

Validierung eines Ketonkörpermessgerätes für den Einsatz bei Katzen

von Carolin Hahn

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

**Validierung eines Ketonkörpermessgerätes für den
Einsatz bei Katzen**

von Carolin Hahn

aus Düsseldorf

München 2017

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

Lehrstuhl: Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

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

Mitbetreuung durch: Dr. Astrid Wehner

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Tag der Promotion: 11. Februar 2017

Meiner Familie und P.o.A.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | LITERATURÜBERSICHT | 2 |
| 1. | Bedeutung der Ketonkörpermessung bei der Katze | 2 |
| 1.1. | Ursachen und Regulation der Ketonkörperbildung..... | 2 |
| 1.1.1. | Physiologische Ursachen und Bedeutung der Ketonkörperbildung..... | 8 |
| 1.1.2. | Pathologische Ursachen der Ketonkörperbildung..... | 12 |
| 1.2. | Abbau und Exkretion der Ketonkörper | 16 |
| 2. | Technische Möglichkeiten der Ketonkörpermessung..... | 20 |
| 2.1. | Ketonkörpermessung im Urin | 20 |
| 2.2. | Ketonkörpermessung im Plasma und Serum | 23 |
| 2.2.1. | Goldstandard der β -Hydroxybutyratmessung | 25 |
| 2.2.2. | Portable Ketonkörpermessgeräte..... | 25 |
| 2.2.2.1. | Portable Ketonkörpermessgeräte in der Humanmedizin..... | 27 |
| 2.2.2.2. | Portable Ketonkörpermessgeräte zum Einsatz bei Katzen..... | 28 |
| III. | MATERIAL UND METHODEN | 33 |
| 1. | Studienziel und Material | 33 |
| 1.1. | Gruppenzuordnung..... | 33 |
| 1.2. | Patientengut | 34 |
| 2. | Methoden..... | 39 |
| 2.1. | Probengewinnung..... | 39 |
| 2.1.1. | Blutproben..... | 39 |
| 2.1.1.1. | Venöse Blutproben..... | 40 |
| 2.1.1.2. | Kapilläre Blutproben | 41 |
| 2.1.2. | Urinproben | 41 |
| 2.2. | Probenuntersuchung | 42 |
| 2.2.1. | Messung mittels der Referenzmethode | 43 |
| 2.2.2. | Messung mittels des portablen Ketonkörpermessgerätes..... | 44 |
| 2.2.3. | Messung mittels Nitroprussid-Urinteststreifen | 46 |
| 2.3. | Untersuchung einflussnehmender Parameter | 47 |
| 2.3.1. | Einfluss von Ethylendiamintetraacetat..... | 48 |
| 2.3.2. | Einfluss des Hämatokrits..... | 48 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.3.3. | Einfluss von Serumchemieparametern..... | 48 |
| 2.4. | Auswertung | 48 |
| 2.4.1. | Ausschluss von Proben..... | 49 |
| 2.4.2. | Statistische Tests | 49 |
| 2.4.2.1. | Regressionsanalyse und graphische Darstellung..... | 49 |
| 2.4.2.2. | Variationskoeffizient..... | 52 |
| 2.4.2.3. | Rangkorrelationskoeffizient nach Kendall-Tau | 52 |
| 2.4.2.4. | Receiver-Operating-Characteristic-Curve-Analyse | 52 |
| 2.4.2.5. | Exakter Fisher-Test | 53 |
| IV. | ERGEBNISSE | 54 |
| 1. | Referenzmethode..... | 54 |
| 1.1. | Intra-Assay-Präzision | 54 |
| 1.2. | Untersuchung einflussnehmender Parameter | 55 |
| 1.2.1. | Einfluss des Hämatokrits..... | 55 |
| 1.2.2. | Einfluss von Serumchemieparametern..... | 56 |
| 1.3. | Cut-off-Werte | 58 |
| 1.3.1. | Cut-off-Wert zur Diagnose einer diabetischen Ketoazidose..... | 58 |
| 1.3.2. | Cut-off-Wert zur Beurteilung der Diabetes-mellitus-Einstellung..... | 61 |
| 2. | GlucoMen® LX PLUS | 63 |
| 2.1. | Intra-Assay-Präzision | 64 |
| 2.2. | Validierung der Messwerte aus unterschiedlichen Blutprobenarten..... | 65 |
| 2.2.1. | Messung aus Proben venösen Vollblutes | 65 |
| 2.2.2. | Messung aus Proben kapillären Blutes..... | 69 |
| 2.3. | Untersuchung einflussnehmender Parameter | 73 |
| 2.3.1. | Einfluss von Ethylendiamintetraacetat..... | 74 |
| 2.3.2. | Einfluss des Hämatokrits..... | 77 |
| 2.3.3. | Einfluss von Serumchemieparametern..... | 78 |
| 2.4. | Cut-off-Werte | 79 |
| 2.4.1. | Cut-off-Wert zur Diagnose einer diabetischen Ketoazidose..... | 79 |
| 2.4.2. | Cut-off-Wert zur Beurteilung der Diabetes-mellitus-Einstellung..... | 82 |
| 3. | Nitroprussid-Urinteststreifen..... | 84 |
| 3.1. | Referenzmethode und Nitroprussid-Urinteststreifen-Untersuchung..... | 85 |
| 3.2. | GlucoMen® LX PLUS und Nitroprussid-Urinteststreifen-Untersuchung .. | 88 |

| | | |
|--------------|----------------------------------|------------|
| V. | DISKUSSION | 91 |
| VI. | ZUSAMMENFASSUNG | 111 |
| VII. | SUMMARY..... | 113 |
| VIII. | LITERATURVERZEICHNIS..... | 115 |
| IX. | DANKSAGUNG | 142 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Maßangaben:

| | |
|--------|--------------------|
| mmol/l | Millimol pro Liter |
| nm | Nanometer |
| µl | Mikroliter |

Sonderzeichen:

| | |
|---|--|
| ® | registered trademark (registrierte Warenmarke) |
| ™ | unregistered trademark (unregistrierte Warenmarke) |

Abkürzungen:

| | |
|-----------|---|
| AcAc | Acetoacetat |
| AcAcCoA-T | Acetoacetyl-CoA-Transferase/Thiolase |
| ACC | Acetyl-CoA-Carboxylase |
| ACE | angiotensin converting enzyme (Angiotensin-konvertierendes Enzym) |
| AG | anion gap (Anionenlücke) |
| AUC | area under curve (Fläche unter der Kurve) |
| βHB | β-Hydroxybutyrat (Beta-Hydroxybutyrat) |
| βHBDH | β-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase |
| βOx. | β-Oxidation (Beta-Oxidation) |
| bzw. | beziehungsweise |
| CNE | chronische Nierenerkrankung |
| CoA | Coenzym A |
| CPT | Carnitin-Palmitoyltransferase |

| | |
|-------------------------------|---|
| CV | Variationskoeffizient |
| DK | diabetische Ketose |
| DKA | diabetische Ketoazidose |
| DM | Diabetes mellitus |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| et al. | et alii (und andere) |
| FFS | freie Fettsäuren |
| GFR | glomeruläre Filtrationsrate |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| h | Stunden |
| H ⁺ | Wasserstoff |
| Handelsges. m. b. H. | Handelsgesellschaft mit beschränkter Haftung |
| HCO ₃ ⁻ | Bikarbonat |
| Hkt | Hämatokrit |
| HL | Hepatoslipidose |
| HMG-CoA | β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA |
| HMG-CoA-L | β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA-Lyase |
| HMG-CoA-S | β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA-Synthase |
| HSL | hormonsensitive Lipase |
| IBD | inflammatory bowel disease |
| k. A. | keine Angabe |
| Konz. | Konzentration |
| Ltd. | limited (Aktiengesellschaft im englischen Sprachraum) |
| Li-Heparin | Lithium-Heparin |
| MAT | methylacetoacetyl CoA thiolase |

| | |
|------------------|---|
| | (Acetoacetyl-CoA-Transferase/Thiolase) |
| max. | maximal |
| MW | Mittelwert |
| mittl. | mittlere |
| mRNA | messenger ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| n | Probenanzahl |
| NAD ⁺ | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert) |
| NADH | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert) |
| NDM | kein Diabetes mellitus |
| NKDM | nicht-ketotischer Diabetes mellitus |
| niedr. | niedrige |
| o. g. | oben genannt |
| PBGM | portables Blutglukosemessgerät/ portable Blutglukosemessgeräte |
| pCO ₂ | Kohlenstoffdioxidpartialdruck |
| POC-System | Point-of-Care-System (patientennahe Labordiagnostik) |
| ROC-Kurve | Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (Grenzwertoptimierungskurve) |
| SCOT | succinyl CoA oxoacid transferase (β-Ketoacyl-CoA-Transferase) |
| SD | standard deviation (Standardabweichung) |
| Sens. | Sensitivität |
| Spez. | Spezifität |
| TAG | Triacylglyzeride |
| u. a. | und andere |

| | |
|-------|--------------|
| V. | Vena |
| v. a. | vor allem |
| Wo. | Woche/Wochen |
| z. B. | zum Beispiel |

I. EINLEITUNG

Diabetes mellitus (DM) ist eine der häufigsten Endokrinopathien bei Katzen (PANCIERA et al., 1990; RAND & MARSHALL, 2005; SIEBER-RUCKSTUHL et al., 2008). Die diabetische Ketoazidose (DKA) stellt eine schwere Komplikation dieser Erkrankung dar, deren schnelle Diagnose und intensives Monitoring wichtig für die Prognose sind (BRUSKIEWICZ et al., 1997; CONNALLY, 2002). Der in der Veterinärmedizin heutzutage noch standardmäßig zur Diagnose verwendete Nitroprussid-Urinteststreifen zum Ketonkörpernachweis ist fehleranfällig und kann sowohl falsch positive, als auch falsch negative Ergebnisse liefern (CSAKO, 1987b). Laut der American Diabetes Association ist der Test nicht verlässlich (GOLDSTEIN et al., 2004). Dagegen haben sich portable Ketonkörpermessgeräte zur Messung von β -Hydroxybutyrat (β HB) in Kapillarblut bewährt (BYRNE et al., 2000; NAUNHEIM et al., 2006; ARORA et al., 2011). Auch veterinärmedizinische Studien belegen, dass diese Geräte bei der Katze eingesetzt werden können (WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). In bisherigen Studien wurden zwei portable Ketonometer aus der Humanmedizin für den Einsatz bei Katzen validiert (HOENIG et al., 2008; WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). Das Ziel der vorliegenden Studie war die Validierung eines weiteren humanmedizinischen Ketonometers für den Einsatz bei Katzen. Dieses benötigt weniger Probenmaterial als die beiden bisher getesteten. Die Validierung sollte im Vergleich mit den Ergebnissen, die mittels einer standardisierten Referenzmethode gemessen wurden, unter Berücksichtigung möglicher Einflüsse durch andere Laborparameter, erfolgen. Zusätzlich sollte ein Cut-off-Wert für β HB zur Diagnose einer DKA und zur Differenzierung zwischen einem gut und einem schlecht eingestellten DM ermittelt werden. Schließlich sollte die Übereinstimmung der Ergebnisse der β HB-Messung mittels Ketonometer (Vollblut) und Referenzmethode (Serum) mit den Ergebnissen des Ketonkörpernachweises mittels Nitroprussidteststreifen aus Urin verglichen werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Bedeutung der Ketonkörpermessung bei der Katze

Diabetes mellitus (DM) ist eine der häufigsten Endokrinopathien der Katze mit steigender Inzidenz (PANCIERA et al., 1990; RAND, 1999; PRAHL et al., 2007; SIEBER-RUCKSTUHL et al., 2008). Die diabetische Ketoazidose (DKA) stellt eine Komplikation des DM dar und kann bei Katzen mit einer hohen Mortalität einhergehen (BRUSKIEWICZ et al., 1997; CONNALLY, 2002). Die Diagnose der DKA erfolgt in der Veterinärmedizin standardmäßig durch den Ketonkörpernachweis mittels Urinteststreifen (BRADY et al., 2003; FELDMAN & NELSON, 2004; BARSANTI, 2011). Doch auch aus der Humanmedizin stammende portable Ketonometer zur Bestimmung des Ketonkörpers β -Hydroxybutyrat (β HB) aus Kapillarblut werden heutzutage zunehmend genutzt. (WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). Die Vorteile bestehen darin, dass mittels dieser portablen Geräte die β HB-Konzentration aus Voll- oder Kapillarblut bestimmt werden kann (ZEUGSWETTER et al., 2010; AROCH et al., 2012; WEINGART et al., 2012b, 2012a; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). Der Nachweis von β HB, des primären Ketonkörpers bei Vorliegen einer DKA, ist dem Nachweis des Ketonkörpers Acetoacetat (AcAc) in der Diagnose vorzuziehen (LAFFEL, 1999; HOENIG et al., 2008; ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009; ZEUGSWETTER et al., 2010; WEINGART et al., 2012b).

1.1. Ursachen und Regulation der Ketonkörperbildung

Die Produktion der Ketonkörper Aceton, AcAc und β HB, die sogenannte Ketogenese, ist essenziell, um dem Organismus in Zeiten eines Glukosemangels eine alternative Energiequelle bereitzustellen. Die Synthese der Ketonkörper erfolgt aus aktivierten Fettsäuren, in Form von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA), in den Mitochondrien der Hepatozyten, und, zu einer geringen Menge auch aus sogenannten „ketogenen“ Aminosäuren (FINK et al., 1988; FUKAO et al., 2004; BERG et al., 2014). Die Kontrolle der Ketogenese erfolgt durch das Hormon Insulin sowie seine Gegenspieler Glukagon, Cortisol, Somatotropin und die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin, die die Inhibition und Stimulation der beteiligten Enzyme steuern (MCGARRY & FOSTER, 1976; MCGARRY &

BROWN, 1997; LAFFEL, 1999). Der Ablauf und das Ausmaß der Ketogenese hängen von einem ausgeglichenen Verhältnis dieser Hormone ab, insbesondere dem Verhältnis von Glukagon zu Insulin (MCGARRY & FOSTER, 1976; MCGARRY & BROWN, 1997; LAFFEL, 1999).

Acetyl-CoA dient somit als Ausgangsstoff der Ketonkörper. Es entsteht während der β -Oxidation, dem Abbau der Fettsäuren, oder wird aus dem Glykolyseprodukt Pyruvat gebildet (BERG et al., 2014). Die weiteren Reaktionsschritte der Acetyl-CoA-Moleküle (im Zitratzyklus oder in der Ketogenese) sind abhängig von der zur Verfügung stehenden Menge an Oxalacetat, da Acetyl-CoA und Oxalacetat zuerst miteinander zum Zitrat kondensieren müssen, um in den Zitratzyklus eingehen zu können (KREBS, 1966; LAFFEL, 1999; BERG et al., 2014). Die Menge an Oxalacetat ist jedoch gekoppelt an die Glukoseverfügbarkeit und den -bedarf des Körpers (KREBS, 1966; BERG et al., 2014). Bei erhöhtem Glukosebedarf wird Oxalacetat zur Glukoneogenese verwendet, wodurch der Reaktionspartner für den Zitratzyklus fehlt und Acetyl-CoA in die Ketogenese eingeht (KREBS, 1966) (Abbildung 1).

In der Ketogenese wird aus 2 Molekülen Acetyl-CoA ein Molekül Acetoacetyl-CoA gebildet, aus dem im nächsten Schritt mittels β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA-Synthase (HMG-CoA-Synthase) ein Molekül β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) entsteht. Dieses wird anschließend durch Abspaltung von Acetyl-CoA zu Acetoacetat umgesetzt. Alternativ kann Acetoacetyl-CoA mittels der Acetoacetyl-CoA-Hydrolase direkt zu AcAc umgesetzt werden (BERG et al., 2014). Die Reaktionsschritte der Ketogenese sind in Abbildung 2 dargestellt.

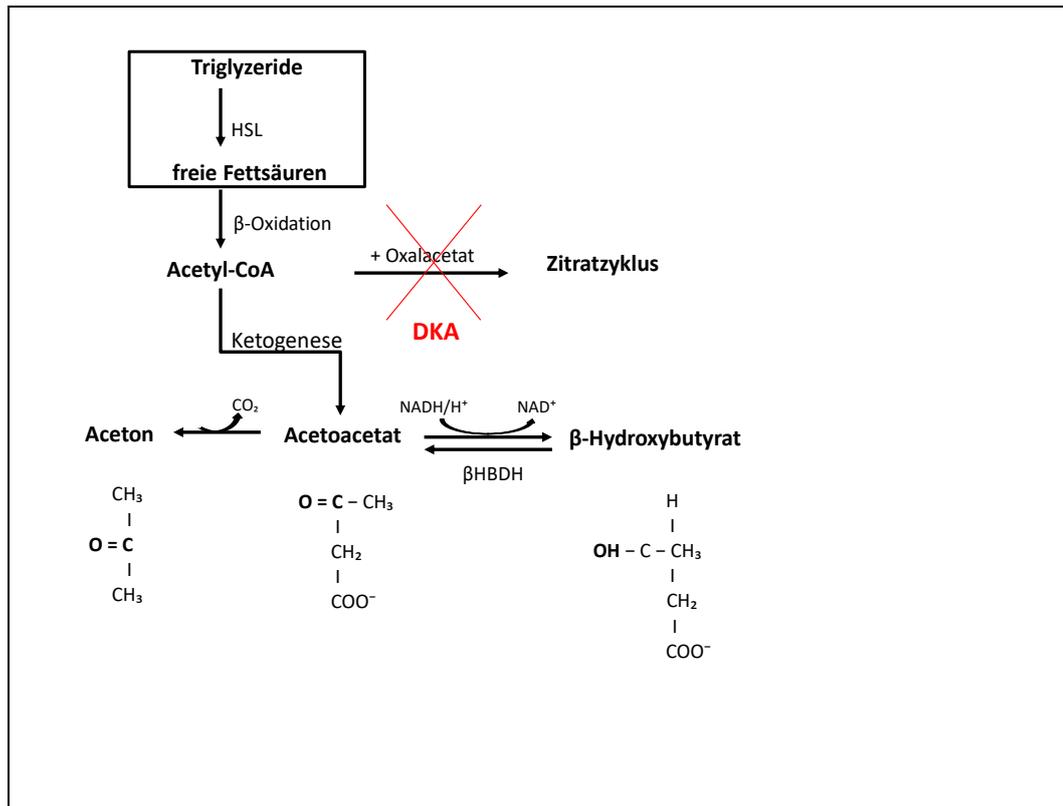


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der Ketogenese mit Darstellung der Strukturformeln der Ketonkörper. Im Falle eines Glukosemangels führt der Oxalacetatmangel dazu, dass Acetyl-CoA nicht in den Zitratzyklus eingeht, sondern in erster Linie in der Ketogenese genutzt wird (β HBDH = β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, CO_2 = Kohlenstoffdioxid, DKA = diabetische Ketoazidose, HSL = hormonsensitive Lipase, NAD^+ = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert), NADH/H^+ = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)) (modifiziert nach WALLACE & MATTHEWS, 2004).

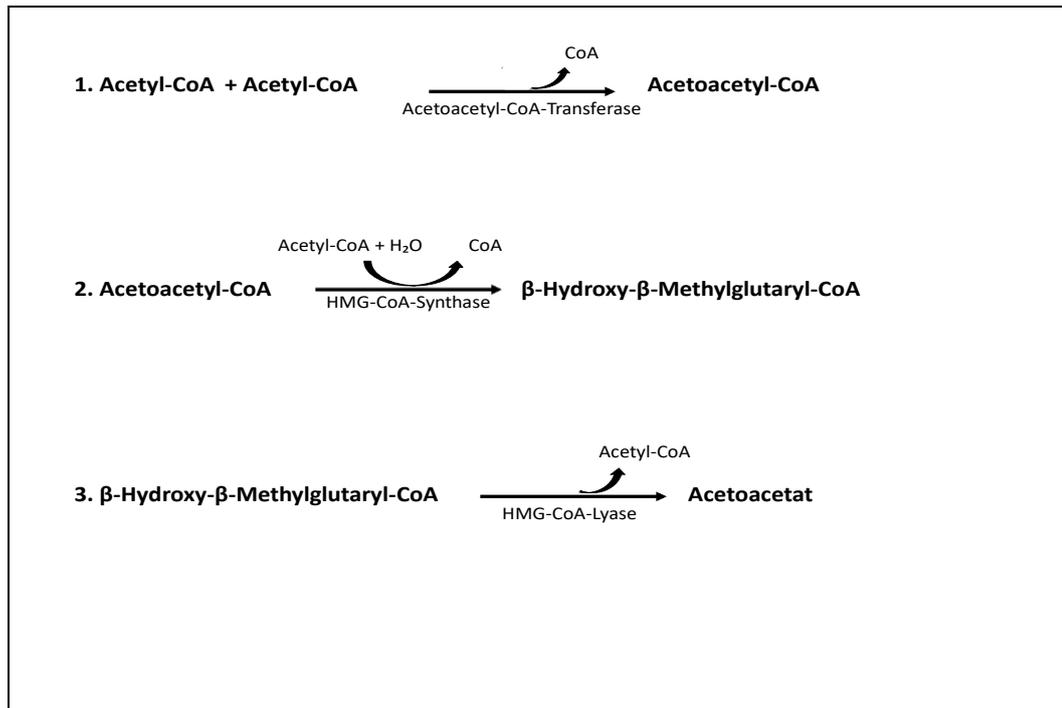


Abbildung 2: Reaktionsschritte der Ketogenese (CoA = Coenzym A, H₂O = Wasser, HMG-CoA-Lyase = β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA-Lyase, HMG-CoA-Synthase = β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA-Synthase) (modifiziert nach BERG et al., 2014).

Beta-Hydroxybutyrat entsteht schließlich durch die reversible Reduktion von AcAc, die durch die β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (β HBDH) vermittelt wird (BERG et al., 2014) (Abbildung 1). Diese Reaktion ist abhängig von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH/NAD⁺) und folgt dem jeweiligen Redoxpotential (NADH-NAD⁺-Verhältnis) in den hepatischen Mitochondrien (LAFFEL, 1999). Aceton dagegen entsteht aus der spontanen (enzymunabhängigen) Decarboxylierung von AcAc (GUTHRIE & JORDAN, 1972; MITCHELL et al., 1995; LAFFEL, 1999). Es wird unverändert über die Lungen abgeatmet, ohne den pH-Wert im Körper zu verändern und ist verantwortlich für den bei einer Ketose oder Ketoazidose teilweise wahrnehmbaren süßlich aromatischen Geruch (LAFFEL, 1999).

Die direkte Kontrolle der Ketonkörpersynthese erfolgt durch 3 Enzyme (Tabelle 1 und Abbildung 3). Hierzu gehören die hormonsensitive Lipase (HSL) in den Adipozyten des Fettgewebes, die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und die β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA-Synthase (HMG-CoA-Synthase), die beide in den Mitochondrien der Hepatozyten vorhanden sind (LAFFEL, 1999).

Tabelle 1: Kontrollenzyme der Ketogenese und ihre Beeinflussung durch Insulin und Glukagon (AcAc = Acetoacetat, ACC = Acetyl-CoA-Carboxylase, AcAc-CoA =

Acetoacetyl-CoA, CoA = Coenzym A, FFS = freie Fettsäuren, HMG-CoA-S = β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA-Synthase, HSL = hormonsensitive Lipase, TAG = Triacylglyceride) (modifiziert nach LAFFEL, 1999).

| Enzym | Aufgabe und Lokalisation | Insulinwirkung → Ketonkörper ↓ | Glukagonwirkung → Ketonkörper ↑ |
|--------------|--|--|---|
| HSL | Abbau von TAG zu FFS: Plasmakonzentration FFS ↑ (in Adipozyten) | Inhibition | Stimulation |
| ACC | Umwandlung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA (in Hepatozyten) | Stimulation | Inhibition |
| HMG-CoA-S | Umwandlung von AcAc-CoA zu AcAc (in Mitochondrien) | Inhibition | Stimulation |

Die HSL kontrolliert den ersten wichtigen Schritt in der Ketogenese. Das Enzym katalysiert den Abbau von Triacylglyceriden, und die dabei freigesetzten Fettsäuren liefern das Rohmaterial für die Synthese der Ketonkörper (BERG et al., 2014). Insulin hemmt die Aktivität der HSL durch Dephosphorylierung (DEGERMAN et al., 1997; HOLM et al., 2000), während Adrenalin und Glukagon das Enzym mittels Phosphorylierung aktivieren (HOLM et al., 2000; KRAEMER & SHEN, 2002). Dabei wird zusätzlich das Oberflächenprotein Perilipin, das die Fettzellen vor dem Abbau schützt, phosphoryliert, und ermöglicht so erst den Abbau durch die HSL (FUKAO et al., 2004). Die mittels HSL freigesetzten Fettsäuren können vielen Geweben, wie Leber, Herz, Nieren und Skelettmuskulatur, als Energiequelle dienen oder als Substrat in der Ketogenese genutzt werden (LAFFEL, 1999).

