5), 3 Proben (2), 6 Proben (2)	2 Proben (2), 3 Proben (1), 5 Proben (1)	2 Proben (2), 3 Proben (2), 4 Proben (2) } davon 6 Tagesprofile (4)

* zum Zeitpunkt der Erstvorstellung diagnostizierte akute (innerhalb der letzten 14 Tage) oder chronische Erkrankungen; ** Primär- und/oder Sekundärerkrankungen, welche nach Erstvorstellung diagnostiziert wurden; *** Keimgehalt im Katheterharn $\geq 10^4$ CFU/ml; **** exklusive der verstorbenen/euthanasiierten Katzen.

Anhang VII: Auflistung der an obstruktiver FLUTD und an Diabetes mellitus erkrankten Katzen.

(BKH, Britisch Kurzhaar; DK, Diabetische Ketose; DKA, Diabetische Ketoazidose; DM, Diabetes mellitus; EKH, Europäisch Kurzhaar; FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease; inkl., inklusive; m, männlich; mk, männlich kastriert; Norw. WK, Norwegische Waldkatze; w, weiblich; wk, weiblich kastriert)

		Alter in Jahren	Ge- schlecht	Rasse	Diagnostizierte Vorerkrankungen*	Weitere Primär- und/oder Sekundärerkrankungen**	Anzahl der Tage der stationären Betreuung (inkl. Reeeinstellungen)	Anzahl der Proben
FLUTD _{unkompliziert}	Katze 1	8	mk	BKH	-	-	5	2
	Katze 2	3	mk	EKH	-	-	6	2
	Katze 3	4	mk	Norw. WK	-	-	4	2
	Katze 4	8	mk	Karthäuser- Mix	-	-	9	2
	Katze 5	8	mk	EKH	5 Tage vor Erstvorstellung in Behandlung wegen obstruktiver FLUTD	-	14	3
	Katze 6	8	mk	EKH	Futtermittel-Allergie	-	5	2
	Katze 7	4	mk	Perser	Katzenschnupfen	-	4	2
FLUTD _{kompliziert}	Katze 8	7	mk	EKH	Rezidivierende Zystitiden	Anämie, Rezidiv Harnabsatz- beschwerden nach Operation	7	2
	Katze 9	11	mk	EKH	-	Anämie	10	2
	Katze 10	3	mk	EKH	Akute Zystitis	Anämie, Pankreatitis, Bakterielle Harnwegs- infektion*** bei Erstvorstellung	20	6
	Katze 11	9	mk	Perser	Akute Zystitis	Bakterielle Harnwegs- infektion*** bei Erstvorstellung, Inappetenz und Rezidiv Harn- absatzbeschwerden nach Operation	9	3
	Katze 12	7	mk	Norw. WK	-	Anämie, Pankreatitis	28	6
	Katze 13 †	11	mk	EKH	-	Thoraxerguss	6	2
	Katze 14 †	10	mk	Maine-Coon	-	Lungenödem	4	2
	Katze 15	3	mk	EKH	-	Anämie, Bakterielle Harn- wegsinfektion*** nach Therapie	13	3
	Katze 16	9	mk	Karthäuser	-	Anämie	7	2

DM_{unkompliziert}	Katze 17	15	mk	EKH	Hyperthyreose, Pankreatitis	-	für Glukose- Tagesprofil: 1	3
	Katze 18	6	mk	EKH	Pankreatitis, DKA	-	für Glukose- Tagesprofil: 1	2
	Katze 19 †	16	mk	EKH	Futtermittel-Allergie, Hyperthyreose	Hüftarthrose , Zystitis	für Glukose- Tagesprofil: 1	2
	Katze 20	7	mk	EKH	Pankreatitis, DKA	-	für Glukose- Tagesprofil: 1	5
DM_{kompliziert}	Katze 21	11	wk	EKH	-	Anämie, Bakterielle Harnwegs- infektion***, Hepatopathie, Pankreatitis	8	4
	Katze 22	11	wk	EKH	-	Anämie, Bakterielle Harnwegs- infektion***, Hepatopathie, Nephropathie, Pankreatitis	9	3
	Katze 23	12	wk	EKH	Nephropathie	Anämie, Hepatopathie, Pankreatitis	6	4
	Katze 24 † ****	13	mk	BKH	Kardiomyopathie	-	-	2
	Katze 25 †	8	wk	EKH	-	Anämie, Hepatopathie, Pankreatitis	13	3
	Katze 26 †	8	w	Perser	-	Anämie, Hepatopathie	3	2