Die mitochondriale ACC ist ein weiteres wichtiges Enzym in der Ketogenese und setzt am Transportmechanismus der Fettsäuren zum Ort der β -Oxidation an. Dieses Enzym katalysiert die Decarboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, das als hemmendes Substrat der Carnitin-Palmitoyl-Transferase I (CPT I) eine zentrale Rolle in der Ketogenese spielt (LAFFEL, 1999; FUKAO et al.,

2004; BERG et al., 2014). Die CPT I ist nämlich für den Transport von Fettsäuren, in Form von Acyl-CoA-Molekülen, in das Mitochondrium zuständig. Ferner ist sie einer der limitierenden Faktoren der Ketogenese, da alle Fettsäuren, die in die Mitochondrien transportiert werden, in die β -Oxidation eingehen. Bei einer verstärkten Zufuhr von Fettsäuren entsteht ein Überschuss an Acetyl-CoA, das dann in die Ketogenese eingeht (KREISBERG, 1978; BERG et al., 2014). Insulin aktiviert die ACC mittels Dephosphorylierung und führt so zu einem Anstieg der Malonyl-CoA-Konzentration. Dies hemmt wiederum den Transport von Acyl-CoA in die Mitochondrien und damit die Zufuhr von Substraten für die β -Oxidation. Dagegen hemmt Glukagon die ACC durch Phosphorylierung und somit auch die Produktion von Malonyl-CoA. Dies ermöglicht den Fettsäuretransport ins Mitochondrium, und es kann ausreichend Acetyl-CoA für die Ketogenese entstehen (KUDO et al., 1995; LAFFEL, 1999; FUKAO et al., 2004).

Die HMG-CoA-Synthase katalysiert den letzten wichtigen Regulationsschritt der Ketogenese. Ihre Aktivität wird durch eine reversible Succinylierung gesteuert, die zu ihrer Deaktivierung führt (LOWE & TUBBS, 1985; QUANT et al., 1990). Die Menge an Succinyl-CoA und damit das Maß der Succinylierung unterliegt der Kontrolle von Glukagon (QUANT et al., 1989, 1990). Dieses bewirkt eine Reduktion der Succinyl-CoA-Konzentration und führt so zur Aktivierung der HMG-CoA-Synthase, wodurch die Ketonkörpersynthese ermöglicht wird (QUANT et al., 1989, 1990). Die folgende Abbildung zeigt die Regulation der Ketogenese durch die o. g. Kontrollenzyme (Abbildung 3).

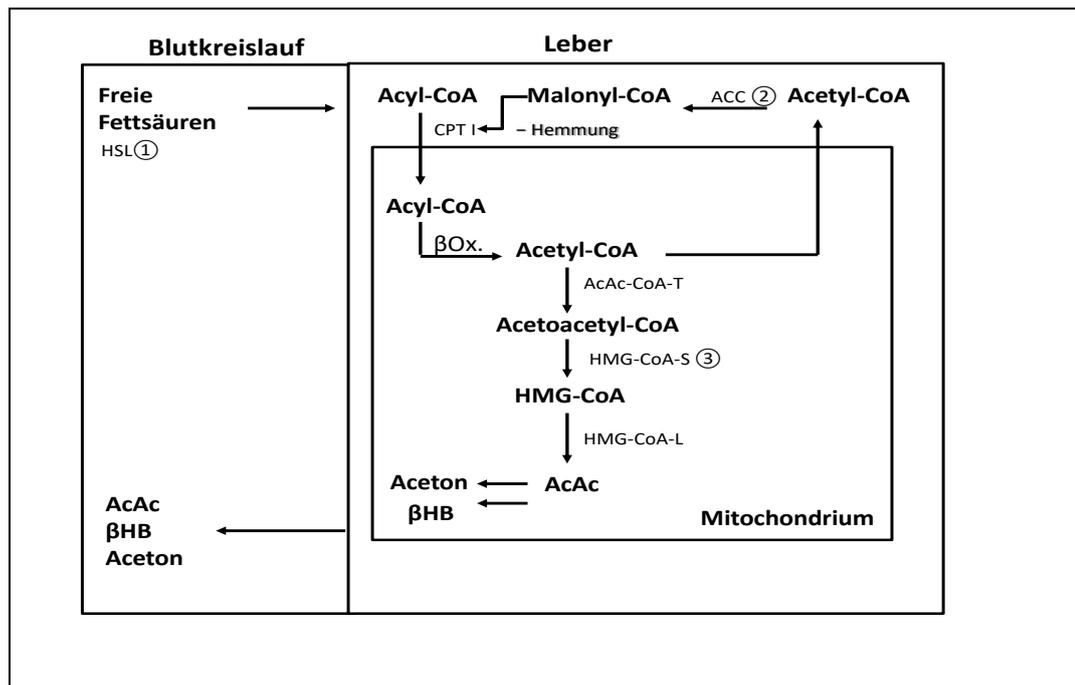


Abbildung 3: Schema der Ketogenese und ihrer Regulation mit den beteiligten Enzymen. Durch die Aktivierung der HSL ① kommt es zum Anstieg der freien Fettsäuren im Plasma, die in den Mitochondrien der Leber zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Die ACC ② katalysiert die Produktion von Malonyl-CoA, dem Substrat, das den Transport der Fettsäuren in die Mitochondrien hemmt. Der letzte Regulationschritt liegt bei der HMG-CoA-S ③. Insulin hemmt deren Aktivität, während Glukagon sie fördert und somit zur Bildung der Ketonkörper führt. Diese gelangen in den Blutkreislauf und werden zu den Organen transportiert (AcAc = Acetoacetat, ACC = Acetyl-CoA-Carboxylase, AcAc-CoA-T = Acetoacetyl-CoA-Transferase/Thiolase, βHB = β-Hydroxybutyrat, CPT I = Carnitin-Palmitoyl-Transferase I, HMG-CoA-L = β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA-Lyase, HMG-CoA-S = β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA-Synthase, HSL = hormonsensitive Lipase, ①, ②, ③ = erster, zweiter und dritter Kontrollschritt der Ketogenese) (modifiziert nach LAFFEL, 1999; STOJANOVIC & IHLE, 2011)

1.1.1. Physiologische Ursachen und Bedeutung der Ketonkörperbildung

Eine Produktion von Ketonkörpern findet auch im gesunden Körper statt. Eine Bildung der Ketonkörper im Hungerzustand, während sportlicher Betätigung (KOESLAG et al., 1980) und bei Neugeborenen oder in der Schwangerschaft ist als „physiologische Form der Ketose“ zu sehen (LAFFEL, 1999). Die physiologische Ketonkörperbildung im Hungerzustand ist ein wichtiger Vorgang, um die Energieversorgung des Körpers, insbesondere die des Nervensystems, zu gewährleisten (OWEN et al., 1967; CAHILL & OWEN, 1968). Dieser Mechanismus ermöglicht dem Körper auch längere Phasen des Hungerns zu überstehen und Körperfunktionen aufrechtzuerhalten (BESSION et al., 2006). Vor allem das Gehirn ist bei Energiemangel von einer anderen Quelle, neben Glukose

und Fettsäuren, abhängig (OWEN et al., 1967; OWEN & REICHARD, 1975), denn aufgrund der für Fettsäuren undurchlässigen Blut-Hirn-Schranke kann das Gehirn, im Gegensatz zu anderen Geweben, diese nicht direkt zur Deckung seines Energiebedarfes nutzen (PARDRIDGE, 1991; LAFFEL, 1999; FUKAO et al., 2004). Ketonkörper dagegen sind wasserlöslich und können diese Schranke über spezifische Transportproteine passieren (GJEDDE & CRONE, 1975; HAWKINS & BIEBUYCK, 1979; CONN et al., 1983; RUDERMAN et al., 2005). Auf diese Weise können in längeren Hungerphasen fast zwei Drittel der vom Gehirn benötigten Energie gedeckt werden (LAFFEL, 1999). Außerdem können durch die Verstoffwechslung von Ketonkörpern der Verbrauch der noch zur Verfügung stehenden Glukose gesenkt und der Abbau von körpereigenem Protein, dessen Aminosäuren sonst in die Glukoneogenese eingehen würden, reduziert werden (SHERWIN et al., 1975; NAIR et al., 1988; BALASSE & FERY, 1989; LAFFEL, 1999).

Der Mechanismus hinter der Stimulation der Ketogenese ist in einer transienten oder bleibenden Energiemangelsituation (Glukosemangel) des Körpers zu sehen (LAFFEL, 1999). Auch sogenannte „ketogene Diäten“ mit hohem Fett- und niedrigem Kohlenhydratanteil können zur Bildung einer Hyperketonämie führen (LAFFEL, 1999; FUKAO et al., 2004). Die o. g. physiologischen Formen der Ketose zeichnen sich normalerweise durch eine milde bis moderate Hyperketonämie und einen normalen pH-Wert aus (ausgenommen davon sind schwerere Formen der Schwangerschaftsketose) (LAFFEL, 1999; WYCKOFF & ABRAHAMSON, 2005). Die Anpassung des Stoffwechsels wird nicht nur durch Insulin und seine Gegenspieler (Glukagon, Adrenalin, Noradrenalin, Cortisol, Somatotropin), sondern auch durch weitere Hormone reguliert. Studien deuten darauf hin, dass es im Hungerzustand zum einen zu einer Abnahme der Schilddrüsenhormonaktivität kommt (GOODMAN et al., 1980; EVINGER & NELSON, 1984). Aber auch Leptin, das dem Fettgewebe entstammt, scheint eine Rolle bei der Adaption des Stoffwechsels an eine dauerhaft erniedrigte Kalorienzufuhr zu spielen (AHIMA et al., 1996; SPIEGELMAN & FLIER, 2001; RUDERMAN et al., 2005).

Menschen zeigen eine relativ starke Neigung zur Ketonkörperbildung (OWEN et al., 1967). Während längerer Nahrungskarenz konnten Ketonkörperkonzentrationen von 7–12 mmol/l gemessen werden (OWEN et al.,

1969; FERY & BALASSE, 1985). Dagegen scheinen Katzen eine weniger stark ausgeprägte Ketonkörperbildung in Hungerphasen zu zeigen (BIOURGE et al., 1994b; DOBENECKER et al., 1998; BLANCHARD et al., 2002; ZEUGSWETTER et al., 2010). Nach mehrstündigem Fasten über Nacht (bis max. 16 Stunden) ergaben sich bei gesunden adulten Katzen in unterschiedlichen Studien β HB-Werte von 0–0,49 mmol/l (PAZAK et al., 1998; ZEUGSWETTER et al., 2010; AROCH et al., 2012; WEINGART et al., 2012a). Deutlich höhere β HB-Werte wurden in diesen Studien nur bei kranken Tieren gemessen. Es wurden jedoch zum Teil keine Angaben gemacht, ob oder wie lange eine Anorexie bei den kranken Katzen vorlag oder wie lange die Katzen gefastet hatten (PAZAK et al., 1998; ZEUGSWETTER et al., 2010; WEINGART et al., 2012a; GORMAN et al., 2016).

Während längerer Hungerphasen steigt die Ketonkörperkonzentration auch bei Katzen zunehmend an (BIOURGE et al., 1994b; BLANCHARD et al., 2002), erreicht jedoch nicht die Ketogeneserate, die beim Menschen in dieser Zeitspanne (5–6 Wochen) zu verzeichnen ist (OWEN et al., 1969; FERY & BALASSE, 1985). In einem Versuchsvorhaben zur experimentellen Induktion einer Hepatolipidose (HL), bei dem Katzen nach einer gewünschten Gewichtszunahme einer mehrwöchigen Reduktionsdiät ausgesetzt waren, die zu einem Energiemangel der Tiere führte, waren nach 3 Wochen β HB-Konzentrationen von $1,7 \pm 0,7$ mmol/l zu messen (BLANCHARD et al., 2002). Nach Manifestation einer HL stiegen die Werte auf $3,1 \pm 0,5$ mmol/l an (BLANCHARD et al., 2002). In einem Versuch von BIOURGE et al. (1994b) wurden nach fünf- bis sechswöchigem Fasten von übergewichtigen Katzen mit Entwicklung einer HL geringere β HB-Werte von maximal 1,6 mmol/l gemessen. Eine Übersicht der Studien und der jeweils ermittelten β HB-Werte ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht der in Studien ermittelten β HB-Konzentration im Plasma von gesunden gefasteten sowie anorektischen kranken Katzen (β HB = β -Hydroxybutyrat, CNE = chronische Nierenerkrankung, DM = Diabetes mellitus, DK = diabetische Ketose, DKA = diabetische Ketoazidose, et al. = et alii, h = Stunden, HL = Hepatolipidose, HT = Hyperthyreose, k. A. = keine Angabe, mmol/l = Millimol pro Liter, n = Anzahl der Tiere, NDM = kein Diabetes mellitus, NKDM = nicht-ketotischer Diabetes mellitus, SD = Standardabweichung, Wo = Wochen).

| Literaturangabe | β HB-Konzentrationsbereich mit Median/Mittelwert und SD <u>gesund</u> (mmol/l) | β HB-Konzentrationsbereich mit Median/Mittelwert und SD <u>krank</u> (mmol/l) |
|----------------------------------|--|--|
| BIOURGE <i>et al.</i> , 1994a | 0,1 \pm 0,1 (Versuchsgruppe initial, k. A. ob gefastet) (n = 8) | 1,6 \pm 0,3 (Versuchsgruppe 5–6 Wo gefastet mit Entwicklung einer HL) (n = 8) |
| PAZAK <i>et al.</i> , 1998 | 0,2 \pm 0,0 (Kontrollgruppe, 16 h gefastet) (n = 16) | 0,9 \pm 0,1 (idiopathische HL) (n = 10) |
| BLANCHARD <i>et al.</i> , 2002 | 0,2 \pm 0,0 (Versuchsgruppe initial, k. A. ob gefastet) (n = 7) | 1,7 \pm 0,7 (Versuchsgruppe 3 Wo gefastet) (n = 7) 3,1 \pm 0,5 (Versuchsgruppe nach Entwicklung einer HL) (n = 7) |
| ZEUGSWETTER <i>et al.</i> , 2010 | 0 (0–0,1) (Kontrollgruppe, 16 h gefastet) (n = 25) | 1,5 (0,1–17,0) (DM, n = 37) (k. A. ob gefastet) 0,1 (0,0–0,8) (NDM, n = 85) (k. A. ob gefastet) |
| WEINGART <i>et al.</i> , 2012a | 0 (0–0,1) (k. A. ob gefastet) (n = 11) | 0,1 (0–0,9) (NKDM, n = 19) (k. A. ob gefastet) 1,7 (0,6–6,8) (DK, n = 11) (k. A. ob gefastet) 7,9 (3,8–12,2) (DKA, n = 21) (k. A. ob gefastet) |
| GORMAN <i>et al.</i> , 2016 | k. A. (0–0,1) (Kontrollgruppe, k. A. ob gefastet) (n = 43) | 0,1 (k. A.) (CNE, n = 28) (k. A. ob gefastet) 0,1 (k. A.) (HT, n = 34) (k. A. ob gefastet) 0,2 (k. A.) (HL, n = 15) (k. A. ob gefastet) |

1.1.2. Pathologische Ursachen der Ketonkörperbildung

Die Ketonkörperbildung aufgrund pathologischer Ursachen, darunter die DKA, die toxische Ketoazidose (alkoholische Ketoazidose, Salizylatintoxikation) oder die Ketose aufgrund angeborener Störungen im Metabolismus, sollte von den physiologischen Ketoseformen abgegrenzt werden (MITCHELL et al., 1995; LAFFEL, 1999; FUKAO et al., 2014). In diesen Fällen kommt es zu einer unverhältnismäßigen Ketonkörperproduktion, die von einem erniedrigten pH-Wert begleitet wird (LAFFEL, 1999; WYCKOFF & ABRAHAMSON, 2005; FUKAO et al., 2014). Dies ist besonders beim DM von Bedeutung. Die DKA ist eine lebensgefährliche durch Insulinmangel ausgelöste metabolische Komplikation eines DM und ist gekennzeichnet durch eine Kombination aus Hyperglykämie, Hyperketonämie und metabolischer Azidose mit erhöhter Anionenlücke (AG) (FELDMAN & NELSON, 2004). Diese Azidose ist in erster Linie bedingt durch die Ketonkörper β HB und AcAc, die kurzkettige Fettsäuren sind und bei physiologischem pH-Wert dissoziieren (STOCKHAM & SCOTT, 2008). Die dabei freiwerdenden Protonen können die Pufferkapazität des Körpers übersteigen und damit zu einer metabolischen Azidose führen, die ein wesentlicher Bestandteil des Krankheitsbildes ist (KREISBERG, 1978; LAFFEL, 1999; FELDMAN & NELSON, 2004; DIBARTOLA, 2011).

Die Ursache dieser Stoffwechsellage liegt auf hormoneller Ebene und ist charakterisiert durch einen relativen oder absoluten Mangel an Insulin mit gleichzeitiger Erhöhung der gegenregulatorisch wirksamen Hormone Glukagon, Cortisol, Somatotropin und der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin (SCHADE & EATON, 1979a; FELDMAN & NELSON, 2004). Zwei wesentliche Veränderungen im Stoffwechsel bedingen eine gesteigerte Ketogenese: (1) die verstärkte Mobilisierung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe und (2) das Umschalten des Leberstoffwechsels von der Fettsynthese auf die Fettoxidation und Ketogenese (MCGARRY et al., 1989; KITABCHI et al., 2001; FELDMAN & NELSON, 2004). Der Mangel an Insulin ist Voraussetzung, damit es zu einer DKA kommt, ist aber nicht der alleinige Auslöser für eine metabolische Entgleisung (MCGARRY et al., 1989; KITABCHI et al., 2001; FELDMAN & NELSON, 2004). Ein erhöhtes Glukagon-Insulin-Verhältnis ist darüber hinaus ein Charakteristikum der DKA (FOSTER & MCGARRY, 1983) und initial der wesentliche Faktor, der zu Hyperketonämie und -glykämie führt (ALBERTI,

1975; GERICH et al., 1975). MILES und Mitarbeiter (1980) konnten zeigen, dass beim Menschen einerseits eine Koinzidenz zwischen dem Anstieg der Glukose- und der Ketonkörperkonzentration sowie dem Anstieg der Glukagonkonzentration besteht, und andererseits jedoch keine gleichzeitige Erhöhung anderer gegenregulatorischer Hormone erkennbar war (MILES et al., 1980). Ähnliches konnten DUROCHER und Mitarbeiter (2008) bei diabetischen Hunden nachweisen. Die Autoren zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Glukagon-Insulin-Verhältnis und dem Auftreten einer Ketose (DUROCHER et al., 2008).

Dieses hormonelle Ungleichgewicht wird zusätzlich verstärkt durch die sogenannten „Stresshormone“ (FLECKMAN, 1993; KITABCHI et al., 2001). Zu diesen zählen die Katecholamine sowie Cortisol und Somatotropin, deren Konzentrationen bei vielen Erkrankungen, die häufig im Zusammenhang mit einer DKA auftreten, erhöht sind (BEISEL et al., 1967; ALBERTI & HOCKADAY, 1973; GERICH et al., 1973; SCHADE & EATON, 1979b; KANDEL & ABERMAN, 1983; CRENSHAW & PETERSON, 1996; BRUSKIEWICZ et al., 1997; FELDMAN & NELSON, 2004) und die auch bei einer DKA per se in erhöhter Konzentration messbar sind (MULLER et al., 1971; GERICH et al., 1975; WALDHÄUSL et al., 1979; LUZI et al., 1988). Diese Insulinantagonisten haben eine potenzierende Wirkung (KREISBERG, 1978; KANDEL & ABERMAN, 1983) und zeigen zusammen synergistische Effekte (SHERWIN et al., 1980; SHAMOON et al., 1981; KITABCHI et al., 2001). Während Glukagon einen direkten stimulierenden Effekt auf die Ketonkörpersynthese hat (MCGARRY et al., 1975; MCGARRY et al., 1976), ist die Wirkung der anderen Hormone vor allem in der Lipolyse und in der forcierten Zufuhr von Fettsäuren für die Leber zu sehen (FELDMAN & NELSON, 2004). Die Stresshormone blockieren zudem die periphere Insulinwirkung (BRATUSCH-MARRAIN et al., 1982; RAFACHO et al., 2014). Sie verstärken die Hyperglykämie und sorgen durch Aktivierung der HSL für eine gesteigerte Lipolyse im Fettgewebe (SHERWIN et al., 1980; KELLER et al., 1984; ARNER et al., 1990; CONNOLLY et al., 1991; AVOGARO et al., 1992; AVOGARO et al., 1993). Zusätzlich fördern sie die Glukagon- (GERICH et al., 1973; SCHADE & EATON, 1977) und hemmen die Insulinsekretion (PORTE et al., 1966; PORTE, 1967). Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der beteiligten Hormone und ihre Wirkung auf den Glukosestoffwechsel und die Ketogenese.

Tabelle 3: Übersicht der am Glukosestoffwechsel und an der Ketogenese beteiligten Hormone und ihre Wirkung (↑ = Stimulation, ↓ = Inhibition) (modifiziert nach KREISBERG, 1990).

| Hormon | Glukoneo- genese | Glykogen- olyse | Glykogen- synthese | Ketogenese |
|---------------|---------------------|--------------------|-----------------------|------------|
| Glukagon | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ |
| Insulin | ↓ | ↓ | ↑ | ↓ |
| Katecholamine | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ |
| Cortisol | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ |
| Somatotropin | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ |

Bei einem unbehandelten, sogenanntem „unkompliziertem“ DM kommt es aufgrund des Insulinmangels zur Ausbildung einer leichten Ketose, die normalerweise jedoch nicht zu einer Azidose führt (RAND, 2012). Katzen mit manifester DKA weisen jedoch oftmals gleichzeitig noch andere Störungen auf (FELDMAN & NELSON, 2004). Studien, die retrospektiv Patientendaten von Katzen mit DM und DKA untersuchten, zeigten, dass in vielen Fällen eine weitere Erkrankung bei den Katzen mit DKA diagnostiziert werden konnte (NICHOLS & CRENSHAW, 1995; CRENSHAW & PETERSON, 1996; BRUSKIEWICZ et al., 1997). Beispielsweise konnte bei der von BRUSKIEWICZ und Mitarbeitern (1997) untersuchten Population von 42 Katzen mit DKA bei 39 Tieren eine Begleiterkrankung identifiziert werden (BRUSKIEWICZ et al., 1997).

Die übermäßige Produktion von Glukose und Ketonkörpern stellt das Hauptproblem einer DKA dar (MILES et al., 1980; BALASSE & FERY, 1989). Im weiteren Verlauf spielt jedoch auch die Nutzungsrate der Ketonkörper eine Rolle. Der Ablauf von Ketonkörpersynthese und -abbau im Zustand der DKA unterscheidet sich grundsätzlich nicht von den Vorgängen im Hungerzustand (BALASSE & FERY, 1989). Eine mit zunehmender Plasmakonzentration eintretende Sättigung der Aufnahmemechanismen in der Skelettmuskulatur lässt sich auch bei gesunden, länger fastenden Individuen beobachten (GARBER et al., 1974; FERY & BALASSE, 1985; BALASSE & FERY, 1989). Jedoch konnten Studien demonstrieren, dass die periphere Ketonkörperverwertung bei einem Insulindefizit signifikant schlechter ist. Ferner ist die Nutzungsrate von β HB und AcAc in der Skelettmuskulatur, die aufgrund ihrer Masse eine wichtige Stellung bei deren Verwertung einnimmt (BALASSE & FERY, 1989; LAFFEL, 1999), bei DM und DKA reduziert (BALASSE & HAVEL, 1971; RUDERMAN &

GOODMAN, 1974; SHERWIN et al., 1976; IKEDA et al., 1991; OKUDA et al., 1991). Die verminderte Verwertung der Ketonkörper trägt zur Progression des Krankheitsbildes bei (BATES et al., 1968; RUDERMAN & GOODMAN, 1974; IKEDA et al., 1991) und führt zusammen mit der verstärkten Produktion schließlich zur Entwicklung einer metabolischen Azidose.

Neben dem Anstieg der AcAc- und β HB-Konzentrationen im Plasma ist während der DKA auch eine Verschiebung des Verhältnisses der beiden Metabolite zueinander zu beobachten (LAFFEL, 1999). Das β HB-AcAc-Verhältnis steigt dabei von 1 : 1 unter Normalbedingungen auf bis zu durchschnittlich 3 : 1 (bis 10 : 1) an. (MARLISS et al., 1970; STEPHENS et al., 1971; LAFFEL, 1999; UMPIERREZ et al., 2000). Dies ist bedingt durch den „reduzierten Zustand“ in den hepatischen Mitochondrien mit dem vorliegenden Überschuss an NADH/H⁺ (STEPHENS et al., 1971). Die Menge an verfügbaren Reduktionsäquivalenten sorgt für die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zugunsten von β HB (BERG et al., 2014). Über das genaue Verhältnis von β HB zu AcAc im Falle einer DKA bei Katzen liegen keine genauen Daten vor (GORMAN; 2016). Jedoch deuten die Ergebnisse verschiedener Studien daraufhin, dass β HB auch den überwiegenden Ketonkörper einer DKA bei Katzen darstellt (ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009; ZEUGSWETTER et al., 2010; WEINGART et al., 2012b, 2012a).

Zuletzt ist zu erwähnen, dass auch andere Krankheiten bei Katzen, wie Nierenerkrankungen, Kardiomyopathien oder hochgradige Leberfunktionsstörungen, die im Zusammenhang mit einer negativen Stoffwechselbilanz auftreten, zu einer unphysiologisch hohen Ketonkörperkonzentration führen können (ZEUGSWETTER et al., 2010; AROCH et al., 2012; GORMAN et al., 2016). Besonders hervorzuheben ist hier die HL, die häufig bei Katzen auftritt. Sie neigen nämlich dazu, bereits im anorektischen Zustand Lipide in die Leber einzulagern (CENTER et al., 1993). In Studien an Katzen konnte ein moderater Anstieg der Ketonkörperkonzentration bei experimentell induzierter oder idiopathischer HL verzeichnet werden (BIOURGE et al., 1994a; PAZAK et al., 1998; GORMAN et al., 2016). In einer retrospektiven Studie mit 215 kranken Katzen wurden, verglichen mit Tieren, die an anderen Krankheiten litten, die höchsten β HB-Werte bei Katzen mit DKA, DM oder HL gemessen. Die Tiere mit DM und DKA zeigten im Vergleich zu den an

HL erkrankten Tieren jedoch signifikant höhere Werte ($p < 0,001$) (Tabelle 2) (AROCH et al., 2012).

1.2. Abbau und Exkretion der Ketonkörper

Der Abbau und die Umwandlung der Ketonkörper in nutzbare Energie erfolgt in der Ketolyse, die in den Mitochondrien extrahepatischer Gewebe stattfindet. Die Leber selbst ist aufgrund ihrer Enzymausstattung nicht fähig, Ketonkörper abzubauen und als Brennstoff zu nutzen (BERG et al., 2014).

Die Ketolyse erfolgt in 2 reversiblen Schritten. Im ersten Schritt wird AcAc durch Übertragung eines Succinyl-CoA-Moleküls aktiviert. Anschließend wird das dabei entstandene Acetoacetyl-CoA in zwei Moleküle Acetyl-CoA gespalten (LAFFEL, 1999; BERG et al., 2014). Dieses wiederum geht in den Zitratzyklus ein und stellt Energie für die Atmungskette bereit (BERG et al., 2014). Beta-Hydroxybutyrat muss zuvor zu AcAc oxidiert werden, um abgebaut werden zu können. Dabei entsteht pro Molekül β HB ein Molekül NADH/H^+ . Diese Reaktion wird vermittelt durch die β HBDH, die auch bei der Ketogenese die Reduktion von AcAc zu β HB katalysiert (BERG et al., 2014).

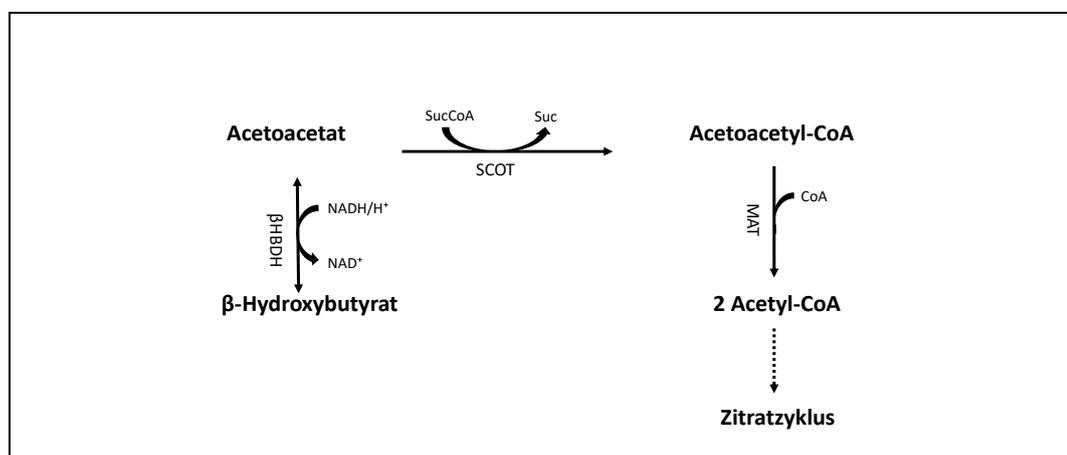


Abbildung 4: Reaktionsschritte der Ketolyse (β HBDH = β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, CoA = Coenzym A, MAT = methylacetoacetyl CoA thiolase (Acetoacetyl-CoA-Transferase/Thiolase), NAD^+ = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert), NADH/H^+ = Nikotinamid-Dinukleotid (reduziert), SCOT = succinyl CoA oxoacid transferase (β -Ketoacyl-CoA-Transferase), Suc = Succinat, SucCoA = Succinyl-CoA) modifiziert nach FUKAO et al., 2004).

Für die Kontrolle der Ketolyse sind 2 Enzyme bedeutend: die β -Ketoacyl-CoA-

Transferase (SCOT: succinyl CoA oxoacid transferase) und die Acetoacetyl-CoA-Transferase, auch Acetoacetyl-CoA-Thiolase genannt (MAT: methylacetoacetyl CoA thiolase). Die SCOT aktiviert AcAc durch die Übertragung der CoA-Gruppe eines Succinyl-CoA-Moleküls zu Acetoacetyl-CoA. Dieses Enzym ist der geschwindigkeitsbestimmende Faktor der Ketolyse (LAFFEL, 1999) und die Ketolysekapazität der Gewebe variiert in Abhängigkeit von seiner Aktivität (FUKAO et al., 2004). Die größte Aktivität wurde in Herzmuskel und Niere, gefolgt von Gehirn und Skelettmuskulatur, nachgewiesen (WILLIAMSON & THORNTON, 2011). Die intrazelluläre AcAc-Konzentration reguliert dabei die Aktivität der SCOT (FENSELAU & WALLIS, 1974). Die MAT katalysiert anschließend die Spaltung von Acetoacetyl-CoA. Dabei entstehen, wie oben beschrieben, zwei Moleküle Acetyl-CoA, die der energiebringenden Oxidation im Zitratzyklus zugeführt werden können (LAFFEL, 1999; BERG et al., 2014). Die MAT nimmt eine Sonderposition ein, da sie auch in der Leber vorkommt und den ersten Schritt der Ketogenese katalysiert. Die MAT sorgt dort für die Bildung von Acetoacetyl-CoA, dem Substrat für die HMG-CoA-Lyase (siehe auch Kapitel II.1.1.) (LAFFEL, 1999; FUKAO et al., 2004; NELSON & COX, 2009).

Die Verstoffwechslung der Ketonkörper unterliegt einem zuvor bereits erwähnten Sättigungsmechanismus, der vor allem durch die abnehmende Aufnahme in die Skelettmuskulatur bedingt ist (BALASSE & FERY, 1989; LAFFEL, 1999). Die Reduktion der Ketonkörpernutzungsrate in der Muskulatur ist ein sinnvoller Vorgang, damit dem Gehirn bei längerer Nahrungskarenz genug Energie zur Verfügung steht (OWEN et al., 1967; OWEN, 2005).

Während einer anhaltenden Hungerphase stellt sich eine gleichbleibende Ketonkörperkonzentration ein. Dies wird nicht nur durch die Anpassung der Ketonkörperverwertung an die steigende Produktionsrate, sondern zum Teil auch durch einen Feedback-Mechanismus der Ketonkörper selbst ermöglicht (MADISON et al., 1964; OWEN et al., 1973). Dies scheint zum einen auf einem insulinogenen Effekt der Ketonkörper zu beruhen, der so zu einer verminderten Freisetzung von Fettsäuren führt (MADISON et al., 1964; HAWKINS et al., 1971; OWEN et al., 1973). Zum anderen konnte auch ein direkter modulierender Effekt von AcAc und β HB auf die Fettsäurenmobilisierung, und damit dem Ausgangsstoff für die Ketogenese, nachgewiesen werden, ohne dass ein gleichzeitiger Insulinanstieg messbar war (BJORNTORP, 1966b, 1966a;

HELLMAN et al., 1969; HAWKINS et al., 1971; FREDHOLM, 1972; BALASSE & NEEF, 1975).

Die Verstoffwechslung von Ketonkörpern bei der DKA unterliegt grundsätzlich den gleichen Regulationen, die im Hungerzustand wirksam sind (BALASSE & FERY, 1989). Die hochgradige Hyperketonämie führt jedoch zu einer relativ schnellen Sättigung der Aufnahmemechanismen der Skelettmuskulatur (BATES et al., 1968; RUDERMAN & GOODMAN, 1974; IKEDA et al., 1991), und der Insulinmangel hat einen zusätzlichen Einfluss auf die Nutzung von AcAc und β HB (BALASSE & HAVEL, 1971; MILES et al., 1980). In Studien wurde nämlich demonstriert, dass die Nutzungsrate von β HB oder AcAc in der Skelettmuskulatur bei einer DK oder DKA reduziert zu sein scheint (RUDERMAN & GOODMAN, 1974; IKEDA et al., 1991; OKUDA et al., 1991), was auch nicht mittels physiologischer Insulindosis korrigiert werden kann (IKEDA et al., 1991). Zur Wirkung von Insulin auf die Ketonkörpernutzung in der Peripherie liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. In den meisten *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien bei unterschiedlichen Spezies wurde jedoch demonstriert, dass Insulin einen positiven Effekt hat, indem es unter anderem zu einer verbesserten Ketonkörperclearance führt (BEATTY et al., 1960; BALASSE & HAVEL, 1971; RUDERMAN & GOODMAN, 1974). Einen weiteren Beweis für die Wirkung von Insulin zeigten die Ergebnisse von KELLER und Mitarbeitern (1988). Sie konnten nachweisen, dass die Gabe einer therapeutischen Insulindosis nicht nur zur Suppression der Ketonkörperproduktion, sondern auch zu einer verstärkten Gesamtketonkörperclearance führt. Dabei ist die genaue Wirkung von Insulin auf die Aufnahme von β HB in die Zellen nicht geklärt, basiert aber vermutlich auf einer insulininduzierten verstärkten Aktivität der β HBDH und einer darauffolgenden Beschleunigung der Verstoffwechslung von AcAc im Zitratzyklus (IKEDA et al., 1991).

Die sich in der Blutzirkulation befindlichen Ketonkörper unterliegen der Exkretion und partiellen Rückresorption über die Nieren (CHAMBERLIN et al., 1937; GALVIN et al., 1968; COMSTOCK & GARBER, 1990). Ihre Ausscheidung ist demnach abhängig von der Nierenfunktion und der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (BRADY et al., 2003).

Ketonkörper werden nicht an Plasmaproteine gebunden und sind frei filtrierbare Solute, die über das Glomerulum in der Nierenrinde in den Primärharn gelangen

(WILDENHOFF, 1972; COMSTOCK & GARBER, 1990). Zum Erhalt der Elektroneutralität des Urins muss zusammen mit den Ketonkörpern als Anionen ein äquimolarer Anteil an Kationen ausgeschieden werden (OWEN et al., 1969; SAPIR & OWEN, 1975). Dieser Ausgleich erfolgt hauptsächlich über die Exkretion von Natrium, Kalium sowie von Ammonium aus dem Proteinabbau und führt zu Elektrolyt- und Stickstoffverlusten des Körpers (OWEN et al., 1969; SAPIR et al., 1972; SAPIR & OWEN, 1975). Da Ketonkörper jedoch im renalen Tubulussystem wieder resorbiert werden können (GALVIN et al., 1968), ermöglicht dieser Prozess, Elektrolytverluste über den Urin zu minimieren, und die Verluste von körpereigenem Protein und Stickstoff während längerer Hungerphasen zu reduzieren (SAPIR & OWEN, 1975).

Die Exkretion der Ketonkörper bei Vorliegen einer DKA ist v. a. diagnostisch bedeutsam. Sobald die Nierenschwelle, d. h. die Resorptionskapazität der Niere für ein filtrierte Substrat, überschritten wurde, zeigt sich eine lineare Beziehung zwischen Plasmakonzentration und Exkretion (COMSTOCK & GARBER, 1990). Bei niedrigen Plasmakonzentrationen kommt es also zur kompletten Rückresorption der ausgeschiedenen Ketonkörper, doch mit steigenden Ketonkörperkonzentrationen im Blut und erhöhter Filtrationslast nimmt der Verlust über den Urin zu, und es kommt zu einer signifikanten Ketonurie (COMSTOCK & GARBER, 1990). Im Falle einer hochgradigen Hyperketonämie erfolgt jedoch nur eine geringe Reduktion der Plasmaketonkörperkonzentration mittels renaler Exkretion. Der mit einer erhöhten Plasmakonzentration einhergehenden Filtrationslast folgt nämlich eine stark erhöhte Reabsorption im Tubulussystem, und ein großer Teil der Ketonkörper gelangt auf diese Weise wieder in den Kreislauf (COMSTOCK & GARBER, 1990). Die Nierenschwelle scheint für Ketonkörper bei Katzen relativ niedrig zu sein, da bereits bei leicht erhöhten Plasmakonzentrationen messbare Mengen ausgeschieden werden können (FELDMAN & NELSON, 2004). Basierend auf den Ergebnissen ihrer Studie vermuteten ZEUGSWETTER und PAGITZ (2009) dagegen, dass AcAc-Plasmakonzentrationen über 4 mmol/l nötig sind, um konstant eine ausreichende Ausscheidung von Ketonkörpern im Urin auszulösen, die mittels Urinteststreifen auch nachgewiesen werden können.

2. Technische Möglichkeiten der Ketonkörpermessung

Seit den 90er Jahren des vorherigen Jahrhunderts, in denen die heutzutage noch zur Blutglukosemessung verwendeten portablen Blutglukosemessgeräte (PBG) eingeführt wurden (LAFFEL, 1999), konnten in der Humanmedizin auf dem Gebiet der Ketonkörpermessung große Fortschritte erzielt werden. Heute bieten sich mehrere Möglichkeiten an, die Ketonkörperkonzentration im Harn oder Blut zu quantifizieren. Neben der klassischen Methode, die Ketonkörper mittels Nitroprussidreaktion semiquantitativ im Urin, Plasma oder Serum zu bestimmen, kann eine genauere quantitative Messung aus Serum und/ oder Plasma per PBGM oder vollautomatischen Analysegeräten erfolgen (LAFFEL, 1999; SACKS et al., 2011). Diese Methoden stehen seit einigen Jahren auch in der Veterinärmedizin zur Verfügung (DUARTE et al., 2002; DI TOMMASO et al., 2009; ZEUGSWETTER et al., 2010; WEINGART et al., 2012b, 2012a; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012).

2.1. Ketonkörpermessung im Urin

Die Ketonkörpermessung in Urinproben stellt die klassische Nachweismethode einer Ketose dar. Sie wurde in der Humanmedizin noch in den 90er Jahren routinemäßig zur Selbstkontrolle von Diabetikern verwendet, während die Bestimmung der Blutketonkörperkonzentration vorwiegend stationär zur Diagnose und zum Management einer DKA durchgeführt wurde (LAFFEL, 1999).

Die Nitroprussidreaktion, deren Basisreaktionsmechanismus bereits 1882 von Legal entdeckt wurde (LEGAL, 1882), bildet noch heute, in modifizierter Form, als Tabletten oder Teststreifen die Grundlage der kommerziellen Tests (CSAKO, 1987a). Sie dient dem semiquantitativen kolorimetrischen Nachweis von AcAc und je nach Reaktionsgemisch auch von Aceton (LEGAL, 1882; SACKS et al., 2011). Das Vorhandensein dieser Metabolite im Urin spricht für das Vorliegen einer Ketonämie und ist in Kombination mit Hyperglykämie, Glukosurie und metabolischer Azidose diagnostisch für eine DKA (CONNALLY, 2002; FELDMAN & NELSON, 2004). Bei diesem Nachweis von Ketonkörpern reagiert in alkalischem Milieu Nitroprussidnatrium (Na-Nitroferricyanid) mit AcAc und bildet einen violettfarbenen Komplex (SACKS et al., 2011). Bei Zugabe von Glycin kann auf diese Weise auch Aceton nachgewiesen werden (SACKS et al.,

2011). Die Ausprägung der Ketonurie ist anhand der Farbintensität auf dem Ketonkörperstestfeld der Teststreifen abzulesen oder führt im Falle der Verwendung von entsprechenden Testtablettchen zu dem Farbumschlag der Probe (SACKS et al., 2011). Die Nachweisgrenze für AcAc liegt bei 5–10 mg/dl (0,5–1,0 mmol/l) (COMSTOCK & GARBER, 1990). Die Bestimmung von β HB ist aufgrund der fehlenden Ketogruppe nur durch Modifikation des Tests möglich und kann durch Zugabe von Wasserstoffperoxid, das β HB in AcAc umwandelt, erfolgen (SMITH et al., 2008). Da ein Nachweis jedoch erst bei sehr hohen β HB-Konzentrationen möglich ist, hat diese Modifizierung keinen klinischen Nutzen (SMITH et al., 2008).

Der Test zeigt Schwachstellen, die bei dessen Einsatz berücksichtigt werden müssen und vor allem in seiner Rolle als DKA-Diagnostikum bedeutend sind. Die Einschätzung des Ergebnisses anhand einer Farbskala ist untersucherabhängig und subjektiv (BRADY et al., 2003). Es besteht demnach ein signifikantes Risiko, falsch positive und falsch negative Ergebnisse zu erhalten (LAFFEL, 1999). Die Anwesenheit freier Sulfhydrylgruppen (-SH) in Medikamenten, wie dem ACE-Hemmer (ACE: angiotensin converting enzyme) Captopril, Mesna (2-Mercaptoethansulfonat-Natrium) (GORDON-SMITH et al., 1982; CANTWELL et al., 1986), N-Acetylcystein (POON et al., 1990; HOLCOMBE et al., 1994), Dimercaprol oder Penicillamin, kann in Abhängigkeit der jeweiligen pharmakokinetischen Eigenschaften und der verabreichten Konzentration der jeweiligen Medikamente zu falsch positiven Ergebnissen führen (CSAKO, 1987a; LAFFEL, 1999). Der bei der jeweiligen Reaktion entstehende Farbton variiert zwar leicht, kann jedoch von automatischen Analysegeräten und ungeübtem Personal nicht immer unterschieden werden (CSAKO, 1987a). Ein zusätzlicher Arbeitsschritt ermöglicht es aber, ein falsch positives Ergebnis von einem richtig positiven abzugrenzen. Durch Zugabe einiger Tropfen Eisessig auf das Ketonkörperstestfeld des Teststreifens kommt es in Abhängigkeit von der Konzentration störender Substanzen zum Verblässen der Farbe (GORDON-SMITH et al., 1982; CSAKO, 1987a; POON & HINBERG, 1990). Zu bedenken ist ferner, dass auch stark pigmentierter Urin (Urochrome: Hämoglobin, Myoglobin u. a.) zu einem Farbumschlag führen kann (COMSTOCK & GARBER, 1990; SACKS et al., 2011). Fehlinterpretationen des Tests können besonders bei Patienten mit Hyperglykämie zu falschen Therapieentscheidungen

führen und unter Umständen in bedrohlichen Situationen enden (VIAR et al., 1987; CSAKO, 1990).

Falsch negative Testergebnisse sind ebenfalls möglich, wenn die Teststreifen für längere Zeit der Luft ausgesetzt waren oder die Urinproben stark sauer sind, was z. B. nach der Aufnahme großer Mengen von Ascorbinsäure zu beobachten ist (LAFFEL, 1999; SACKS et al., 2011). In einer Studie enthielten 9 von 11 Behältnisse für Urinteststreifen, die vor weniger als 3 Monaten geöffnet worden waren, reaktionsunfähige Teststreifen (ROSENBLOOM & MALONE, 1978). Ein weiterer Faktor, der zu falsch negativen Ergebnissen führen kann, ist das Vorliegen einer bakteriellen Harnwegsinfektion, da es unter der mikrobiellen Aktivität zum Abbau von Ketonkörpern kommen kann (SACKS et al., 2011).

Zusätzlich ist beim Nachweis von Ketonkörpern im Urin auch die Nierenfunktion ein wichtiger Faktor, der das Testergebnis beeinflussen kann, da die Exkretion der Ketonkörper von der GFR abhängig ist (COMSTOCK & GARBER, 1990; FELDMAN & NELSON, 2004). So kann das Vorliegen einer Nierenfunktionsstörung zu nicht verlässlichen Ergebnissen führen (BRADY et al., 2003). Ein nicht zu unterschätzendes Problem für die Bestimmung aus Urin kann zudem ein dehydratationsbedingter Urinmangel darstellen, da bei einer minimal gefüllten Harnblase die sonographiegestützte Zystozentese nicht oder nur schwer durchführbar ist (BRADY et al., 2003; ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009).

Der Einsatz von Eisen(III)-chlorid bietet eine weitere Möglichkeit die AcAc-Konzentration im Urin semiquantitativ zu bestimmen (COMSTOCK & GARBER, 1990). Hierbei werden einige Tropfen der zu testenden Probe zu einer 10%igen Eisen(III)-chlorid-Lösung gegeben, woraufhin sich ein Niederschlag bildet, der sich unter weiterer Zugabe von Urin auflöst (COMSTOCK & GARBER, 1990). Dieses Verfahren hinterlässt einen burgunderroten Farbumschlag, dessen Intensität mittels einer Farbskala bewertet wird (COMSTOCK & GARBER, 1990). Auch bei dieser Methode sind bei Anwesenheit unterschiedlicher Substanzen, wie Salizylate, Antipyrine, Phenole, Acetate und Cyanate, falsch positive Ergebnisse möglich (COMSTOCK & GARBER, 1990). Dem kann durch vorheriges Aufkochen der Probe vorgebeugt werden (COMSTOCK & GARBER, 1990). Das Testverfahren mittels Eisen(III)-chlorid wird jedoch in den kommerziell erhältlichen Tests nicht verwendet. Die heutigen Urintestmethoden in der Human- und Veterinärmedizin basieren

aufgrund der vorteilhafteren Handhabung und des schnell vorliegenden Ergebnisses auf der Nitroprussidreaktion (FELDMAN & NELSON, 2004; BARSANTI, 2011; SACKS et al., 2011).

Trotz der erwähnten Nachteile werden die Nitroprussidteststreifen heutzutage immer noch standardmäßig zur Diagnose der DKA bei Katzen und Hunden verwendet (BRADY et al., 2003; FELDMAN & NELSON, 2004; ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009). In der Humanmedizin gelten hingegen bereits andere Empfehlungen. Die American Diabetes Association und andere Experten sehen in der Nitroprussidreaktion lediglich einen zusätzlichen Test, der bei der Diagnose einer DKA nur begleitend zu anderen Verfahren eingesetzt wird und ferner nicht geeignet ist, um den Therapieerfolg zu überwachen (GOLDSTEIN et al., 2004; SACKS et al., 2011). Der Test wird in Bezug auf Diagnose und Monitoring als nicht ausreichend verlässlich beurteilt (GOLDSTEIN et al., 2004).