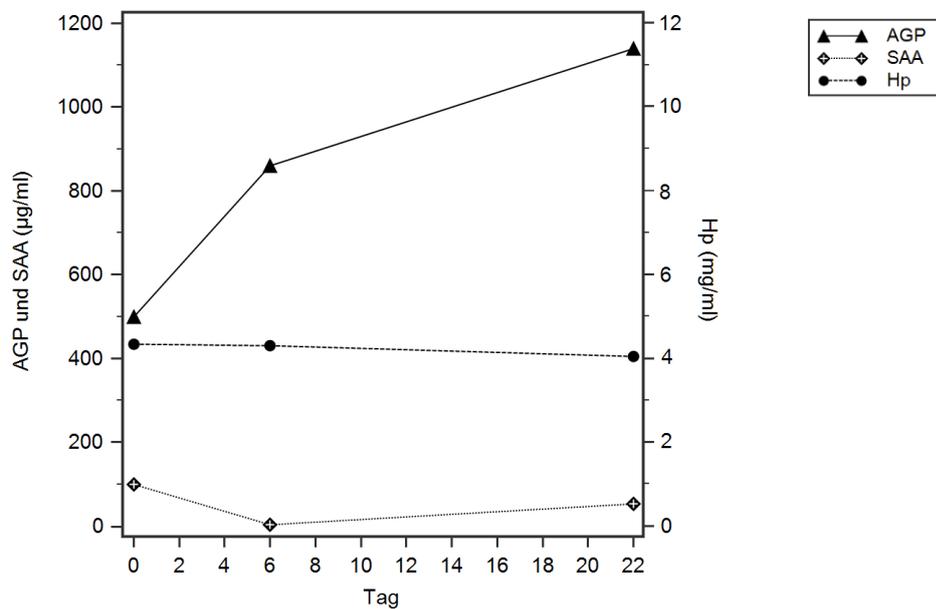
* zum Zeitpunkt der Erstvorstellung; ** Primär- und/oder Sekundärerkrankungen, welche nach Erstvorstellung diagnostiziert wurden; *** Keimgehalt im Katheterharn $\geq 10^4$ CFU/ml; **** Bei dieser Katze wurde eine DK mit einer β -HB-Konzentration von 5,8 mmol/l diagnostiziert. Da sich die Besitzer aus finanziellen Gründen für eine Euthanasie entschieden, wurde keine weitere Diagnostik (inkl. venöser Blutgasmessung) durchgeführt; † Katze verstorben.

Anhang VIII: Anpassungsgüte der verallgemeinerten linearen Modelle

(AGP, saures α 1-Glykoprotein; Hp, Haptoglobin; SAA, Serum-Amyloid-A; QICC, Quasi-likelihood under Independence Model Criterion)

Abhängige Variable	Unabhängige Variable(n)	QICC
$[AGP]_{Tag\ x} - [AGP]_{Tag\ 0}$ (μ g/ml)	Gruppe und Tag der Probenentnahme	3,23
$[SAA]_{Tag\ x} - [SAA]_{Tag\ 0}$ (μ g/ml)	Gruppe und Tag der Probenentnahme	45947,7
	Gruppe	60609,8
$[Hp]_{Tag\ x} - [Hp]_{Tag\ 0}$ (mg/ml)	Gruppe und Tag der Probenentnahme	105,645
	Tag der Probenentnahme	120,3

Anhang IX: Verlaufprofil von AGP, SAA und Hp für Katze 25. Die Konzentrationen für AGP und SAA sind auf der linken y-Achse, die Konzentrationen für Hp auf der rechten y-Achse aufgetragen. Die Tage der 3 Probenentnahmen sind durch Symbole dargestellt. Am Tag 0 wurde der Patient vorstellig wegen einer diabetischen Ketoazidose (DKA). Die 2. Probenentnahme erfolgte während der stationären Betreuung. 1 Woche nach der 2. Probenentnahme wurde die Katze aufgrund einer erfolgreichen Behandlung nach Hause entlassen. Am Tag der 3. Probenentnahme wurde sie erneut wegen einer DKA vorstellig. Die SAA-Konzentration am Tag 0 war $> 100 \mu$ g/ml. SAA-Werte $> 100 \mu$ g/ml wurden auf 100μ g/ml festgesetzt.
(AGP, saures α 1-Glykoprotein; Hp, Haptoglobin; SAA, Serum-Amyloid-A)



11 PUBLIKATIONSLISTE

Wissenschaftlicher Artikel

Stiller, J., Jasensky, A.-K., Hennies, M., Einspanier, R. und B. Kohn (2016): „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of feline haptoglobin.“ *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 28(3): 235-243.