2.2. Ketonkörpermessung im Plasma und Serum

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Ketonkörper im Plasma oder Serum nachzuweisen. Die meisten in der Praxis verfügbaren Diagnostika sind die bereits vorgestellten Teststreifen (siehe auch Kapitel II.2.1.), die auf der Nitroprussidreaktion basieren und nicht nur für Urin- sondern auch für Plasma- und Serumproben verwendet werden können (FRASER et al., 1965; BRADY et al., 2003; ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009). Der Einsatz von Urinteststreifen bei Hunden und Katzen für die Ketonkörperbestimmung im Plasma wurde erstmals von BRADY und Mitarbeitern (2003) untersucht. Sie demonstrierten, dass die Teststreifen auch bei Untersuchung von Plasmaproben nutzbar sind, um eine Ketose bei diabetischen Tieren nachzuweisen, und ermittelten eine 93%ige Testeffizienz (100 % Sensitivität und 83 % Spezifität) für den Einsatz bei Katzen (BRADY et al., 2003). Als Goldstandard für diese Studie diente der Ketonkörpernachweis im Urin mit den gleichen Teststreifen. In diesem Zusammenhang wurde die Testeffizienz definiert als der prozentuale Anteil der Plasmateststreifenergebnisse, die mit den Urinergebnissen übereinstimmten (BRADY et al., 2003). In einer weiteren Studie wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt, und es wurde gezeigt, dass die Teststreifen ein sinnvolles Instrument darstellen, um eine DKA auszuschließen und dass, ganz im Gegensatz zu einer negativen Urinprobe, ein negatives Ergebnis im Plasmatest keine weiteren

Screeningtests erfordert (ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009). Neben der Ketonkörperbestimmung aus Plasmaproben mittels Teststreifen erfolgte in derselben Studie die Verifizierung von Ketonkörpern in Urinproben im Streifentest. Als Goldstandard für den Vergleich der Ergebnisse wurde hier die enzymatisch spektrophotometrische Messung von β HB im Plasma gewählt (ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009). Urin- und Plasmaergebnisse zeigten zwar eine positive Korrelation ($r = 0,70$; $p < 0,001$), dabei war aber eine signifikante Abweichung der Ergebnisse erkennbar (ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009). Es ergab sich eine Sensitivität und Spezifität von 100 % bzw. 88 % für Plasma sowie 82 % bzw. 95 % für Urin (ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009). Die zuvor bereits erläuterten Nachteile der Teststreifen, wie potenziell falsch positive oder falsch negative Resultate bei Anwendung bestimmter Medikamente sowie die Empfindlichkeit der Teststreifen bezüglich der Lagerung, bleiben auch bei Nutzung von Plasma bestehen. Ferner kann auch in diesem Testverfahren die Bestimmung von β HB nicht durchgeführt werden. Damit ist auch dieser Test unter Vorbehalt anzuwenden (BRADY et al., 2003; ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009).

Die weitaus verlässlicheren Tests messen mittels verschiedener Methoden spezifisch die β HB-Konzentration im Blut. Darunter sind die Gaschromatographie, die Kapillarelektrophorese und der kolorimetrische oder enzymatische Nachweis zu nennen (SACKS et al., 2011). Die heutzutage am weitesten verbreitete und in der Routinediagnostik verwendete Messmethode basiert auf der enzymatischen β HBDH-Methode. Sie wird sowohl im Labor, als auch in modifizierter Form bei den portablen Ketonkörpermessgeräten verwendet (MCMURRAY et al., 1984; KOCH & FELDBRUEGGE, 1987; PORTER et al., 1997; BYRNE et al., 2000). Diese Methode zeichnet sich im Vergleich zu den anderen Verfahren durch eine vereinfachte und schnellere Technik aus (MCMURRAY et al., 1984; KOCH & FELDBRUEGGE, 1987; PORTER et al., 1997).

Dem Hauptketonkörper β HB kommt eine wichtige diagnostische Bedeutung zu (LAFFEL, 1999; WEINGART et al., 2012a). Er hat im Gegensatz zu AcAc den Vorteil, relativ stabil zu sein (FRITZSCHE et al., 2001) und ist bei 4°C in Vollblutproben bis zu 24 Stunden, in Serum oder Plasma bis zu einer Woche und bei -20°C sogar für mehrere Wochen stabil (SACKS et al., 2011).

2.2.1. Goldstandard der β -Hydroxybutyratmessung

Die enzymatische Methode zur Messung von β HB wurde erst mit den technischen Möglichkeiten, β HBDH isolieren zu können, realisierbar. Sie stellt eine sensitive und hochspezifische Messmethode dar (COMSTOCK & GARBER, 1990). Sie wurde 1962 von WILLIAMSON und Mitarbeitern (1962) eingeführt und wurde im Laufe der Zeit immer weiter modifiziert (WILLIAMSON et al., 1962; CUTHBERT & ALBERTI, 1978; LI et al., 1980; MOORE et al., 1982; MCMURRAY et al., 1984; KOCH & FELDBRUEGGE, 1987). Die Methode kann heute in der kinetischen spektrophotometrischen Messung als der Goldstandard der β HB-Messung angesehen werden, die routinemäßig in den meisten Labors verwendet wird (SACKS et al., 2011). Sie basiert auf der in alkalischem Milieu (pH 8,5–9,5) ablaufenden Umsetzung von β HB zu AcAc mittels β HBDH und dem dabei beteiligten Coenzym NAD^+ (SACKS et al., 2011). NAD^+ dient als Oxidationsmittel der Reaktion und nimmt das Elektron von β HB auf, wobei AcAc und $\text{NADH} + \text{Wasserstoff} (\text{H}^+)$ entstehen.

Die Messung der umgesetzten NAD^+ - und β HB-Menge erfolgt im automatischen Analysegerät mittels Spektralphotometrie (LI et al., 1980; KOCH & FELDBRUEGGE, 1987). Dies ist eine besondere Art der Photometrie, bei der die Probe mit monochromatischem Licht einer festgelegten Wellenlänge (NAD^+/NADH : 260 oder 340 nm) durchleuchtet und die Transmission dieses Lichts mittels einer Photozelle gemessen wird, die an eine Intensitätsanzeige angeschlossen ist. NAD^+ und NADH zeigen beide ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Durch Unterschiede im Nikotinamidring der oxidierten im Vergleich zur reduzierten Form zeigt jedoch nur NADH ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340 nm. Die Zunahme der Absorption ist direkt proportional zu der Menge an NADH . Diese ist äquivalent zu der umgesetzten Konzentration an β HB in der Probe (SCHWEDT, 2007; HARRIS, 2014). Je nach verwendetem Analysesystem kann die Messung aus Vollblut, Serum- oder Plasmaproben erfolgen (SACKS et al., 2011).

2.2.2. Portable Ketonkörpermessgeräte

Die zu den *In-vitro*-Diagnostika zählenden portablen Ketonkörpermessgeräte sind sowohl im Heimgebrauch als auch im klinischen Bereich einsetzbar (SACKS et al., 2011). Die meisten Geräte verfügen über eine duale Funktion und können

zusätzlich zur Blutglukose- auch die Ketonkörperkonzentration mittels substratspezifischer elektrochemischer (amperometrischer) Sensorstreifen messen (BYRNE et al., 2000). Der dieser Sensorik zugrunde liegende Reaktionsmechanismus basiert wie der Laborstandard auf der enzymatischen β HBDH-Methode und ermöglicht die quantitative Bestimmung der kapillären oder venösen β HB-Konzentration (BYRNE et al., 2000). Nach dem Aufbringen des benötigten Blutprobenvolumens erfolgt in mehreren aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten die Oxidation von β HB zu AcAc mit paralleler Reduktion von NAD^+ zu NADH und der anschließenden Reoxidation von NADH zu NAD^+ mithilfe eines Redoxmediators (BYRNE et al., 2000). Der Redoxmediator wird im letzten Schritt selbst oxidiert und der durch den dabei stattfindenden Elektronentransport erzeugte elektrische Strom, der von der Arbeitselektrode des Gerätes gemessen wird, ist proportional zu der in der Probe befindlichen β HB-Konzentration (BYRNE et al., 2000) (Abbildung 5).

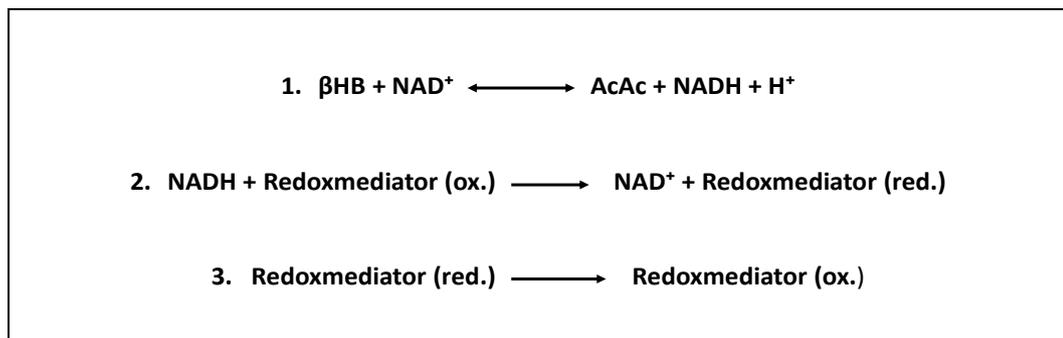


Abbildung 5: Reaktionsschritte der β HB-Bestimmung aus Blut mittels portablen Ketonkörpermessgerät (AcAc = Acetoacetat, β HB = β -Hydroxybutyrat, H^+ = Wasserstoff, NAD^+ = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert), NADH = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert), ox. = oxidiert, red. = reduziert) (modifiziert nach ABBOTT DIABETES CARE INC., 2006).

Alle für die Messung benötigten Substanzen sind auf einer Arbeitselektrode aufgebracht. Zusätzliche Elektroden arbeiten als Referenzelektroden oder dienen der Erkennung des aufgebrauchten Probenvolumens. Das Anlegen eines konstanten geringen elektrischen Stromes sorgt dafür, dass potenzielle Interferenzen durch reduzierende Stoffe, wie z. B. Vitamin C, Harnsäure oder Acetaminophen, minimiert werden (ABBOTT DIABETES CARE INC., 2006).

2.2.2.1. Portable Ketonkörpermessgeräte in der Humanmedizin

Portable Ketonkörpermessgeräte zur Messung von β HB aus Kapillarblut werden in der Humanmedizin bereits seit den 90er Jahren genutzt (LAFFEL, 1999). Diese Ketonometer liefern im Vergleich mit Labor- und Referenzmethoden präzise und valide Messwerte (BYRNE et al., 2000; NOYES et al., 2007; JANSSEN et al., 2010). In verschiedenen Studien konnten die Vorteile von Ketonometern gegenüber den Nitroprussid-Urinteststreifen aufgezeigt werden (GUERCI et al., 2003; TABOULET et al., 2004; GUERCI et al., 2005; HARRIS et al., 2005; LAFFEL et al., 2006; KLOCKER et al., 2013). Die portablen Ketonometer waren vor allem in Notfallambulanzen von großem Nutzen. Ihr Einsatz ersetzt zeitintensivere Diagnostik und kann im Falle einer DKA zum frühestmöglichen Beginn der notwendigen Therapie führen (HAM et al., 2004; TABOULET et al., 2004; HARRIS et al., 2005; NAUNHEIM et al., 2006; CHARLES et al., 2007; ARORA et al., 2011). Eine weitere Einsatzmöglichkeit liegt im Bereich des Monitorings der DKA-Therapie, da sowohl die Ausprägung der Ketonurie, als auch die Höhe der Blutglukose keine zuverlässigen Parameter zur Kontrolle des Therapieerfolges sind (UMPIERREZ et al., 1995; WIGGAM et al., 1997; LAFFEL, 1999). Die Echtzeit-Kontrolle der β HB-Konzentration aus Blutproben mithilfe eines Ketonometers ermöglicht dagegen eine verlässliche und angepasste Insulintherapie, wodurch Behandlungszeiten verkürzt werden können (WIGGAM et al., 1997; NOYES et al., 2007). So wird das Risiko einer insulintherapiebedingten Hypoglykämie reduziert, und unnötige Kosten können vermieden werden (VANELLI et al., 2003).

Auch bei der Selbstkontrolle von Patienten mit DM erweisen sich die Geräte als nützlich und werden von der American Diabetes Association und anderen Experten empfohlen (GOLDSTEIN et al., 2004; LAFFEL et al., 2006). Der direkte Nachweis von β HB aus Kapillarblut oder Serum ist ein guter Indikator für die aktuelle Stoffwechselsituation des Patienten (PRISCO et al., 2006) und ein sensitiverer Nachweis für eine Ketose als die Bestimmung der AcAc-Konzentration mittels Urinteststreifen-Untersuchung (GORMAN et al.; 2016). Die β HB-Konzentration sollte besonders beim Auftreten von Erkrankungen, bei denen ein signifikantes Risiko einer ketotischen Dekompensation besteht, regelmäßig kontrolliert werden (GUERCI et al., 2005; LAFFEL et al., 2006).

2.2.2.2. Portable Ketonkörpermessgeräte zum Einsatz bei Katzen

Portable Blutglukosemessgeräte werden schon seit vielen Jahren in der Veterinärmedizin genutzt (WESS & REUSCH, 2000; VAN DE MAELE et al., 2005) und bereits eigens für die Verwendung bei Tieren hergestellt (Wellion[®]Vet GLUCO CALEA, Med Trust Handelsges.m.b.H., Marz, Österreich; AlphaTRAK[™], Abbott Animal Health, Abbott Park, Illinois, Vereinigte Staaten von Amerika). Dagegen ist der Einsatz von portablen Ketonometern noch vergleichsweise selten (HOENIG et al., 2008; DI TOMMASO et al., 2009; HENDERSON & SCHLESINGER, 2010; WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). Die bislang in der Veterinärmedizin eingesetzten Geräte stammen aus der Humanmedizin. Da sie für Menschen konzipiert wurden und mit humanen Plasmaproben kalibriert werden, sind diese vor der Anwendung in der Diagnostik bei Katzen erst für den Einsatz bei dieser Spezies zu validieren. Nur so können verlässliche Messungen gewährleistet werden. Seit dem 2. Quartal 2016 wurde mit dem PBGM Wellion[®]Vet BELUA (Wellion[®]Vet, Med Trust Handelsges.m.b.H., Marz, Österreich) erstmals ein veterinärmedizinisches Gerät auf dem Markt gebracht, das sowohl für die Messung der Blutglukose-, als auch der Ketonkörperkonzentration bei Katzen und Hunden entwickelt wurde. Tierartspezifische Code-Chips, die bei jeder neuen Teststreifenpackung zur Kalibrierung des Gerätes verwendet werden müssen, sollen genaue Messergebnisse für die jeweilige Tierart gewährleisten. Das Gerät benötigt ein Blutvolumen von 0,8 µl. Es liegen jedoch keine Angaben zur Richtigkeit und zur Präzision dieses Gerätes vor (WELLION[®]VET MEDTRUST HANDELSGES.M.B.H., 2016).

Es gibt aktuell 2 humanmedizinische Geräte, die in verschiedenen Studien für den Einsatz bei Katzen validiert wurden, und unter Beachtung der Einschränkungen des Gerätes verwendet werden können (HOENIG et al., 2008; WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). HOENIG und Mitarbeiter (2008) untersuchten mit dem Precision Xtra[™] (Abbott Diabetes Ltd., Witney, Großbritannien) erstmals ein Ketonkörpermessgerät bei einer kleinen Gruppe von Hunden (n = 17) und Katzen (n = 3). Sie demonstrierten mittels Regressionsanalyse eine starke Korrelation zwischen Referenzmethode und Ketonometer-Messmethode (Steigung: $0,717 \pm 0,058$; $p < 0,001$) mit vergleichbaren Messwerten über einen weiten Messbereich. Die beim korrekten

Vergleich von Messmethoden idealerweise einzusetzende graphische Darstellung mittels Bland-Altman-Diagramm wurde in dieser Studie nicht durchgeführt. ZEUGSWETTER und REBUZZI (2012) bestätigten den Verdacht, dass das Precision Xtra™ ein geeignetes diagnostisches Mittel darstellt, um die β HB-Konzentration von Katzen zu messen. Sie untersuchten eine Gruppe von 43 an DM erkrankten Katzen. Das Gerät wies im Vergleich mit der Referenzmethode mittels Streudiagramm nach Bland-Altman bei niedrigen bis mittleren Konzentrationen verlässliche Ergebnisse sowie eine akzeptable Reproduzierbarkeit auf (ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). Bei höheren β HB-Werten war jedoch ein negatives Bias von bis zu 9 mmol/l (median -3,3 mmol/l; 95 % CI: -0,78 bis -8,97 mmol/l) festzustellen. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman ergab insgesamt eine gute Korrelation beider Methoden ($r = 0,97$; $p < 0,001$). Bei Werten > 6 mmol/l zeigte sich keine Korrelation ($r = -0,05$; $p = 0,898$). Dies spiegelt wieder, dass das Gerät nur für einen β HB-Konzentrationsbereich bis 6 mmol/l konzipiert wurde. WEINGART und Mitarbeiter (2012b) konnten beim Modell Precision Xceed (Abbott Diabetes Ltd., Witney, Großbritannien), das ein Probenvolumen von 1,5 μ l benötigt, eine ähnliche Tendenz feststellen. Sie untersuchten eine Gruppe von insgesamt 62 Katzen (Kontrollgruppe gesund: $n = 11$, DM-Gruppe: $n = 51$) und zeigten mittels Streudiagramm nach Bland-Altman, dass bei Werten < 4 mmol/l eine gute Übereinstimmung mit der Referenzmethode bestand. Bei Konzentrationen ≥ 4 mmol/l nahm die Übereinstimmung allerdings ab. Somit war klar, dass die Werte vom Ketonometer in 83 % der Fälle (20 von 24 Katzen) unterschätzt wurden. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson zeigte eine gute Gesamtkorrelation ($r = 0,95$; $p \leq 0,01$), aber deutliche Unterschiede bei getrennter Betrachtung der Konzentrationsbereiche $<$ und ≥ 4 mmol/l (< 4 mmol/l: $r = 0,97$; $p \leq 0,01$ und ≥ 4 mmol/l: $r = 0,32$; $p \leq 0,01$). WEINGART und Mitarbeiter (2012b) untersuchten zusätzlich die Verwendung von Kapillarblut ($n = 17$) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Blut ($n = 11$) als Probenmaterial für das Precision Xceed. Während die Ergebnisse der Kapillarblutproben eine gute Übereinstimmung mit denen der venösen Blutproben zeigten ($r = 0,999$; $p \leq 0,01$), war die Verwendung von EDTA-Blut nicht zu empfehlen (WEINGART et al., 2012b). Hier traten signifikante Unterschiede zwischen Ketonometer und Referenzmethode mit Abweichungen von -0,2 bis 5,3 mmol/l auf ($r = 0,58$; $p \leq 0,01$). Das Gerät zeigte im Vergleich zur Referenzmethode eine akzeptable Inter-

Assay- und Intra-Assay-Präzision (Tabelle 5) (WEINGART et al., 2012b).

Trotz dieser Einschränkungen können beide Geräte zur Diagnostik einer DKA bei der Katze verwendet werden (WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). Besonders in den Fällen, in denen keine Blutgasanalyse möglich ist, kann die β HB-Messung bei Kenntnis der spezifischen Cut-off-Werte die Diagnose DKA ermöglichen (WEINGART et al., 2012b). In den Studien von WEINGART und Mitarbeitern (2012b) und ZEUGSWETTER & REBUZZI (2012) wurden ferner mittels ROC-Analyse (ROC: receiver operating characteristic) β HB-Cut-off-Werte zur Diagnose einer DKA ermittelt. Der von WEINGART und Mitarbeitern (2012b) bestimmte β HB-Cut-off für die Referenzmethode im Labor lag bei 2,4 mmol/l (100 % Sensitivität (95 % CI: 83,9–100 %) und 86,7 % Spezifität (95 % CI: 69,3–96,2 %)). Bei einer β HB-Konzentration unter diesem Wert ist eine DKA bei der Katze relativ unwahrscheinlich (WEINGART et al., 2012a). ZEUGSWETTER und REBUZZI (2012) ermittelten anhand der Daten von 138 diabetischen Katzen (217 Datensätze) für das Precision Xtra™ einen Wert von 2,55 mmol/l (94 % Sensitivität (95 % CI: 83–99 %) und 68 % Spezifität (95 % CI: 59–74 %)). Ein β HB-Wert < 2,55 mmol/l erlaubt deren Ergebnis zufolge den Ausschluss einer Ketoazidose und sollte weitere Diagnostik nach sich ziehen (ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012).

Die portablen Ketonkörpermessgeräte bieten damit eine sinnvolle Ergänzung bei der Diagnosestellung der DKA bei der Katze (WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). Doch sollten bei Verdacht immer zusätzliche diagnostische Maßnahmen durchgeführt werden, da die Diagnose der DKA auf der Basis mehrerer Testergebnisse erfolgen sollte (DUARTE et al., 2002; WEINGART et al., 2012a). Tabelle 4 und 5 geben eine Übersicht über die bereits für Katzen validierten Geräte und die ermittelten Studienergebnisse.

Tabelle 4: Für Katzen validierte humanmedizinische portable Ketonometer. Die Ketonometer stammen von der Firma Abbott Diabetes Ltd., Witney, Großbritannien (β HB = β -Hydroxybutyrat, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, et al. = et alii, k. A. = keine Angabe, Li-Heparin = Lithium-Heparin, mmol/l = Millimol pro Liter, μ l = Mikroliter).

| Literaturangabe | Ketonometer | Messmethode Ketonometer | Probenvolumen (μ l) und β HB-Messbereich (mmol/l) | Probenart Ketonometer | Messmethode der Referenzmethode | Probenart Referenzmethode (Antikoagulans) | Untersuchte Parameter |
|-------------------------------|-----------------|-----------------------------|--|---|---|---|--|
| HOENIG <i>et al.</i> , 2008 | Precision Xtra™ | enzymatisch, amperometrisch | 10 0,1–6,0 | venöses Vollblut | enzymatisch, kinetisch, spektrophotometrisch | venöses Plasma (k. A.) | venöse β HB-Konzentration |
| WEINGART <i>et al.</i> , 2012 | Precision Xceed | enzymatisch, amperometrisch | 1,5 0–8,0 | venöses Vollblut, Kapillarblut, EDTA-Blut | enzymatisch, kinetisch, spektrophotometrisch, | venöses Plasma (Li-Heparin) | venöse, kapilläre und EDTA- β HB-Konzentration |
| ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012 | Precision Xtra™ | enzymatisch, amperometrisch | 10 0,1–6,0 | venöses Vollblut | enzymatisch, kinetisch, spektrophotometrisch | venöses Plasma (k. A.) | venöse β HB-Konzentration |

Tabelle 5: Validierungsergebnisse der portablen Ketonometer. Die Ketonometer stammen von der Firma Abbott Diabetes Ltd., Witney, Großbritannien (β HB = β -Hydroxybutyrat, CV = Variationskoeffizient, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, et al. = et alii, k. A. = keine Angabe, Konz. = Konzentration, mittl. = mittlere, mmol/l = Millimol pro Liter, niedr. = niedrige, p = p-Wert, r = Korrelationskoeffizient, Ref. = Referenzmethode, Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität).

| Literaturangabe | Ketonometer | β HB-Messbereich Ketonometer und Referenzmethode (mmol/l) | Differenz Ketonometer und Referenzmethode (mmol/l) mit Korrelationskoeffizient und p-Wert | Inter-Assay-Präzision Ketonometer CV (%) | Intra-Assay-Präzision Ketonometer CV (%) | Inter-Assay- und Intra-Assay- Präzision Referenz CV (%) |
|----------------------------------|-----------------|--|---|---|---|--|
| HOENIG <i>et al.</i> , 2008 | Precision Xtra™ | k. A. | k. A. | k. A. | k. A. | k. A. |
| WEINGART <i>et al.</i> , 2012 | Precision Xceed | 0–7,4 (Ketonometer) 0–12,2 (Ref.) | -5,5–1,9 (≥ 4 mmol/l) $r (\geq 4 \text{ mmol/l}) = 0,32$; $p \leq 0,01$ -0,9–0,6 (< 4 mmol/l) $r (< 4 \text{ mmol/l}) = 0,97$; $p \leq 0,01$ $r (\text{gesamt}) = 0,95$; $p \leq 0,01$ | niedr. Konz.: 8,1 hohe Konz.: 2,6 | niedr. Konz.: 1,2 mittl. Konz.: 6,6 hohe Konz.: 1,9 Gesamtpräzision: 2,8 | Inter-Assay: 3,7 Intra-Assay: 8,8 |
| ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012 | Precision Xtra™ | 0–6,0 (Ketonometer) 0,0–13,8 (Ref.) | -9,0–0,2 $r (\text{gesamt}) = 0,97$; $p < 0,001 (< 6 \text{ mmol/l})$ $r (> 6 \text{ mmol/l}) = -0,05$; $p = 0,898$ | k. A. | niedr. Konz.: 29,4 mittl. Konz.: 5,2 hohe Konz.: 6 | k. A. |

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Studienziel und Material

In dieser Studie wurde das für die Humanmedizin entwickelte portable Blutglukose- und Ketonkörpermessgerät GlucoMen® LX PLUS (A. Menarini Diagnostics GmbH, Florenz, Italien) zur Messung der venösen und kapillären β HB-Konzentration bei Katzen validiert und spezifische β HB-Cut-off-Werte ermittelt, um zum einen eine diabetische Ketoazidose zu diagnostizieren und zum anderen einen gut eingestellten diabetischen Patienten zu identifizieren. Das letzte Studienziel bestand darin, die anhand eines Urinteststreifens gemessene Urin-Ketonkörperkonzentration mit den mittels GlucoMen® LX PLUS und der spektrophotometrischen Referenzmethode gemessenen β HB-Konzentrationen aus Vollblut und Serum zu vergleichen.

Im prospektiven Teil der Studie wurden insgesamt 80 Proben venösen und 22 Proben kapillären Blutes untersucht. Die Blutproben stammen von Katzen, die im Zeitraum von Juli bis Dezember 2014 an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgestellt und bei denen im Rahmen von Untersuchungen und Behandlungen aus anderen Gründen Blutentnahmen durchgeführt wurden. Eine Teilmenge des entnommenen venösen Blutes wurde zur Validierung des GlucoMen® LX PLUS verwendet. Zur Ermittlung spezifischer β HB-Cut-off-Werte wurden zusätzlich zu den prospektiv gesammelten Proben 27 venöse Blutproben von Katzen retrospektiv analysiert. Die Studie wurde als genehmigungspflichtiger Tierversuch mit der Nummer 55.2-1-54-2532-2-2014 von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

1.1. Gruppenzuordnung

Zur Validierung des Messgeräts wurden prospektiv Blutproben von 2 unterschiedlichen Gruppen untersucht. Die Patientengruppe (n = 26) umfasste an DM erkrankte Tiere. Die Kontrollgruppe (n = 12) wurde von klinisch gesunden Tieren gebildet. Ein DM wurde wie folgt definiert: das Vorhandensein klinischer Symptome (Polyurie, Polydipsie, Polyphagie), persistierende Hyperglykämie > 8,3 mmol/l (150 mg/dl), Glukosurie, und erhöhtes Fruktosamin >340 μ mol/l. Die klinisch gesunden Tiere wurden als gesund eingestuft, wenn sowohl in der

klinischen Untersuchung, als auch in den Laboruntersuchungen keine Hinweise auf eine Erkrankung bestanden. Eine diabetische Ketoazidose wurde wie folgt definiert: das Vorhandensein klinischer Symptome (Apathie, Anorexie, Erbrechen, Dehydratation), metabolische Azidose mit einem pH-Wert $\leq 7,27$ und/oder einer Bikarbonatkonzentration (HCO_3^-) ≤ 14 mmol/l und einer AG > 20 , 6 mmol/l, Hyperglykämie $> 11,1$ mmol/l (200 mg/dl) mit oder ohne Ketonurie. Ein Diabetiker wurde als gut eingestellt eingestuft, wenn nur geringe klinische Symptome (Polyurie, Polydipsie, Polyphagie) auftraten; die Blutglukose im Tagesprofil $< 13,8$ mmol/l (250 mg/dl) und/oder der Fruktosaminwert < 450 $\mu\text{mol/l}$ lag.

1.2. Patientengut

Für jedes Studienziel (1. Validierung des GlucoMen[®] LX PLUS; 2. Ermittlung von βHB -Cut-off-Werten für GlucoMen[®] LX PLUS und Referenzmethode; 3. Vergleich des Nitroprussid-Urinteststreifen mit GlucoMen[®] LX PLUS und Referenzmethode) wurde ein unterschiedliches Patientengut untersucht. Tabelle 6 gibt eine Übersicht der unterschiedlichen Patientengruppen dieser Studie.

Tabelle 6: Übersicht der Patientengruppen der jeweiligen Studienziele (βHB = β -Hydroxybutyrat, DKA = diabetische Ketoazidose, DM = Diabetes mellitus, GM = GlucoMen[®] LX PLUS, n = Patientenzahl, Referenz = Referenzmethode).

| | Patientengut 1 DM (n = 26) gesund (n = 12) | Patientengut 2.1 DM (n = 39) | Patientengut 2.2 DM (n = 39) gesund (n = 12) | Patientengut 3 DM (n = 32) |
|-------------------------|---|---|---|---|
| Studienziel | Validierung GM | βHB -Cut-off-Wert DKA-Diagnose | βHB -Cut-off-Wert DM-Einstellung | Vergleich Nitroprussid-Urinteststreifen |
| Anzahl der Werte | 68 (GM) 68 (Referenz) | 43 (GM) 18 (Referenz) | 65 (GM) 34 (Referenz) | 35 (GM) 18 (Referenz) |

Patientengut 1

Zur Validierung des GlucoMen[®] LX PLUS wurden prospektiv die Daten von Diabetikern (n = 26) und klinisch gesunden Tiere (n = 12) verwendet. Es wurden insgesamt 80 Proben venösen und 22 Proben kapillären Blutes von 38 Katzen, die

an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgestellt wurden, untersucht. In der Gruppe der diabetischen Katzen waren stabile Diabetiker sowie Tiere, die sich in einem kritischen Zustand befanden und Laborveränderungen im Sinne einer DK ($\text{pH} > 7,27$; HCO_3^- ; > 14 mmol/l; AG $< 20,6$ mmol/l; Blutglukose $> 11,1$ mmol/l (200 mg/dl) und ggf. Ketonurie) oder DKA ($\text{pH} \leq 7,27$; HCO_3^- ; ≤ 14 mmol/l; AG $\geq 20,6$ mmol/l; Blutglukose $> 11,1$ mmol/l (200 mg/dl); und/oder Ketonurie) aufwiesen. Unter den Tieren befanden sich sowohl neu diagnostizierte Diabetiker als auch Tiere, die bereits mit Insulin behandelt wurden. Die Gruppe der klinisch gesunden Tiere wurde von Katzen gebildet, die an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgestellt und denen im Rahmen einer Gesundheitsvorsorge Blut entnommen wurde. Das Alter der Katzen in der Kontrollgruppe betrug zwischen 3 Monaten und 10 Jahren (Median 8 Monate). In dieser Gruppe waren 9 Europäisch Kurzhaar, ein Perser-Mischling, eine Maine Coon, und eine Bengalkatze vertreten. Die Gruppe umfasste 6 männlich intakte, 2 weiblich intakte, 2 männlich kastrierte und 2 weiblich kastrierte Katzen. In der an DM erkrankten Gruppe lag das Alter der Tiere zwischen 7 und 18 Jahren (Median 12 Jahre). In dieser Gruppe waren 19 Europäisch Kurzhaar, eine Norwegische Waldkatze, eine Siamkatze, ein Siam-Mischling, eine Heilige Birma, eine Russisch Blau, ein Europäisch Langhaar-Mischling, und ein Angora-Mischling vertreten. Es wurden Blutproben von 18 männlich kastrierten und 8 weiblich kastrierten Katzen entnommen.

Zum Methodenvergleich wurden insgesamt 68 Messwerte der Diabetikergruppe verwendet. Zur Berechnung der Variationskoeffizienten wurden jeweils 2 Proben der Diabetiker und 2 Proben der Kontrollgruppe verwendet.

Patientengut 2

Das Patientengut 2 zur Ermittlung von βHB -Cut-off-Werten zur Diagnose einer DKA oder zur Beurteilung der Einstellung des DM für GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode wurde von 2 verschiedenen Gruppen gebildet. Mit den Daten des Patientengutes 2.1 wurde der βHB -Cut-off-Wert zur Diagnose einer DKA ermittelt. Mit den Daten des Patientengutes 2.2 der βHB -Cut-off-Wert zur Beurteilung der Diabetes-mellitus-Einstellung.

Patientengut 2.1

Zur Ermittlung der β HB-Cut-off-Werte zur Diagnose einer DKA für GlucoMen[®] LX PLUS und Referenzmethode wurden die Werte der in dieser Studie prospektiv untersuchten Diabetiker (GlucoMen[®] LX PLUS n = 22; Referenzmethode n = 18) verwendet. Die Daten wurden in die Untersuchung aufgenommen, wenn zeitgleich mit der β HB-Bestimmung mittels GlucoMen[®] LX PLUS oder der Blutprobenentnahme zur späteren β HB-Referenzmessung eine Blutgasanalyse durchgeführt wurde. Zur Ermittlung der β HB-Cut-off-Werte für den GlucoMen[®] LX PLUS wurden zusätzlich retrospektiv Werte von Diabetikern (n = 21) verwendet, die im Zeitraum von März 2012 bis September 2016 an der Medizinischen Kleintierklinik vorgestellt und bei denen im Rahmen von notwendigen Untersuchungen die β HB-Konzentration mittels GlucoMen[®] LX PLUS im Blut bestimmt und eine Blutgasanalyse durchgeführt wurde. 4 Tiere waren sowohl in der retrospektiven als auch in der prospektiven Gruppe vertreten. Die Tiere wurden basierend auf den Laborbefunden und den klinischen Symptomen in 2 Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 = DKA (pH \leq 7,27; HCO_3^- ; \leq 14 mmol/l; AG $>$ 20, 6 mmol/l; Blutglukose $>$ 11,1 mmol/l (200 mg/dl); und/oder Ketonurie); Gruppe 2 = alle übrigen Diabetiker. Die Katzen in der DKA-Gruppe zeigten Symptome, die mit einer DKA vereinbar waren und verbesserten sich unter Infusions- und Insulintherapie. Im Patientengut 2.1 lag das Alter der Tiere zwischen 5 und 18 Jahren (Median 11 Jahre). Bei einer Katze lag keine Altersangabe vor. In dieser Gruppe waren 30 Europäisch Kurzhaar, 2 Norwegische Waldkatzen, ein Siam-Mischling, eine Heilige Birma, eine Perserkatze, 2 Russisch Blau, ein Europäisch Langhaar-Mischling, und ein Angora-Mischling vertreten. Es wurden Blutproben von 25 männlich kastrierten und 14 weiblich kastrierten Katzen entnommen.

Patienten konnten mehrfach verwendet werden, wenn sie zu verschiedenen Zeitpunkten vorgestellt wurden. Für den GlucoMen[®] LX PLUS wurden 43 Datensätze von 39 Katzen zur Ermittlung des β HB-Cut-off-Werts zur Diagnose einer DKA analysiert. Für die Referenzmethode konnten allerdings nur 18 Datensätze von 18 Katzen analysiert werden, da nicht bei allen Patienten, die für die Analyse mittels GlucoMen[®] LX PLUS verwendet wurden, Serum zurückgestellt wurde.

Patientengut 2.2

Zur Ermittlung der β HB-Cut-off-Werte zur Beurteilung der Einstellung des DM für GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode wurden Werte ($n = 26$) der in dieser Studie prospektiv untersuchten Diabetiker ($n = 23$) und die Werte ($n = 12$) der gesunden Kontrollgruppe ($n = 12$) verwendet. Die Daten der Diabetiker wurden in die Untersuchung aufgenommen, wenn zeitgleich mit der β HB-Bestimmung mittels GlucoMen® LX PLUS oder der Blutprobenentnahme zur späteren β HB-Referenzmessung Informationen zu den klinischen Symptomen des Patienten, ein Blutglukosetagesprofil und/oder eine Fruktosaminbestimmung vorhanden waren. Die Daten der gesunden Kontrollgruppe wurden in die Untersuchung aufgenommen und zusammen mit den gut eingestellten Diabetikern einer Gruppe zugeordnet, da gut eingestellte Diabetiker, die keine Symptome des DM zeigen, sich metabolisch gesehen nicht von gesunden Tieren unterscheiden sollten. Zur Ermittlung der β HB-Cut-off-Werte für den GlucoMen® LX PLUS wurden zusätzlich zu den Werten der Diabetiker und der gesunden Kontrollgruppe Werte der retrospektiv analysierten Daten ($n = 27$) von Diabetikern ($n = 21$), die im Zeitraum von März 2012 bis September 2016 an der Medizinischen Kleintierklinik vorgestellt und bei denen die β HB-Konzentration im Blut gemessen wurde. Auch hier waren Informationen zu den klinischen Symptomen des Patienten, ein Blutglukosetagesprofil und/ oder eine Fruktosaminbestimmung vorhanden. Die Tiere wurden basierend auf den Laborbefunden und den klinischen Symptomen in 2 Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 = gut eingestellter DM (keine klinischen Symptome (Polyurie, Polydipsie, Polyphagie); Blutglukose im Tagesprofil $< 13,8$ mmol/l (250 mg/dl) und/ oder Fruktosamin < 450 μ mol/l) und die gesunden Tiere; Gruppe 2 = schlecht eingestellte Diabetiker (stabil oder bereits metabolisch entgleist). Im Patientengut 2.2 lag das Alter der Tiere zwischen 3 Monaten und 18 Jahren (Median 10 Jahre). Bei einer Katze lag keine Altersangabe vor. In dieser Gruppe waren 38 Europäisch Kurzhaar, 2 Norwegische Waldkatzen, eine Siamkatze, ein Siammischling, eine Heilige Birma, eine Perserkatze, ein Persermischling, 2 Russisch Blau, eine Bengalkatze, eine Maine Coon, ein Europäisch Langhaar-Mischling, und ein Angora-Mischling vertreten. Es wurden Blutproben von 6 männlich intakten, 2 weiblich intakten, 28 männlich kastrierten und 15 weiblich kastrierten Katzen entnommen.

Patienten konnten mehrfach verwendet werden, wenn sie zu verschiedenen Kontrollzeitpunkten vorgestellt wurden. Für den GlucoMen® LX PLUS wurden

65 Datensätze von 51 Katzen zur Ermittlung des β HB-Cut-off-Werts zur Diagnose einer DKA analysiert. Für die Referenzmethode konnten 34 Datensätze von 32 Katzen analysiert werden.

Patientengut 3

Zum Vergleich der Ergebnisse der Ketonkörpermessung mittels Nitroprussid-Teststreifen-Untersuchung aus Urin (Messung von Acetoacetat und Aceton) mit den Ergebnissen der β HB-Konzentration der Referenzmethode (Serum) und des GlucoMen[®] LX PLUS (Vollblut) wurden die Daten (GlucoMen[®] LX PLUS n = 21; Referenzmethode n = 18) der in dieser Studie prospektiv untersuchten Diabetiker (n = 21) verwendet. Die Daten wurden in die Untersuchung aufgenommen, wenn zeitgleich mit der β HB-Bestimmung mittels GlucoMen[®] LX PLUS oder der Blutprobenentnahme zur späteren β HB-Referenzmessung eine Urinuntersuchung auf Ketonkörper mittels Nitroprussid-Teststreifen durchgeführt wurde. Bei einem der vorgestellten Patienten konnte aufgrund mangelnden Urinvolumens in der Harnblase keine Urinprobe gewonnen werden. Bei einem Patienten wurde aufgefangener Urin, bei allen übrigen Patienten wurde Zystozentese-Urin für die Untersuchung verwendet. Zum Vergleich der Ergebnisse der Nitroprussid-Teststreifen-Untersuchung aus Urin mit den Ergebnissen des GlucoMen[®] LX PLUS wurden zusätzlich retrospektiv analysierte Werte (n = 14) von Diabetikern (n = 14) verwendet. Diese Tiere wurden im Zeitraum von März 2012 bis September 2016 an der Medizinischen Kleintierklinik vorgestellt und es wurde im Rahmen von notwendigen Untersuchungen die β HB-Konzentration im Blut bestimmt und zeitgleich eine Urinuntersuchung mittels Nitroprussid-Urinteststreifen durchgeführt. Im Patientengut 3 lag das Alter der Tiere zwischen 5 und 18 Jahren (Median 11 Jahre). Bei einer Katze lag keine Altersangabe vor. In dieser Gruppe waren 26 Europäisch Kurzhaar (ein Tier war mit 2 Untersuchungen vertreten), ein Europäisch Langhaar-Mischling, eine Siamkatze, ein Siam-Mischling (mit 2 Untersuchungen vertreten) eine Norwegische Waldkatze, eine Russisch Blau (mit 2 Untersuchungen vertreten) und ein Angora-Mischling vertreten. Die Gruppe bestand aus 20 männlich kastrierten (ein Tier war mit 2 Untersuchungen vertreten) und 12 weiblich kastrierten Tieren (2 Tiere waren mit 2 Untersuchungen vertreten).

Patienten konnten mehrfach verwendet werden, wenn sie zu verschiedenen

Kontrollzeitpunkten vorgestellt wurden. Für den GlucoMen® LX PLUS wurden 35 Ergebnisse von 32 Katzen für den Vergleich mit den Ergebnissen der Ketonkörpermessung aus Urin mittels Nitroprussid-Urinteststreifen analysiert. Für die Referenzmethode konnten 18 Ergebnisse von 18 Katzen analysiert werden.

2. Methoden

Die Evaluation der Richtigkeit der Messung von β HB aus venösem und kapillärem Blut mithilfe des in dieser Studie eingesetzten Ketonometers GlucoMen® LX PLUS erfolgte durch den Vergleich der Messwerte mit denen der Referenzmethode. Zum einen wurde dafür Serum (venös) gewonnen, zum anderen EDTA- und Kapillarblut. Um die Präzision des GlucoMen® LX PLUS und der Referenzmethode zu beurteilen, wurden Wiederholungsmessungen (10 Messungen) aus je einer repräsentativen Probe mit zuvor bekannter niedriger und hoher β HB-Konzentration mittels GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode durchgeführt und miteinander verglichen. Um die entsprechenden Proben auswählen zu können, erfolgte die Bestimmung der β HB-Konzentration in der jeweiligen Probe mittels GlucoMen® LX PLUS oder der Referenzmethode. Ferner wurde der Einfluss der Hämatokrit-, Triglyzerid-, Cholesterin-, Bilirubin-, Albumin-, Totalprotein-, Harnstoff-, Kreatinin- und Fruktosaminkonzentration der Proben des venösen Blutes auf die Richtigkeit der Messergebnisse des GlucoMen® LX PLUS und der Referenzmethode untersucht. Die Untersuchung der gewonnenen Urinproben auf Ketonkörper erfolgte mittels Nitroprussid-Urinteststreifen.

2.1. Probengewinnung

Die Blut- und die Urinprobenentnahme erfolgte aus dem oben genannten Patientengut (siehe Kapitel III.1.2.) in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Blut- und Urinproben wurden nach der Entnahme unmittelbar im Labor der Medizinischen Kleintierklinik bearbeitet und untersucht. Etwa 0,3 ml der Serumproben wurden anschließend bis zur Referenzmessung der β HB-Konzentration für maximal 3 Monate bei -20°C aufbewahrt.

2.1.1. Blutproben

Zur Validierung des GlucoMen® LX PLUS wurden Proben venösen Vollblutes

mit und ohne Antikoagulans sowie Proben kapillären Blutes verwendet. Die Proben venösen Blutes wurden von den Katzen der Patientengruppe im Rahmen von ohnehin notwendigen Laboruntersuchungen entnommen. Die Proben kapillären Blutes wurden im Rahmen der Studie zusätzlich gewonnen. Die Blutproben der Kontrollgruppe wurden im Rahmen einer Gesundheitsvorsorge entnommen.

2.1.1.1. Venöse Blutproben

Die Gewinnung der Proben venösen Blutes erfolgte durch Punktion der *Vena (V.) cephalica antebrachii* oder der *V. saphena medialis* nach Rasur des Fells und Desinfektion der Haut mit Kodan® Tinktur forte (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit einer sterilen Einmalkanüle (BD Microlance™ 3, 20 G, 0,9 x 40 mm, Becton Dickinson GmbH, Fraga, Spanien). Es wurden jeweils ca. 0,5–1 ml Blut frei tropfend in einem 1,1 ml Micro-Tube-Serum-Gel-Z-Röhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) oder in einem 1,3 ml Micro-Tube-K3-EDTA-Röhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen. Für die Blutgasmessung wurde die benötigte Blutmenge vor dem Befüllen der anderen Probenröhrchen in einer 2-ml-Blutgas-Monovette® mit kalziumbalanciertem Lithium-Heparin (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen und diese unmittelbar verschlossen, um die Exposition mit der Umgebungsluft möglichst gering zu halten. Die Blutgasmessung erfolgte direkt im Anschluss an die Probengewinnung im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Die Blutprobe wurde nach der Entnahme umgehend in die jeweiligen Probenröhrchen überführt. Bei jeder Probenentnahme wurde zur Bestimmung der β HB-Konzentration mittels des Ketonometers GlucoMen® LX PLUS ein Tropfen Vollblut frei tropfend auf einem Objektträger (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland) aufgefangen. Die β HB-Bestimmung aus dem Tropfen venösen Blutes erfolgte während oder unmittelbar im Anschluss an die Probengewinnung. Die Bestimmung der β HB-Konzentration mittels GlucoMen® LX PLUS aus EDTA-Blut erfolgte ebenfalls unmittelbar nach der Probengewinnung.

Die Proben venösen Vollblutes wurden nach erfolgter Blutgerinnung im Serumröhrchen im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-

Maximilians-Universität München mit der Zentrifuge Universal 32 R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) für 5 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert. Zur Messung des β HB-Gehaltes der Proben mittels Referenzmethode wurden mindestens 0,3 ml dieses Serums anschließend für maximal 3 Monate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und erst unmittelbar vor der Referenzmessung in das Labor der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität verbracht und dort aufgetaut. Die Bestimmung der Triglyzerid-, Cholesterin-, Bilirubin-, Albumin-, Totalprotein-, Harnstoff-, Kreatinin- und Fruktosaminkonzentration des venösen Blutes erfolgte umgehend nach der Blutentnahme und Bearbeitung der Serumprobe im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

2.1.1.2. Kapilläre Blutproben

Bei 22 Katzen wurde zusätzlich zur oben beschriebenen Blutentnahme Kapillarblut entnommen. Dabei wurde die Ohrmuschel mit einem trockenen Tupfer gereinigt und durch leichtes Reiben hyperämisiert. Mithilfe der Stechhilfe Glucoject[®] Dual S (A. Menarini Diagnostics, Florenz, Italien), die mit einer sterilen Einmallanzette (Glucoject[®] Lancets, A. Menarini Diagnostics, Florenz, Italien) versehen ist, wurde anschließend die Innenseite der Ohrmuschel punktiert. In Fällen, in denen das so generierte Blutprobenvolumen zu gering für die Messung mit dem Ketonometer war, wurde die Ohrmuschelbasis vorsichtig massiert, um eine größere Blutmenge zu gewinnen. Die Messung der β HB-Konzentration mittels GlucoMen[®] LX PLUS erfolgte unmittelbar nach der Probengewinnung durch Eintauchen des Messstreifens in den generierten Blutstropfen.