Vorträge

Stiller, J., Jasensky, A.-K., Hennies, M., Wienen, C., Einspanier, R. und B. Kohn (2014): „Evaluierung eines neuen Sandwich-ELISAs zur Messung des feline Haptoglobins.“ 22. Jahrestagung der Fachgruppe „Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik“ der DVG (InnLab), Gießen, 31.01.-01.02.2014.

Stiller, J., Jasensky, A.-K., Hennies, M., Einspanier, R. und B. Kohn (2015): „Bedeutung von Akute-Phase-Proteinen als Biomarker bei Katzen mit ‚Feline Lower Urinary Tract Disease‘.“ 23. Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik" der DVG (InnLab), Leipzig, 23.01.-24.01.2015.

Posterbeiträge

Stiller, J., Jasensky, A.-K., Hennies, M., Wienen, C., Einspanier, R. und B. Kohn (2014): "Validation of a new sandwich-ELISA to measure feline haptoglobin." 24. Kongress des „European College of Veterinary Internal Medicine - Companion Animals“ (ECVIM-CA), Mainz, 04.09.-06.09.2014.

Abstracts

Stiller, J., Jasensky, A.-K., Hennies, M., Wienen, C., Einspanier, R. und B. Kohn (2014): „Evaluierung eines neuen Sandwich-ELISAs zur Messung des feline Haptoglobins.“ *Tierärztliche Praxis Kleintiere* Heft 1/2014, A7.

Stiller, J., Jasensky, A.-K., Hennies, M., Wienen, C., Einspanier, R., Kohn, B. (2015): „Validation of a new sandwich-ELISA to measure feline haptoglobin.“ *Research Communications of the 24th ECVIM-CA Congress. Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29: 473.

Stiller, J., Jasensky, A.-K., Hennies, M., Einspanier, R. und B. Kohn (2015): „Bedeutung von Akute-Phase-Proteinen als Biomarker bei Katzen mit ‚Feline Lower Urinary Tract Disease‘.“, *Tierärztliche Praxis Kleintiere* Heft 1/2015, A 6.

12 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Kohn und Herr Prof. Dr. Dr. Einspanier bedanken für die Vergabe eines sehr interessanten Promotionsthemas und für die gute wissenschaftliche Betreuung von den Anfängen bis zur Fertigstellung der Dissertation. Danke für die wertvollen und anregenden Ratschläge sowie für die Hilfe und Unterstützung, die ich sowohl in der Klinik für kleine Haustiere als auch am Institut für Veterinär-Biochemie in jeder Phase dieser Arbeit erhalten habe.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Jasensky. Vielen Dank für die globale wissenschaftliche Hilfe von der Probensammlung hin zur statistischen Auswertung, für die freundschaftliche Unterstützung, das Engagement und die Begeisterung!

Bei Frau Wippermann, Herr Dr. Hennies und seinem Team der TECOmedical Group möchte ich mich herzlich bedanken für die Hilfe bei der Validierungsstudie. Danke für die wertvollen und kompetenten Tipps.

Frau Dr. Merle aus dem Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biochemie möchte ich danken für die statistische Unterstützung zur Auswertung der klinischen Studie, insbesondere der Verlaufsmessungen.

Ich danke allen Mitarbeitern der Klinik für kleine Haustiere, die mir bei der Probensammlung und bei allen klinischen Fragen immer tatkräftig geholfen haben. Danke für eine spannende und lehrreiche Zeit sowie für viele unvergessliche Momente!

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter des Instituts für Veterinär-Biochemie, welche mich stets mit viel Geduld und Kompetenz bei den Messungen und Auswertungen unterstützt haben.

Meiner Familie und meinen Freunden ein großes Dankeschön für die schönsten Ablenkungen!

13 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, Jenny Stiller, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 06. September 2016

Jenny Stiller