2.1.2. Urinproben

Die Urinprobenentnahme erfolgte bei 20 Patienten durch ultraschallgeführte Zystozentese mit dem Ultraschallgerät Logiq P6 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien). Dafür wurde nach Rasur des Fells im Bereich des hinteren ventralen Abdomens und Desinfektion der Haut mit einer 70%igen Alkohollösung die Harnblase mittels einer sterilen Einmalkanüle (BD Microlance[™] 3, 22 G, 0,7 x 30 mm, Becton Dickinson GmbH, Fraga, Spanien) und aufgesetzter 10 ml Spritze (BD Discardit[™] II, Becton Dickinson GmbH,

Fraga, Spanien) punktiert. Um eine Kontamination der Probe durch anhaftende Hautkeime zu vermeiden, wurde die aufgesetzte Kanüle nach erfolgter Urinentnahme durch eine neue sterile Einmalkanüle ersetzt. Bei einem Patienten konnte aufgrund mangelnder Kooperation nur aufgefangener Urin verwendet werden. Bei einem weiteren Patienten konnte aufgrund der Dehydratation und des damit einhergehenden fehlenden Urinvolumens keine Urinprobe gewonnen werden. Die Entnahme der Urinproben erfolgte bei den verbliebenen Patienten nicht zeitgleich mit der β HB-Messung. Die Ergebnisse gingen daher nicht in die Untersuchung ein. Insgesamt konnten 21 Urinproben zur statistischen Auswertung des GlucoMen[®] LX PLUS und 18 Urinproben zur Auswertung der Referenzmethode genutzt werden. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität untersucht. Der Rest der mittels Zystozentese gewonnenen Urinprobe wurde bis zur bakteriologischen Untersuchung bei 6 °C im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität gelagert.

2.2. Probenuntersuchung

Die Untersuchung der entnommenen Blutproben wurde in mehreren Schritten vorgenommen. Die β HB-Messung mittels GlucoMen[®] LX PLUS erfolgte bei venösem Vollblut während und im Fall von EDTA- und Kapillarblut unmittelbar nach der Entnahme des Blutes. Die Blutgasmessung erfolgte unmittelbar nach der Blutprobenentnahme im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem POC-System RAPIDPoint[®] 405 (Siemens AG Healthcare, Erlangen, Deutschland). Die Bestimmung des Hämatokrits und der Triglyzerid-, Cholesterin-, Bilirubin-, Albumin-, Totalprotein-, Harnstoff-, Kreatinin- und Fruktosaminkonzentration des venösen Blutes wurde ebenfalls im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Untersuchung der o. g. Serumchemieparameter erfolgte per Absorptionsphotometrie mit dem Cobas Integra[®] 400 PLUS (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Die Bestimmung des Hämatokrits wurde mit dem Gerät Sysmex XT 2000i (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) vorgenommen. Die Urinproben wurden direkt nach der Entnahme im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München mittels Combur9-Test[®]-Urinteststreifen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) auf das

Vorhandensein von Ketonkörpern untersucht. Die bakteriologische Untersuchung des Urins erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Untersuchung im Labor des Lehrstuhls für Bakteriologie und Mykologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Bearbeitung der Proben und Untersuchungen der Laborparameter der Patienten, deren Daten retrospektiv ausgewertet wurden, erfolgten wie oben beschrieben.

2.2.1. Messung mittels der Referenzmethode

Zur Evaluation der Richtigkeit des GlucoMen[®] LX PLUS wurden die Messwerte aus Proben venösen Vollblutes mit und ohne EDTA sowie aus Kapillarblut mit denen der Referenzmethode aus dem Serum der entsprechenden Blutproben verglichen. Die Referenzmessung der β HB-Konzentration wurde mit dem Gerät Cobas[®] c311 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mittels der β HB-Dehydrogenase-Methode mit dem Ranbut[®] Assay (Randox Laboratories Limited, Crumlin, County Antrim, Großbritannien) (Tabelle 7) im Labor der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Das Cobas[®] c311 ist ein vollautomatisches Analysesystem, das zur quantitativen Bestimmung der Konzentrationen von Substraten, spezifischen Proteinen, Enzymen, Elektrolyten, Medikamenten und Drogen in Serum, Plasma, Urin, Liquor und Vollblut eingesetzt werden kann. Die Messung der β HB-Konzentration einer Probe erfolgt bei diesem Verfahren spektrophotometrisch. Der Ranbut[®] Assay ist für ein breites Spektrum an automatischen Analysesystemen geeignet. Der Test ermöglicht eine sensitive und lineare β HB-Bestimmung aus Serum und Plasma. Bei einer β HB-Konzentration von 0,1–3,2 mmol/l ist eine lineare Messung möglich. Proben mit höheren Konzentrationen erfordern die Verdünnung der Probe nach Herstellerangaben. Die Kalibrierung des Analysesystems erfolgt mit einer der Packung beiliegenden Standardlösung. Die täglichen Gerätekontrollen werden mittels einer auf humanem Serum basierenden Multiserumkontrolle des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 7: Intra-Assay-Präzision (within run precision) des Ranbut® Assays zur β HB-Bestimmung (Referenzmessung) (β HB = β -Hydroxybutyrat, mmol/l = Millimol pro Liter) (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, County Antrim, Großbritannien, 2007).

| Intra-Assay-Präzision | Kontrolllösung 1 | Kontrolllösung 2 | Kontrolllösung 3 |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Mittelwert β HB (mmol/l) | 0,32 | 1,27 | 2,41 |
| Standardabweichung | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Variationskoeffizient (%) | 2,87 | 0,57 | 0,54 |
| Probenanzahl | 20 | 20 | 20 |

2.2.2. Messung mittels des portablen Ketonkörpermessgerätes

In dieser Studie wurde das PBGM GlucoMen® LX PLUS (A. Menarini Diagnostics GmbH, Florenz, Italien) in seiner Funktion als POC-Test für die Ketonkörperbestimmung aus venösem und kapillärem Blut von Katzen validiert. Dieses Gerät ist ein Kombinationsgerät aus der Humanmedizin, das sowohl die Blutglukose- als auch die -ketonkörpermessung ermöglicht. Das Messprinzip dieses Ketonometers beruht auf der enzymatischen β HBDH-Methode, bei der β HB durch das Enzym β HB-Dehydrogenase zu AcAc oxidiert und entsprechend eine äquivalente Menge an NAD^+ zu NADH reduziert wird. NADH wird anschließend durch einen Reoxidator zu NAD^+ weiter oxidiert, wobei ein messbares elektrisches Potential entsteht, das proportional zu der in der Probe enthaltenen β HB-Konzentration ist. Zur β HB-Messung benötigt der GlucoMen® LX PLUS als Probenmaterial 0,8 μl frisches kapilläres Vollblut, das bei Kontakt mit der Blutprobe durch ein spezielles Bluteinzugsverfahren automatisch in den Reaktionsbereich des zugehörigen Messstreifens transportiert wird.

Zur Messung wurden die zum Ketonometer zugehörigen GlucoMen® LX β -Keton-Sensor-Teststreifen (A. Menarini Diagnostics, Florenz, Italien) verwendet. Beim Einsetzen in den Teststreifeneinschub werden die Streifen automatisch erkannt. Der Reaktionsbereich besteht aus einer Tripelkammer, in der sich 3 Elektroden befinden: eine Arbeitselektrode zur Messung von β HB und der Interferenzen, eine Arbeitselektrode allein zur Interferenzmessung, und eine Referenzelektrode. Das vom Ketonometer gemessene Signal ist die Differenz aus dem gemeinsamen elektrischen Potenzial der enzymatischen Umsetzung des β HB und der Interferenzen, und dem alleinigen Interferenzpotenzial. Aufgrund einer speziellen auf nanotechnologischen Goldelektroden basierenden Technik ist keine Codierung der Messstreifen erforderlich.

Das Messergebnis liegt nach 10 Sekunden vor. Der mittels Ketonometer messbare Bereich liegt zwischen 0,1 und 8,0 mmol/l. Konzentrationen, die unter oder über diesem Bereich liegen, werden auf dem Display mit „LO“ (low) bzw. „HI“ (high) angezeigt.

Zur Kontrolle der korrekten Funktion des Gerätes und der Messstreifen stehen standardisierte Kontrolllösungen des Herstellers zur Verfügung. Bei korrekter Funktion liegt die vom Gerät gemessene Ketonkörperkonzentration in dem vom Hersteller für die jeweilige Kontrolllösung angegebenen Zielbereich. Der GlucoMen® LX PLUS wurde einmal wöchentlich mit den zugehörigen Kontrolllösungen überprüft.

Das Gerät wurde nach Herstellerangaben gelagert und vor der Blutprobenentnahme zusammen mit den benötigten Messstreifen bereitgelegt. Die β HB-Bestimmung aus venösem Vollblut wurde noch während oder direkt im Anschluss an die Blutentnahme aus einem Tropfen Blut, der auf einen Objektträger getropft und in den der Teststreifen des GlucoMen® LX PLUS getaucht wurde, vorgenommen.

Die Messung wurde im prospektiven Teil dieser Studie bei 26 Patienten und 12 Kontrolltieren durchgeführt. Im Anschluss an diese Messung wurde bei einem Teil der Patienten (n = 22) die β HB-Konzentration zusätzlich aus einer Probe kapillären Blutes gemessen. Bei den Patienten, bei denen auch eine mit EDTA versetzte Blutprobe verfügbar war (n = 19), wurde auch daraus die β HB-Bestimmung durchgeführt. Bei 21 Patienten wurden die Daten der β HB-Messung (n = 27) retrospektiv verwendet. Die technischen Daten des GlucoMen® LX PLUS sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Technische Daten des GlucoMen® LX PLUS (μl = Mikroliter, mmol/l = Millimol pro Liter, $^{\circ}\text{C}$ = Grad Celsius, M. ü. N. = Meter über Normalnull, EDTA = Ethylendiamintetraacetat) (Menarini Diagnostics GmbH, Florenz, Italien).

| | GlucoMen® LX PLUS |
|--|--|
| Hersteller | Menarini Diagnostics GmbH, Florenz, Italien |
| messbare Substrate | β -Hydroxybutyrat, Glukose |
| Messmethode | Biosensor mit β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, amperometrisch |
| Probenart | frisches kapilläres Vollblut |
| Probenvolumen | 0,8 μl |
| Probenentnahmestelle | empfohlen: Fingerbeere |
| Messdauer β-Hydroxybutyrat | 10 Sekunden |
| Messbereich β-Hydroxybutyrat | 0,1–8,0 mmol/l |
| Kalibrierung | humanes Plasma |
| Speicherplatz | 400 Messwerte |
| Betriebstemperatur | 5–45 $^{\circ}\text{C}$ |
| relative Luftfeuchtigkeit | 10–90 % |
| Meereshöhe | bis 3000 M. ü. N. |
| Lagertemperatur | Gerät: -25–46 $^{\circ}\text{C}$ Messstreifen: 4–30 $^{\circ}\text{C}$ Kontrolllösungen: 2–30 $^{\circ}\text{C}$ |
| Hämatokritbereich | 25–60 % |
| Einflussfaktoren auf die Richtigkeit der Messergebnisse | Dehydratation, Hypertension, Schock, hyperosmolarer Zustand, Hämatokrit, Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Höhe, elektromagnetische Strahlung, Sauerstoffdruck |
| nicht zur Anwendung bei | Neugeborenen, schwer kranken Patienten, EDTA-antikoagulierten Blutproben, venösen Proben, Plasma, Serum |

2.2.3. Messung mittels Nitroprussid-Urinteststreifen

Zur Untersuchung der gewonnenen Urinproben auf das Vorhandensein von Ketonkörpern wurden die Urinteststreifen Combur-Test9® verwendet. Diese

Teststreifen zeichnen sich durch ein spezielles Nylonnetz aus, das über ein Reagenzpapier gespannt ist. Es wird mithilfe eines Klebstoffs auf diesem Papier fixiert, der den Farbumschlag nicht beeinflusst. Eine Saugpapierschicht nimmt überschüssigen Urin auf und verhindert so potenzielle Wechselwirkungen von übertretenden Reagenzien benachbarter Testfelder. Die Teststreifen zeigen eine Unempfindlichkeit gegenüber der Vitamin-C-Konzentration in Urinproben, wodurch einem falsch negativen Ergebnis auf den Testfeldern für den Glukosenachweis vorgebeugt werden kann. Der Test erlaubt die gleichzeitige semiquantitative Bestimmung 9 verschiedener Parameter. Das sind neben der genannten Glukose: pH-Wert, Leukozyten, Nitrit, Protein, Ketone, Urobilinogen und Bilirubin. Nach Eintauchen des Teststreifens in die Urinprobe kann das Testergebnis nach 60–120 Sekunden in Form einer Farbreaktion des jeweiligen Testfeldes mit der Farbskala auf dem Teststreifenbehälter verglichen werden. Farbveränderungen, die sich nur im Randbereich des jeweiligen Testfeldes ereignen oder erst nach mehr als 2 Minuten auftreten, sind diagnostisch nicht relevant. Die Bestimmung der Ketonkörperkonzentration (AcAc und Aceton) erfolgt dabei semiquantitativ durch eine Nitroprussidreaktion. Die Nachweisgrenze für AcAc liegt bei 0,5 mmol/l. Anhand der Farbskala kann die Ketonkörperkonzentration der Urinprobe abgeschätzt werden. Der Testbereich reicht von < 0,5 mmol/l (negativ) bis zu 15 mmol/l (3+). Durch das enthaltene Glycin wird zudem der Nachweis von Aceton ermöglicht (siehe Kapitel II.2.1.), wobei der Test jedoch eine höhere Sensitivität für AcAc aufweist. Laut Herstellerangaben führen Phenylketone und Phthaleinverbindungen zu einer roten Färbung des Reaktionsfeldes, die sich jedoch von der violetten durch Ketonkörper verursachten Färbung unterscheidet (ROCHE DIAGNOSTICS, 2011). Die Arzneistoffe Captopril, Mesna und andere Sulfhydrylgruppen enthaltende Substanzen können zu einem falsch positiven Ergebnis führen.

2.3. Untersuchung einflussnehmender Parameter

In dieser Studie wurde zusätzlich der potenzielle Einfluss verschiedener Blutparameter auf die Messergebnisse des GlucoMen® LX PLUS und die Werte der Referenzmethode untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss des Antikoagulans EDTA auf die β HB-Messwerte des GlucoMen® LX PLUS überprüft.

2.3.1. Einfluss von Ethylendiamintetraacetat

Zur Beurteilung des Einflusses des Antikoagulans EDTA auf die Richtigkeit der Messergebnisse des in der vorliegenden Studie verwendeten GlucoMen® LX PLUS wurde bei 19 Katzen die β HB-Konzentration der in EDTA-Röhrchen vorhandenen Proben venösen Blutes mit dem Ketonometer gemessen. Das Ergebnis dieser Messung wurde anschließend mit dem Messergebnis der Referenzmethode aus venösem Serum verglichen.

2.3.2. Einfluss des Hämatokrits

Der Hämatokrit wurde im Rahmen der ohnehin notwendigen weiterführenden Diagnostik im Patientengut 1 untersucht. Die Bestimmung erfolgte mit dem Gerät Sysmex XT 2000i im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Es konnten 32 Hämatokritwerte zur Evaluation des Einflusses auf die Richtigkeit der Messwerte des GlucoMen® LX PLUS und der Referenzmethode genutzt werden.

2.3.3. Einfluss von Serumchemieparametern

Die Serumchemieparameter des venösen Blutes wurden ebenfalls im Rahmen der ohnehin notwendigen weiterführenden Diagnostik im Patientengut 1 untersucht. Die Untersuchung erfolgte mit dem Cobas Integra® 400 PLUS Analysegerät im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Messung der Konzentrationen von Triglyzeriden, Cholesterin, Bilirubin, Albumin, Totalprotein, Harnstoff, Kreatinin und Fruktosamin erfolgte dabei durch Absorptionsphotometrie. Insgesamt konnten 49 Triglyzerid- und Cholesterinwerte, 55 Bilirubin-, 53 Kreatinin-, 55 Harnstoff-, je 54 Albumin- und Totalprotein- und 30 Fruktosaminwerte zur Evaluation des Einflusses auf die Messwerte des GlucoMen® LX PLUS und der Referenzmethode genutzt werden.

2.4. Auswertung

Die Validierung des GlucoMen® LX PLUS erfolgte anhand der Ermittlung der Richtigkeit der gemessenen β HB-Werte und der Präzision des Gerätes. Alle ermittelten Blutparameterkonzentrationen und Patientendaten wurden in Tabellen der Tabellenkalkulationssoftware Microsoft Office Excel® 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika) dokumentiert und für die statistische Auswertung in die Statistikprogramme IBM® SPSS® Statistics 22 (SPSS Inc., Chicago, Vereinigte Staaten von Amerika) und MedCalc® 15 und 16

(MedCalc Software, Ostende, Belgien) übertragen.

2.4.1. Ausschluss von Proben

Um dem vom Hersteller definierten Messbereich gerecht zu werden und die damit verbundenen Limitationen des Gerätes zu berücksichtigen, wurden in den Fällen, in denen bei der Messung mittels GlucoMen® LX PLUS im Display ein „HI“ (high) abzulesen war, entsprechende Werte nicht in die Regressionsanalyse nach Passing-Bablok und das Streudiagramm nach Bland-Altman einbezogen. Bei der Erstellung der ROC-Analyse wurden die mit „HI“ (high) gemessenen Werte in die Berechnung eingeschlossen. Etwaige Fehlermeldungen des Gerätes bei der β HB-Messung, die zu einem Ausschluss einer Probe geführt hätten, wurden nicht beobachtet.

2.4.2. Statistische Tests

Die statistischen Tests wurden mit den Statistikprogrammen IBM® SPSS® Statistics 22 sowie MedCalc® 15 und 16 durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag für alle Tests bei $\alpha = 0,05$ mit einem Konfidenzniveau von 95 %.

Zum Vergleich der Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus unterschiedlichen Blutprobenarten mit denen der Referenzmethode aus Serum wurde eine Regressionsanalyse nach Passing-Bablok durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die graphische Darstellung mittels Streudiagramm nach Bland-Altman. Zur Ermittlung von spezifischen β HB-Cut-off-Werten wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Der potenzielle Einfluss verschiedener Blutparameter auf die Messwerte des Ketonometers und der Referenzmethode wurde durch den Rangkorrelationskoeffizienten nach Kendall-Tau (τ) ermittelt. Zuletzt wurden die Ergebnisse der Nitroprussid-Urinteststreifen mit den Ergebnissen des GlucoMen® LX PLUS (Vollblut) und der Referenzmethode (Serum) mittels exaktem Fisher-Test verglichen.

2.4.2.1. Regressionsanalyse und graphische Darstellung

Mithilfe der Statistikprogramme MedCalc® 15 und 16 wurden zum Vergleich der unten aufgeführten Messwertepaare Streudiagramme erstellt:

- (1) Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus venösen Vollblutproben ohne Antikoagulanzen *versus* Messwerte der Referenzmethode aus Serum
- (2) Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus Kapillarblutproben *versus*

Messwerte der Referenzmethode aus Serum

- (3) Messwerte des GlucoMen[®] LX PLUS aus venösen EDTA-Blutproben *versus* Messwerte der Referenzmethode aus Serum

Mittels Regressionsanalyse nach Passing-Bablok (PASSING & BABLOK, 1983) wurde untersucht, ob signifikante proportionale oder lineare (systematische) Abweichungen zwischen den verglichenen Messwerten vorlagen. Die Regressionsanalyse nach Passing-Bablok bietet den Vorteil, relativ robust gegenüber Ausreißern unter den Messwerten zu sein, und es werden keine besonderen Annahmen bezüglich der Verteilung der Messfehler oder der Stichprobengröße vorausgesetzt. Die Messwerte der Referenzmethode werden bei diesem Verfahren auf der X-Achse und die Werte des neuen Testverfahrens auf der Y-Achse aufgetragen. Die Regressionsgleichung nach Passing-Bablok wurde mit der Formel $y = a + bx$ angegeben.

Die Analyse erfolgte in der vorliegenden Studie anhand der durch das Statistikprogramm MedCalc[®] 15 berechneten Steigung (slope B) der Regressionsgeraden nach Passing-Bablok und dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden auf dem Y-Achsenabschnitt (intercept A) und ihrer jeweiligen Konfidenzintervalle (CI) bei einem Konfidenzniveau von 95 %. Während der Y-Achsenabschnitt die mittlere Abweichung der Messwerte beschreibt (systematischer Fehler = Bias), entspricht die Steigung der Regressionsgeraden der zu- oder abnehmenden Abweichung der Messwerte mit steigender Konzentration des gemessenen Parameters (proportionaler Fehler). Das Konfidenzintervall gibt an, ob der für den Y-Achsenabschnitt und die Steigung berechnete Wert nur zufällig vom Wert 0 oder 1 abweicht. Wenn der 95 % CI für die Steigung den relevanten Wert 1 und für den Achsenabschnitt den relevanten Wert 0 enthält, kann man annehmen, dass keine signifikanten proportionalen oder konstanten Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Messmethoden vorliegen und beide gleichwertig verwendet werden können. Die Regressionsanalyse nach Passing-Bablok erfasst zusätzlich die Linearität der beiden Testverfahren mittels CUSUM-Test. Bei signifikanten Abweichungen der Linearität ($p < 0,05$) ist die Regressionsanalyse nach Passing-Bablok nicht geeignet, um die beiden Verfahren zu untersuchen. Zudem sind in diesem Fall weitere Tests zur Prüfung der Übereinstimmung in Form eines Bland-Altman Diagrammes nicht sinnvoll. Bei allen untersuchten Blutprobenarten war ein

linearer Zusammenhang zwischen den zu vergleichenden Methoden erkennbar.

Anschließend erfolgte die Evaluation der Richtigkeit der Messungen des GlucoMen® LX PLUS aus venösem Vollblut der Katzen durch die Berechnung der mittleren Differenz der Messwerte des GlucoMen® LX PLUS von den Messwerten der Referenzmethode unter Erstellung eines Streudiagrammes nach Bland-Altman (BLAND & ALTMAN, 1999) mithilfe des Statistikprogrammes MedCalc® 16. Dies ermöglicht es, zusätzlich die Abweichungen der beiden Methoden in Abhängigkeit von der steigenden β HB-Konzentration graphisch darzustellen und zu bewerten. Zur Berechnung der Differenz (Bias = systematischer Fehler) eines einzelnen Messwertepaares wurden die Messwerte der Referenzmethode von den Messwerten des Ketonometers subtrahiert (GlucoMen® LX PLUS minus Referenzmethode (Y-Achse)) und gegen die Messwerte der Referenzmethode (X-Achse) aufgetragen. Bei positivem Bias lagen die Werte des GlucoMen® LX PLUS dementsprechend im Schnitt über den Werten der Referenzmethode und bei negativem Bias durchschnittlich unter den Ergebnissen der Referenzmethode. Die beim Bland-Altman-Diagramm zusätzlich berechneten Übereinstimmungsgrenzen ($\pm 1,96$ Standardabweichung (SD)) geben den β HB-Bereich an, in dem 95 % der individuellen Abweichungen der Messwerte zu erwarten sind. Diese Übereinstimmungsgrenzen dienen der Beurteilung der Vergleichbarkeit der getesteten Methoden. Bei den Bland-Altman-Diagrammen wurden in der vorliegenden Studie zur besseren klinischen Einschätzung der Ergebnisse die absoluten Werte zur Erstellung der Diagramme genutzt.

Der Einfluss des Antikoagulans EDTA auf die Messwerte des GlucoMen® LX PLUS wurde ebenfalls durch Vergleich der β HB-Messwerte aus mit EDTA versetzten Proben venösen Blutes mit den Messwerten der Referenzmethode aus Serum ermittelt. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mittels Regressionsanalyse nach Passing-Bablok und Streudiagramm nach Bland-Altman entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen.

Zur Beurteilung der Richtigkeit des GlucoMen® LX PLUS bei Verwendung von Proben kapillären Blutes wurden diese Messwerte ebenfalls mit den Werten der Referenzmessung aus Serum verglichen. Die graphische Darstellung mittels Streudiagrammen und die statistische Berechnung erfolgten wie oben

beschrieben.

2.4.2.2. Variationskoeffizient

Zur Berechnung der Präzision (Reproduzierbarkeit der Messwerte) wurden mittels Tabellenkalkulationssoftware Microsoft Office Excel[®] 2010 der Intra-Assay-Variationskoeffizient (CV), die SD und der Mittelwert (MW) des GlucoMen[®] LX PLUS und der Referenzmethode für die Messungen aus je einer repräsentativen Probe mit hoher und niedriger β HB-Konzentration errechnet. Zur Berechnung des CV wurde die SD durch den MW der Messwerte dividiert und mit 100 multipliziert. Der Intra-Assay-CV eines Testverfahrens wird durch wiederholte aufeinanderfolgende Messungen derselben Probe ermittelt und gibt Ausschluss über die zufälligen Fehler der Messmethode. In der vorliegenden Studie wurden jeweils 10 Wiederholungsmessungen aus Serumproben und aus Proben venösen Vollblutes mittels Referenzmethode und GlucoMen[®] LX PLUS durchgeführt.

2.4.2.3. Rangkorrelationskoeffizient nach Kendall-Tau

Die Untersuchung, ob ein signifikanter Einfluss der Konzentrationen verschiedener Blutparameter auf die Messwerte der Referenzmethode und des GlucoMen[®] LX PLUS besteht, erfolgte durch Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Kendall-Tau (τ). Die Berechnung wurde mittels des Statistikprogrammes IBM[®] SPSS[®] Statistics 22 durchgeführt.

2.4.2.4. Receiver-Operating-Characteristic-Curve-Analyse

Die Ermittlung eines β HB-Cut-off-Werts für Referenzmethode und GlucoMen[®] LX PLUS, zur Diagnose einer DKA, erfolgte anhand einer ROC-Analyse (ZWEIG & CAMPBELL, 1993) mithilfe der Statistikprogramme IBM[®] SPSS[®] Statistics 22 und MedCalc[®] 15. Zur Berechnung wurden die Daten des Patientengutes 2.1. verwendet. Analog wurde, basierend auf den Daten des Patientengutes 2.2, für beide Methoden jeweils ein eigener β HB-Cut-off-Wert mittels ROC-Analyse ermittelt, der für eine gute glykämische Kontrolle des DM spricht, bei dem die Blutglukosewerte gut reguliert sind und daher keine Ketonkörper gebildet werden. Neben der Ermittlung spezifischer Cut-off-Werte konnte bei der ROC-Analyse anhand der Fläche unter der Kurve (AUC: area under curve) ermittelt werden, ob die untersuchte Methode als diagnostischer Test geeignet war. Eine AUC von 1 wurde dabei als „perfekt“ angesehen und der Test erbrachte folglich eine gute diagnostische Leistung, während eine AUC von 0,5

einen Test als ungeeignet zur Diagnose auswies (SWETS, 1988; ZWEIG & CAMPBELL, 1993; GARDNER & GREINER, 2006). Zusätzlich wurde in dieser Studie das positive Wahrscheinlichkeitsverhältnis (LR: likelihood ratio) (Sensitivität/ (1 minus Spezifität)) als weiterer Wert ausgewählt, um die diagnostische Effizienz der Referenzmethode und des GlucoMen® LX PLUS zu bewerten. Für jedes Testergebnis errechnete sich ein eigenes positives LR, das angab um wieviel höher die Wahrscheinlichkeit bei einem kranken Patienten war, im Test ein entsprechend positives Ergebnis zu haben. Je größer das positive LR, desto besser war das jeweilige Testverfahren geeignet, um einen kranken Patienten zu identifizieren (DEEKS & ALTMAN, 2004).

2.4.2.5. Exakter Fisher-Test

Zum Vergleich der mittels Urineststreifen ermittelten Ketonkörperkonzentration mit den Ketonkörpermessergebnissen der Referenzmethode (Serum) und des GlucoMen® LX PLUS (Vollblut) wurde der exakte Fisher-Test am Patientengut 3 angewendet. Die Berechnung und die graphische Darstellung erfolgte mittels einer Vierfeldertafel mithilfe der Statistiksoftware MedCalc® 15. Der Test ermöglichte zu beurteilen, ob die beiden untersuchten Variablen unabhängig voneinander sind. Das bedeutet, dass mit dem im Rahmen dieser Studie durchgeführten Hypothesentest die Wahrscheinlichkeit geprüft wird, dass sowohl die Messung von Ketonkörpern in Blut als auch in Urin im Falle einer Erkrankung ein positives Ergebnis liefert (BLAND, 2015). Wenn der p-Wert (zweiseitig) < 0,05 lag, konnte die Nullhypothese verworfen werden. In diesem Fall zeigen die hier überprüften Testverfahren signifikante Unterschiede bezüglich ihrer Fähigkeit, die Erkrankung als diagnostiziert zu bewerten. Der Test stellte im Gegensatz zum Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) keine Bedingungen an den Stichprobenumfang, daher konnte auch die Überprüfung einer kleineren Probenanzahl vorgenommen werden (LUDBROOK, 2008; BLAND, 2015).

IV. ERGEBNISSE

1. Referenzmethode

In dieser Studie wurde eine enzymatische spektrophotometrische Referenzmethode zur Validierung des portablen Ketonkörpermessgerätes GlucoMen® LX PLUS verwendet. Dies erfolgte durch Vergleich der β HB-Messungen des portablen Gerätes aus unterschiedlichen Blutprobenarten mit denen der Referenzmethode aus Serum. In diesem Zusammenhang wurden zusätzlich die Intra-Assay-Präzision und der potenzielle Einfluss anderer Blutparameter auf die Richtigkeit der Messwerte der Referenzmethode untersucht. Weiterhin wurden diagnostische β HB-Cut-off-Werte für die Methode ermittelt, die zur Diagnose einer DKA genutzt werden können oder Auskunft darüber geben, wann eine schlechte glykämische Kontrolle eines DM mit erhöhten Blutglukosewerten und einer vermehrten Bildung von Ketonkörpern vorliegt. Die Referenzmessung wurde bei insgesamt 80 Serumproben von Katzen durchgeführt. Der mittels Referenzmethode gemessene β HB-Konzentrationsbereich der Serumproben lag bei 0,0–19,8 mmol/l.

1.1. Intra-Assay-Präzision

Die Intra-Assay-Präzision der Referenzmethode wurde anhand von 2 repräsentativen Proben für hohe und niedrige β HB-Konzentrationen im Patientengut 1 ermittelt. Der hohe β HB-Konzentrationsbereich lag bei 5,8–6,0 mmol/l, der niedrige bei 0,1 mmol/l. Es ergab sich sowohl für die hohe als auch für die niedrige Konzentration eine sehr gute Präzision. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Ermittelte Intra-Assay-Präzision der Referenzmethode (β HB = β -Hydroxybutyrat, CV = Variationskoeffizient, Konz. = Konzentration, mmol/l = Millimol pro Liter, SD = Standardabweichung).

| βHB-Konzentration (mmol/l) | Anzahl der Messungen | Mittelwert (mmol/l) | Median (mmol/l) | SD (mmol/l) | Intra-Assay-CV (%) |
|--|-----------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------|---------------------------|
| hohe Konz. (5,8–6,0) | 10 | 5,91 | 5,90 | 0,07 | 1,2 |
| niedrige Konz. (0,1) | 10 | 0,1 | 0,1 | 0 | 0 |

1.2. Untersuchung einflussnehmender Parameter

In dieser Studie wurde der Einfluss verschiedener Blutparameter auf die β HB-Messwerte der Referenzmethode aus Serumproben untersucht. Dabei wurde der Einfluss des Hämatokrits und verschiedener Serumchemieparameter im Patientengut 1 überprüft.

1.2.1. Einfluss des Hämatokrits

Der Einfluss des Hämatokrits auf die β HB-Messergebnisse der Referenzmethode wurde mittels Korrelationskoeffizienten nach Kendall-Tau (τ) untersucht. Die hier untersuchte Messspanne des Hämatokrits umfasste Werte von 13,6–48,6 %. Tabelle 10 und 11 zeigen den Koeffizienten mit dem zugehörigen p-Wert sowie den Median mit Messspanne, den MW und die SD der gemessenen Hämatokritwerte der Diabetiker.

Tabelle 10: Korrelation der β HB-Messergebnisse der Referenzmethode mit der Höhe des Hämatokrits und Angabe des p-Werts nach Kendall-Tau (τ). Ein statistisch signifikanter Einfluss ist durch einen fett gedruckten p-Wert gekennzeichnet ($p < 0,01$ signifikant).

| Laborparameter | Probenanzahl | Korrelationskoeffizient τ | p-Wert |
|-----------------------|---------------------|--|---------------|
| Hämatokrit | 32 | 0,188 | 0,212 |

Tabelle 11: Median und Spanne, sowie Mittelwert und Standardabweichung der gemessenen Hämatokritwerte der Diabetiker (MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung).

| Laborparameter | Probenanzahl | MW | Median (Spanne) | SD |
|----------------|--------------|------|--------------------|-----|
| Hämatokrit (%) | 32 | 30,2 | 31 (13,6–48,6) | 7,4 |

1.2.2. Einfluss von Serumchemieparametern

Der Einfluss verschiedener Serumchemieparameter (Fruktosamin, Triglyzeride, Cholesterin, Bilirubin, Totalprotein, Albumin, Harnstoff, Kreatinin) auf die β HB-Messwerte der Referenzmethode wurde ebenfalls mittels Korrelationskoeffizienten nach Kendall-Tau (τ) untersucht. Die hier untersuchten Messspannen der jeweiligen Serumchemieparameter umfassten folgende Werte: Fruktosamin 223–842 $\mu\text{mol/l}$; Triglyzeride 0,32–8,39 mmol/l ; Cholesterin 0,94–24,33 mmol/l ; Bilirubin 2,9–176 $\mu\text{mol/l}$; Totalprotein 46,7–80,2 g/l ; Albumin 23,6–43,1 g/l ; Harnstoff 2,9–81,6 mmol/l ; Kreatinin 44–723 $\mu\text{mol/l}$. Tabelle 12 und 13 zeigen die jeweiligen Koeffizienten mit den zugehörigen p-Werten sowie den Median, den MW und die SD der gemessenen Serumchemieparameter der Diabetiker.

Tabelle 12: Korrelation der β HB-Messergebnisse der Referenzmethode mit der Konzentration verschiedener Serumchemieparameter und Angabe des p-Werts nach Kendall-Tau (τ). Statistisch signifikante Einflüsse sind durch fett gedruckte p-Werte gekennzeichnet ($p < 0,01$ signifikant).

| Laborparameter | Probenanzahl | Korrelationskoeffizient τ | p-Wert |
|----------------|--------------|--------------------------------|-------------------|
| Fruktosamin | 30 | -0,243 | 0,082 |
| Triglyzeride | 49 | 0,128 | 0,257 |
| Cholesterin | 49 | -0,092 | 0,411 |
| Bilirubin | 55 | 0,398 | < 0,001 |
| Totalprotein | 54 | 0,030 | 0,760 |
| Albumin | 54 | -0,080 | 0,422 |
| Harnstoff | 55 | -0,116 | 0,239 |
| Kreatinin | 53 | -0,131 | 0,194 |

Tabelle 13: Median und Spanne, sowie Mittelwert und Standardabweichung der gemessenen Serumchemieparameter der Diabetiker (g/l = Gramm pro Liter, mmol/l = Millimol pro Liter, $\mu\text{mol/l}$ = Mikromol pro Liter, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung).

| Laborparameter | Probenanzahl | MW | Median (Spanne) | SD |
|--------------------------------------|--------------|------|--------------------|------|
| Fruktosamin ($\mu\text{mol/l}$) | 30 | 503 | 490 (223–842) | 132 |
| Triglyzeride (mmol/l) | 49 | 1,09 | 0,63 (0,32–8,39) | 1,51 |
| Cholesterin (mmol/l) | 49 | 8,25 | 7,00 (0,94–24,33) | 5,07 |
| Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$) | 55 | 11,3 | 2,0 (0,3–176) | 28,2 |
| Totalprotein (g/l) | 54 | 67,2 | 69,0 (46,7–80,2) | 8,6 |
| Albumin (g/l) | 54 | 33,2 | 32,9 (23,6–43,1) | 4,8 |
| Harnstoff (mmol/l) | 55 | 15,0 | 12,4 (2,9–81,6) | 13,9 |
| Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$) | 53 | 136 | 100 (44–723) | 127 |

1.3. Cut-off-Werte

Neben der Bestimmung der Intra-Assay-Präzision und der Untersuchung des Einflusses verschiedener Blutparameter auf die βHB -Messergebnisse der Referenzmethode erfolgte die Ermittlung von spezifischen Cut-off-Werten für βHB zur Diagnose einer DKA. Sie diente auch zur Beurteilung, ab welchem Wert eine schlechte glykämische Kontrolle eines DM mit erhöhten Blutglukosewerten vorliegt und daher vermehrt Ketonkörper gebildet werden.

1.3.1. Cut-off-Wert zur Diagnose einer diabetischen Ketoazidose

Die ROC-Analyse zur Ermittlung eines βHB -Cut-off-Werts zur Diagnose einer DKA wurde basierend auf den klinischen Symptomen, den venösen Blutgaswerten (pH-Wert, HCO_3^- , AG), der Blutglukosekonzentration, und, sofern vorhanden, den Testergebnissen der Nitroprussid-Urinteststreifen-Untersuchung des Patientgutes 2.1 erstellt. Die retrospektiv untersuchten Daten konnten nicht

berücksichtigt werden, da kein β HB-Messwert der Referenzmethode vorlag. Ein Patient wurde in die Gruppe der DKA (Gruppe 1) eingeteilt, wenn folgende Kriterien erfüllt waren: pH-Wert $\leq 7,27$; $\text{HCO}_3^- \leq 14$ mmol/l; AG $> 20,6$ mmol; Blutglukose $> 11,1$ mmol/l (200 mg/dl) und ggf. Ketonurie. Die Tiere, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden in Gruppe 2 eingeteilt (Tiere mit DK und stabile Diabetiker). Ein Patient wurde ausgeschlossen, weil zuvor eine intravenöse Gabe von Natriumbikarbonat erfolgt war. Ein weiterer Patient wurde ausgeschlossen, da eine schwere Herzerkrankung vorlag, die für den schlechten Zustand des Tieres verantwortlich war. Beides hätte die Ergebnisse verfälscht. Weitere 6 Tiere mussten ausgeschlossen werden, weil nicht alle für die ROC-Kurve benötigten Werte von den Patienten vorlagen. Insgesamt wurden 18 Proben von 18 Diabetikern analysiert. Tabelle 14 zeigt die Daten der Patientengruppe 2.1. Die Kurve der zugehörigen ROC-Analyse ist in Abbildung 6 dargestellt.

Tabelle 14: Ergebnisse des Patientengutes 2.1, das in die ROC-Analyse zur Erstellung eines β HB-Cut-off-Werts zur Diagnose einer DKA für die Referenzmethode verwendet wurde. Signalement und Laborparameter (Mittelwert und Standardabweichung) der Diabetiker (n = 18) (AG = Anionenlücke, β HB = β -Hydroxybutyrat; DKA = diabetische Ketoazidose; HCO_3^- = Bikarbonat; mk = männlich kastriert; mmol/l = Millimol pro Liter; n = Probenanzahl, Referenz = Referenzmethode; wk = weiblich kastriert). Bei 3 Patienten waren keine Ergebnisse der Nitroprussid-Urinteststreifen-Untersuchung verfügbar. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Anzahl der vorliegenden Urineststreifen-Ergebnisse (n = 15).

| Parameter | DKA (n = 10) | andere (n = 8) |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| Alter (Jahre) | 12,0 \pm 2,6 | 12,7 \pm 3,8 |
| Geschlecht | 6 mk/ 4 wk | 6 mk/ 2 wk |
| pH-Wert (venös) | 7,15 \pm 0,07 | 7,35 \pm 0,07 |
| Blutglukose (mmol/l) | 23,5 \pm 6,8 | 16,3 \pm 6,7 |
| HCO_3^- (mmol/l) | 12,2 \pm 2,5 | 20,5 \pm 3,8 |
| AG (mmol/l) | 30,0 \pm 6,0 | 16,9 \pm 2,9 |
| Nitroprussid-Urinteststreifen | | |
| negativ | 1 (12,5 %) | 7 (100 %) |
| 1+ | 1 (12,5 %) | |
| 2+ | 4 (50 %) | |
| 3+ | 2 (25 %) | |
| β HB Referenz (mmol/l) | 9,9 \pm 5,1 | 0,5 \pm 0,6 |

Die AUC gibt das Maß für die diagnostische Qualität eines Tests an. Sie ergab in der unten abgebildeten ROC-Kurve einen „perfekten“ Wert von 1,000 (95 % CI: 0,815–1,000). Der ermittelte β HB-Cut-off-Wert zur Diagnose einer DKA lag bei $> 1,9$ mmol/l und ergab eine Sensitivität von 100 % (95 % CI: 69,2–100 %) mit einer Spezifität von 100 % (95 % CI: 63,1–100 %). Ein positives LR konnte aufgrund der Sensitivität (100 %) und der Spezifität (100 %) nicht berechnet werden. Der Cut-off-Wert für β HB zur Diagnose einer DKA wurde auf 2 mmol/l festgelegt.

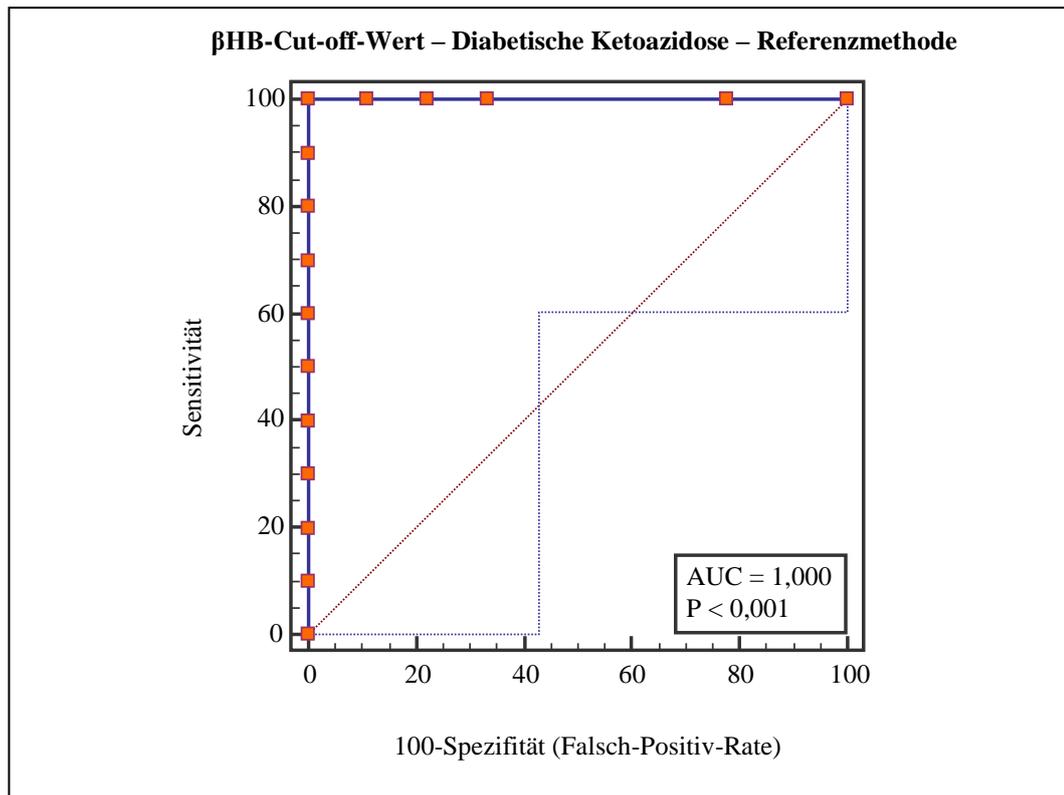


Abbildung 6: Kurve der ROC-Analyse (blaue durchgehende Linie) der Ermittlung des β HB-Cut-off-Werts der Referenzmethode zur Diagnose einer diabetischen Ketoazidose mit Konfidenzintervall (blaue unterbrochene Linien) und Winkelhalbierender (rote unterbrochene Linie) basierend auf 18 β HB-Werten von 18 Diabetikern (stabil; DK; DKA). Jeder Punkt (orange) auf der ROC-Kurve entspricht einem bestimmten Cut-off-Wert und repräsentiert ein Paar aus Sensitivität und Spezifität (AUC = area under curve, β HB = β -Hydroxybutyrat, DK = diabetische Ketose, DKA = diabetische Ketoazidose, P = p-Wert).

1.3.2. Cut-off-Wert zur Beurteilung der Diabetes-mellitus-Einstellung

Zusätzlich erfolgte die Ermittlung eines β HB-Cut-off-Werts zur Differenzierung eines gut von einem schlecht eingestellten DM mit erhöhten Blutglukosewerten und vermehrter Ketonkörperbildung. Für diese Analyse wurden die Daten des Patientengutes 2.2 verwendet. Die retrospektiv untersuchten Daten gingen nicht in die Untersuchung ein, da kein β HB-Messwert der Referenzmethode vorlag. Die Kontrollgruppe wurde bei der Erstellung des Cut-off-Werts berücksichtigt und zusammen mit den gut eingestellten Diabetikern eingruppiert, da sich ein gut eingestellter und kontrollierter Diabetiker metabolisch gesehen nicht wesentlich von einem gesunden Tier unterscheiden sollte. Die Einteilung der Tiere erfolgte anhand der klinischen Symptome (Polyurie, Polydipsie, Polyphagie), der Blutglukosewerte im Tagesprofil und/ oder der Fruktosaminwerte. Ein Diabetiker wurde als gut eingestellt eingestuft, wenn die Blutglukose im Tagesverlauf $\leq 13,8$

mmol/l (250 mg/dl) und/ oder der Fruktosaminwert < 450 μ mol/l lag und keine auffälligen klinischen Symptome des DM mehr bestanden. Von den 26 Diabetikern, die in dieser Studie prospektiv untersucht wurden, wurde ein Patient aufgrund einer schweren Herzerkrankung ausgeschlossen. Ein weiteres Tier wurde ausgeschlossen, da es zwar unter einem schlecht eingestellten DM litt, aber eine Hypoglykämie ursächlich war. Aufgrund von fehlenden Werten konnten die Daten von 4 weiteren Tieren nicht in die Untersuchung aufgenommen werden. Die β HB-Werte der 20 verbliebenen Tiere wurden in die Untersuchung aufgenommen. Patientendaten konnten mehrfach eingeschlossen werden, wenn diese von unterschiedlichen Besuchen stammten. Es gingen insgesamt 34 β HB-Werte (20 Diabetiker; 12 Kontrolltiere) in die Untersuchung ein. Tabelle 15 zeigt die Daten der Patientengruppe 2.2. Die Kurve der zugehörigen ROC-Analyse ist in Abbildung 7 dargestellt.

Tabelle 15: Ergebnisse des Patientengutes 2.2, das in der ROC-Analyse zur Ermittlung eines β HB-Cut-off-Werts zur Beurteilung der Einstellung eines DM für die Referenzmethode verwendet wurde. Signalement und Laborparameter (Mittelwert und Standardabweichung) der Diabetiker (n = 20) und der Kontrollgruppe (n = 12) (β HB = β -Hydroxybutyrat, m = männlich intakt, mk = männlich kastriert, μ mol/l = Mikromol pro Liter, mmol/l = Millimol pro Liter, n = Probenanzahl, Referenz = Referenzmethode, w = weiblich intakt, wk = weiblich kastriert). 2 Patienten waren mit je 2 Werten von unterschiedlichen Besuchen in der Untersuchung vertreten.

| Parameter | gute glykämische Kontrolle (n =16) | schlechte glykämische Kontrolle (n =18) |
|--|------------------------------------|---|
| Alter (Jahre) | 4,8 \pm 5,3 | 12,5 \pm 3,2 |
| Geschlecht | 6 m/ 5 mk/ 2 w/ 3 wk | 13 mk/ 4 wk |
| Blutglukose (mmol/l) | 6,2 \pm 3,0 | 17,7 \pm 3,6 |
| Fruktosamin (μ mol/l) (nur Diabetikergruppe) | 341 \pm 76 | 579 \pm 121 |
| β HB Referenz (mmol/l) | 0,1 \pm 0,1 | 5,7 \pm 6,0 |

Die AUC ergab einen Wert von 0,924 (95 % CI: 0,779–0,986). Der ermittelte β HB-Cut-off-Wert von > 0,1 mmol/l ergab den besten Kompromiss aus Sensitivität und Spezifität mit einer Sensitivität von 88,9 % (95 % CI: 65,3–98,6 %) und einer Spezifität von 87,5 % (95 % CI: 61,7–98,4 %) und dem positiven LR von 7,1. Bei einem β HB-Wert > 0,1 mmol/l besteht daher die Möglichkeit, dass der Patient keine gute glykämische Kontrolle aufweist und die

Blutglukosewerte zu hoch sind. Bei einem Wert von $> 0,2$ mmol/l ergibt sich eine Sensitivität von 66,7 % (95 % CI: 41–86,7 %) und eine Spezifität von 93,8 % (95 % CI: 69,8–99,8 %) mit dem höchsten positiven LR von 10,7. Aufgrund des höheren positiven LR und der Spezifität wurde der Cut-off-Wert von $> 0,2$ mmol/l für die Referenzmethode gewählt.

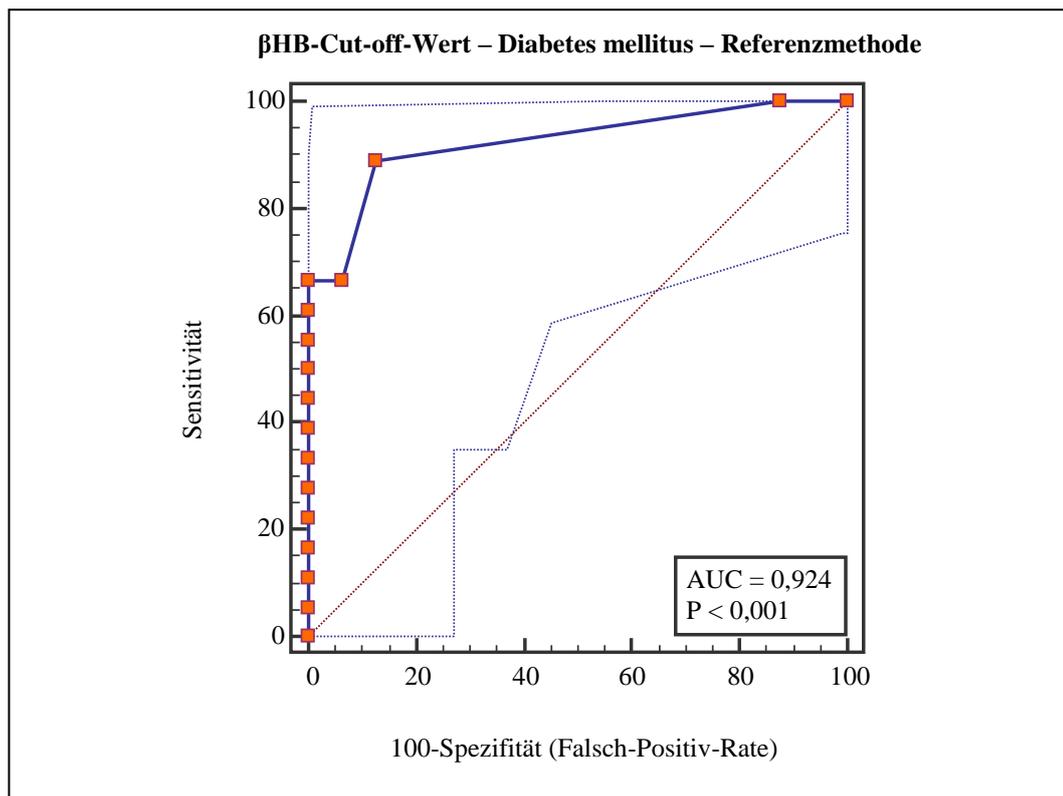


Abbildung 7: Kurve der ROC-Analyse (blaue durchgehende Linie) der Ermittlung des β HB-Cut-off-Werts der Referenzmethode zur Beurteilung der Diabetes-mellitus-Einstellung mit Konfidenzintervall (blaue unterbrochene Linien) und Winkelhalbierender (rote unterbrochene Linie) basierend auf 34 β HB-Werten von 20 Diabetikern (stabil; DK; DKA) und 12 gesunden Kontrolltieren. Jeder Punkt (orange) auf der ROC-Kurve entspricht einem bestimmten Cut-off-Wert und repräsentiert ein Paar aus Sensitivität und Spezifität (AUC = area under curve, β HB = β -Hydroxybutyrat, DK = diabetische Ketose, DKA = diabetische Ketoazidose, P = p-Wert).

2. GlucoMen[®] LX PLUS

In dieser Studie wurde das portable Ketonkörpermessgerät GlucoMen[®] LX PLUS für den Einsatz bei Katzen validiert. Dies erfolgte durch den Vergleich der β HB-Messwerte des portablen Gerätes aus unterschiedlichen Blutprobenarten mit den Messwerten einer enzymatischen spektrophotometrischen Referenzmethode aus zeitgleich entnommenen Serumproben.

Die Validierung erfolgte mit den Daten des Patientengutes 1. In der Diabetikergruppe (n = 26) wurden insgesamt 68 Messungen mittels des GlucoMen® LX PLUS aus nicht mit EDTA versetzten Proben venösen Vollblutes, 19 Messungen aus mit EDTA antikoagulierten Proben venösen Blutes sowie 22 Messungen aus Proben kapillären Blutes durchgeführt. In der Kontrollgruppe (n = 12) wurden 12 Messungen aus nicht mit EDTA versetzten Proben venösen Vollblutes untersucht.

Bei 5 Messungen aus venösem Vollblut zeigte das Gerät statt „HI“ (high) einen konkreten β HB-Wert an, welcher in der Referenzmessung aus Serum einem β HB-Wert zwischen 8,1–15,3 mmol/l entsprach. Damit lag die Konzentration dieser Proben über der mittels GlucoMen® LX PLUS messbaren und hätte daher mit „HI“ (high) angegeben werden müssen. Bei 9 Messungen aus venösem Vollblut zeigte das Gerät „LO“ (low) an, welches einer β HB-Konzentration unter 0,1 mmol/l entspricht. Die entsprechenden Proben enthielten in der Referenzmessung β HB-Konzentrationen von 0,1–0,2 mmol/l. Entsprechend wurde bei 2 Proben kapillären Blutes „LO“ (low) angezeigt, obwohl die Referenzmessung Werte von 0,1–0,2 mmol/l ergab. Bei der Messung aus Kapillarblut war bei einer Probe die Angabe „HI“ (high) zu verzeichnen, die mittels Referenzmethode mit 4,8 mmol/l im messbaren Bereich des Gerätes gemessen wurde und dementsprechend hätte vom GlucoMen® LX PLUS ein konkreter Wert angezeigt werden müssen. Fehlermeldungen des GlucoMen® LX PLUS traten weder bei der Messung aus venösem Vollblut oder aus EDTA-Blut, noch bei den Messungen aus Kapillarblut auf.

Zusätzlich zu den herkömmlichen Validierungsmethoden (Regressionsanalyse nach Passing-Bablok; Streudiagramm nach Bland-Altman; Intra-Assay-CV) erfolgte auch beim GlucoMen® LX PLUS die Überprüfung des Einflusses verschiedener Blutparameter auf die Richtigkeit der Messwerte und die Ermittlung spezifischer β HB-Cut-off-Werte zur Diagnose einer DKA und zur Beurteilung eines nicht gut eingestellten DM mit erhöhten Blutglukosewerten und vermehrter Bildung von Ketonkörpern. Die Ermittlung des Cut-off-Werts erfolgte mit den Werten des Patientengutes 2.

2.1. Intra-Assay-Präzision

Die Intra-Assay-Präzision des GlucoMen® LX PLUS wurde anhand von 2

repräsentativen Proben für hohe und niedrige β HB-Konzentrationen aus dem Patientengut 1 ermittelt. Der hohe β HB-Konzentrationsbereich lag bei 3,8–4,8 mmol/l, der niedrige bei 0,2–0,3 mmol/l. Es ergab sich sowohl für die hohe als auch für die niedrige Konzentration eine gute Präzision für den GlucoMen® LX PLUS. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Ermittelte Intra-Assay-Präzision des GlucoMen® LX PLUS (β HB = β -Hydroxybutyrat, CV = Variationskoeffizient, Konz. = Konzentration, mmol/l = Millimol pro Liter, SD = Standardabweichung).

| βHB-Konzentration (mmol/l) | Anzahl der Messungen | Mittelwert (mmol/l) | Median (mmol/l) | SD (mmol/l) | Intra-Assay-CV (%) |
|--|-----------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------|---------------------------|
| hohe Konz. (3,8–4,8) | 10 | 4,47 | 4,55 | 0,27 | 6,2 |
| niedrige Konz. (0,2–0,3) | 10 | 0,22 | 0,2 | 0,04 | 18,2 |

2.2. Validierung der Messwerte aus unterschiedlichen Blutprobenarten

Die Validierung des GlucoMen® LX PLUS für den Einsatz bei Katzen erfolgte durch den Vergleich der β HB-Messwerte des Gerätes aus unterschiedlichen Blutprobenarten mit den Messwerten einer enzymatischen spektrophotometrischen Referenzmethode aus Serumproben des Patientengutes 1. Aufgrund der vom Hersteller angegebenen Messgrenze des GlucoMen® LX PLUS ≤ 8 mmol/l wurden Werte, die in der Referenzmessung β HB-Konzentrationen > 8 mmol/l ergaben, nicht in die Untersuchung eingeschlossen. Die Validierung des Gerätes erfolgte daher auf der Basis von 61 Proben venösen Vollblutes, 17 mit EDTA antikoagulierten Proben venösen Blutes sowie 20 Proben kapillären Blutes.

2.2.1. Messung aus Proben venösen Vollblutes

Die Validierung der Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus Proben venösen Vollblutes ($n = 61$) durch Vergleich mit der mittels Referenzmethode ermittelten β HB-Konzentration aus gleichzeitig gewonnenen Serumproben ist in den Abbildungen 8, 9 und 10 dargestellt. Die Berechnung erfolgte aufgrund der Messgrenze des GlucoMen® LX PLUS unter Ausschluss der Proben, die in der Referenzmessung β HB-Werte > 8 mmol/l ergaben. Trotz der mit steigender β HB-

Konzentration zunehmenden Variabilität der Messergebnisse wurde das Streudiagramm nach Bland-Altman zur besseren klinischen Einschätzung des Bias nicht in Prozent, sondern mit absoluten Zahlen erstellt.

Die Regressionsgleichung nach Passing-Bablok lautete $y = 0,017 + 0,889x$. Die Steigung (slope) ergab einen Wert von 0,889 mit einem 95 % CI von 0,769–1,000, das noch den relevanten Wert 1 enthielt. Damit lag keine statistisch signifikante Abweichung der Regressionsgeraden vor. Der Y-Achsenabschnitt (intercept) ergab 0,017 mit einem 95 % CI von -0,100–0,058, das den relevanten Wert 0 enthielt. Die Regressionsanalyse zeigte damit keinen signifikanten systematischen oder proportionalen Fehler. 8 der mittels GlucoMen® LX PLUS gemessenen Werte lagen außerhalb des Konfidenzintervalls. Der CUSUM-Test zeigte keine Abweichung von der Linearität ($p > 0,05$). Die Anwendung der Regressionsanalyse nach Passing-Bablok als Verfahren zur Überprüfung der Übereinstimmung beider Messmethoden war daher möglich.

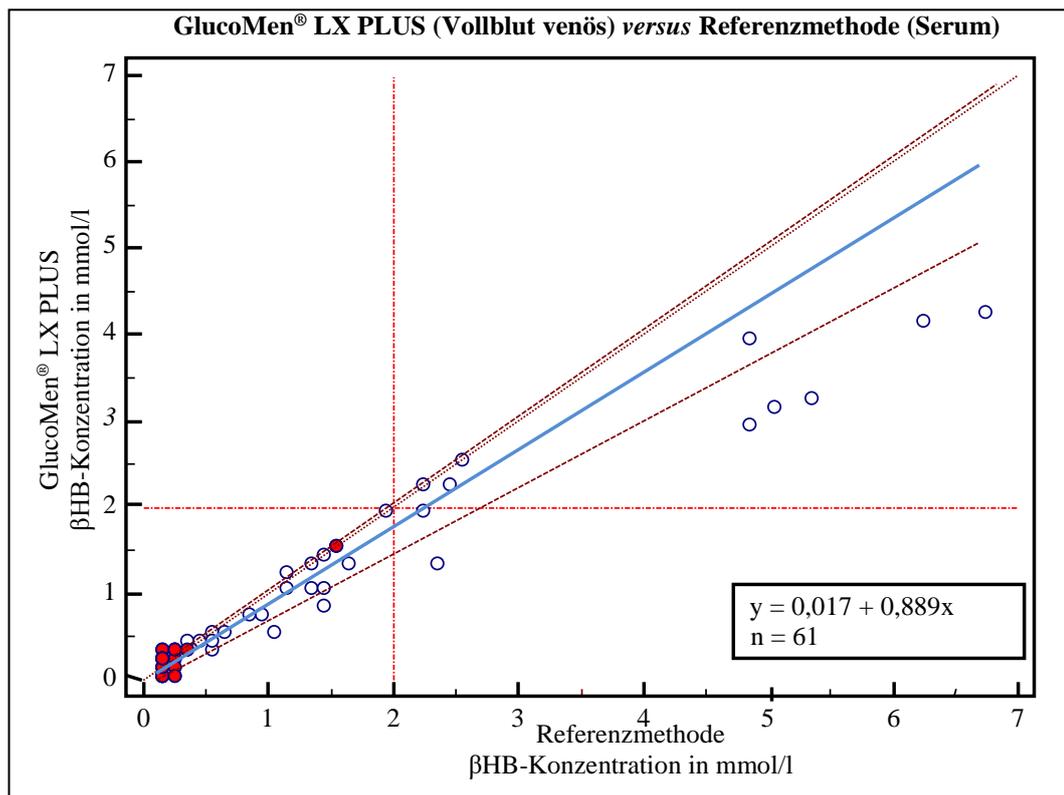


Abbildung 8: Vergleich von GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode der Messungen aus venösem Vollblut zur Validierung der β HB-Werte. Streudiagramm nach Passing-Bablok von 61 β HB-Messungen der Diabetikergruppe aus venösem Vollblut in mmol/l gemessen mittels GlucoMen® LX PLUS (Y-Achse) versus β HB-Konzentration der Messungen der Referenzmethode aus den entsprechenden Serumproben in mmol/l (X-Achse). Dargestellt sind die Regressionslinie der Regressionsgleichung $y = a + bx$ (blaue durchgehende Linie) mit Konfidenzintervall (braune gestrichelte Linien) und die Identitätslinie nach der Gleichung $y = x$ (braune gepunktete Linie). Zur Kennzeichnung des diagnostisch relevanten Bereiches wurden bei 2 mmol/l jeweils 2 Geraden (rote unterbrochene Linien) eingezeichnet. Die rot dargestellten Punkte zeigen Mehrfachmessungen des gleichen Werts an (β HB = β -Hydroxybutyrat, mmol/l = Millimol pro Liter, n = Probenanzahl).

Der Vergleich der Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus 61 Proben venösen Vollblutes mit den Messwerten der Referenzmethode aus Serumproben zeigte ein Bias von -0,3 mmol/l mit Übereinstimmungsgrenzen von -1,4–0,9 mmol/l. Die SD betrug 0,6 mmol/l. Im Diagramm zeigte sich, dass ein signifikanter proportionaler Fehler vorlag, d. h., die Streuung der Ketonometer-Messwerte in Bezug zur Referenzmethode nahm mit steigender β HB-Konzentration zu. Es zeigten sich zudem 5 Ausreißer, die nicht innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen lagen.

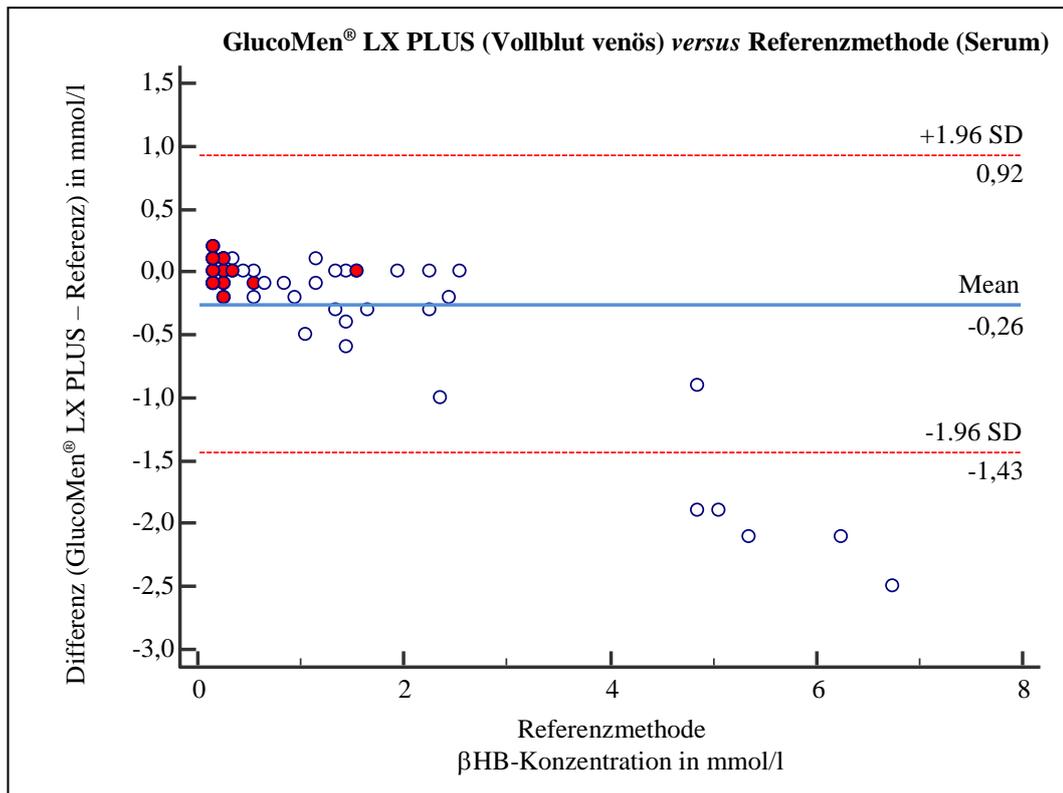


Abbildung 9: Vergleich von GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode der Messungen aus venösem Vollblut zur Validierung der β HB-Werte. Streudiagramm nach Bland-Altman mit Darstellung der mittleren Differenz (Bias) von 61 β HB-Messwerten des GlucoMen® LX PLUS aus Proben venösen Vollblutes (Y-Achse) versus β HB-Messwerte der Referenzmethode aus den entsprechenden Serumproben in mmol/l (X-Achse) mit Übereinstimmungsgrenzen (Bias \pm 1,96 x SD). Die rot dargestellten Punkte zeigen Mehrfachmessungen des gleichen Werts an (β HB = β -Hydroxybutyrat, mmol/l = Millimol pro Liter, SD = Standardabweichung).

Aufgrund der im Streudiagramm nach Bland-Altman (Abbildung 9) sichtbaren Zunahme der Streuung der mittels GlucoMen® LX PLUS gemessenen β HB-Werte mit steigender β HB-Konzentration wurde ein weiteres Streudiagramm nach Bland-Altman für den β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l erstellt (Abbildung 10). Das Diagramm wurde auf der Basis von 55 Messwertepaaren des GlucoMen® LX PLUS und der Referenzmethode erstellt.

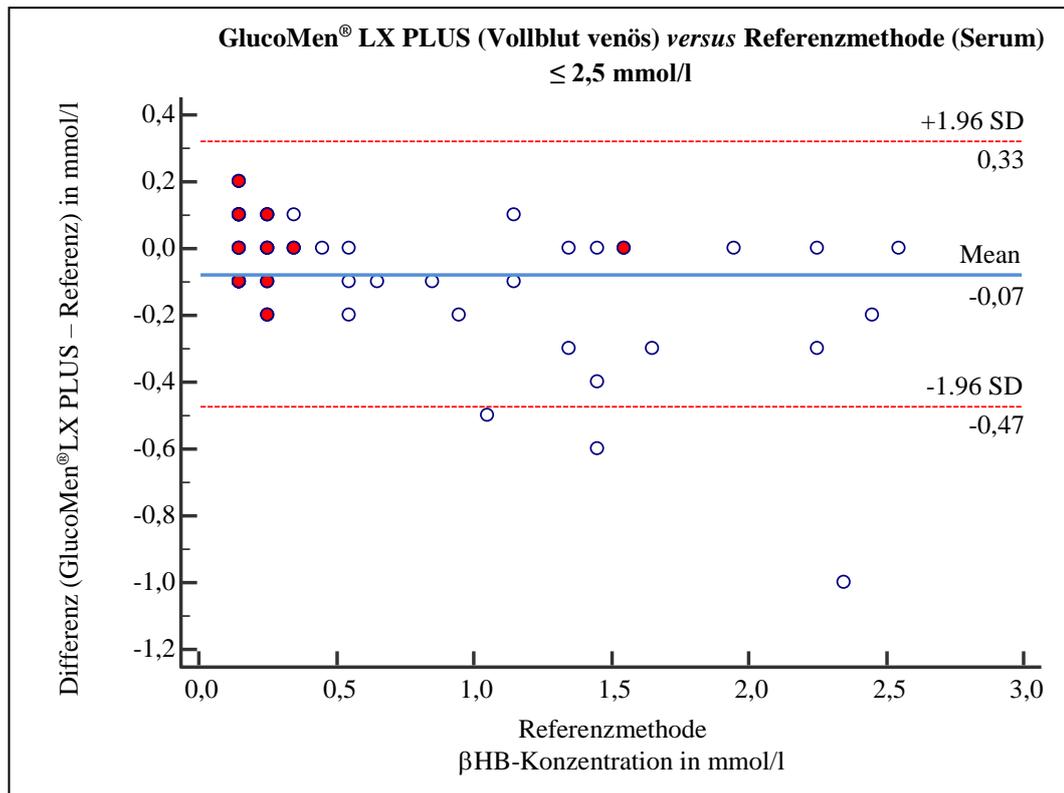


Abbildung 10: Vergleich von GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode der Messungen aus venösem Vollblut zur Validierung der β HB-Werte $\leq 2,5$ mmol/l. Streudiagramm nach Bland-Altman mit Darstellung der mittleren Differenz (Bias) von 55 β HB-Messwerten des GlucoMen® LX PLUS aus Proben venösen Vollblutes (Y-Achse) versus β HB-Messwerte der Referenzmethode aus den entsprechenden Serumproben in mmol/l (X-Achse) im β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l mit Übereinstimmungsgrenzen (Bias $\pm 1,96 \times$ SD). Die rot dargestellten Punkte zeigen Mehrfachmessungen des gleichen Werts an (β HB = β -Hydroxybutyrat, mmol/l = Millimol pro Liter, SD = Standardabweichung).

Der Vergleich der Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus 55 Proben venösen Vollblutes mit den Messwerten der Referenzmethode aus Serumproben im β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l zeigte ein Bias von $-0,1$ mmol/l mit Übereinstimmungsgrenzen von $-0,5$ – $0,3$ mmol/l. Die SD betrug $0,2$ mmol/l. Es lag kein signifikanter proportionaler Fehler vor. Es zeigten sich jedoch 3 Ausreißer, die nicht innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen lagen.

2.2.2. Messung aus Proben kapillären Blutes

Die mittels GlucoMen® LX PLUS bestimmten Messwerte aus Kapillarblut wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Übereinstimmung mit den Messergebnissen der Referenzmethode aus den entsprechenden Serumproben untersucht. Wie bereits bei der Messung aus venösem Vollblut wurden aufgrund der Messgrenze des GlucoMen® LX PLUS nur die Werte ≤ 8 mmol/l berücksichtigt. Der

Vergleich erfolgte auf der Basis von 20 Messwertepaaren des GlucoMen® LX PLUS und der Referenzmethode. Das Streudiagramm nach Bland-Altman wurde auch hier zur besseren klinischen Einschätzung des Bias nicht in Prozent, sondern mit absoluten Zahlen erstellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 und 12 dargestellt.

Die Regressionsgleichung nach Passing-Bablok lautete $y = 0,000 + 1,000x$. Die Steigung (slope) wurde mit 1,000 gemessen (95 % CI: 0,867–1,714) und der Achsenabschnitt (intercept) mit 0,000 (95 % CI: -0,179–0,117). Die relevanten Werte 1 (slope) und 0 (intercept) waren im jeweiligen 95 % CI enthalten. Die Regressionsanalyse zeigte damit keinen systematischen oder proportionalen Fehler. Zwei der mittels GlucoMen® LX PLUS gemessenen Werte lagen außerhalb des Konfidenzintervalls. Der CUSUM-Test zeigte keine Abweichungen von der Linearität ($p > 0,05$). Die Anwendung der Regressionsanalyse nach Passing-Bablok als Verfahren zur Überprüfung der Übereinstimmung beider Messmethoden war daher möglich.

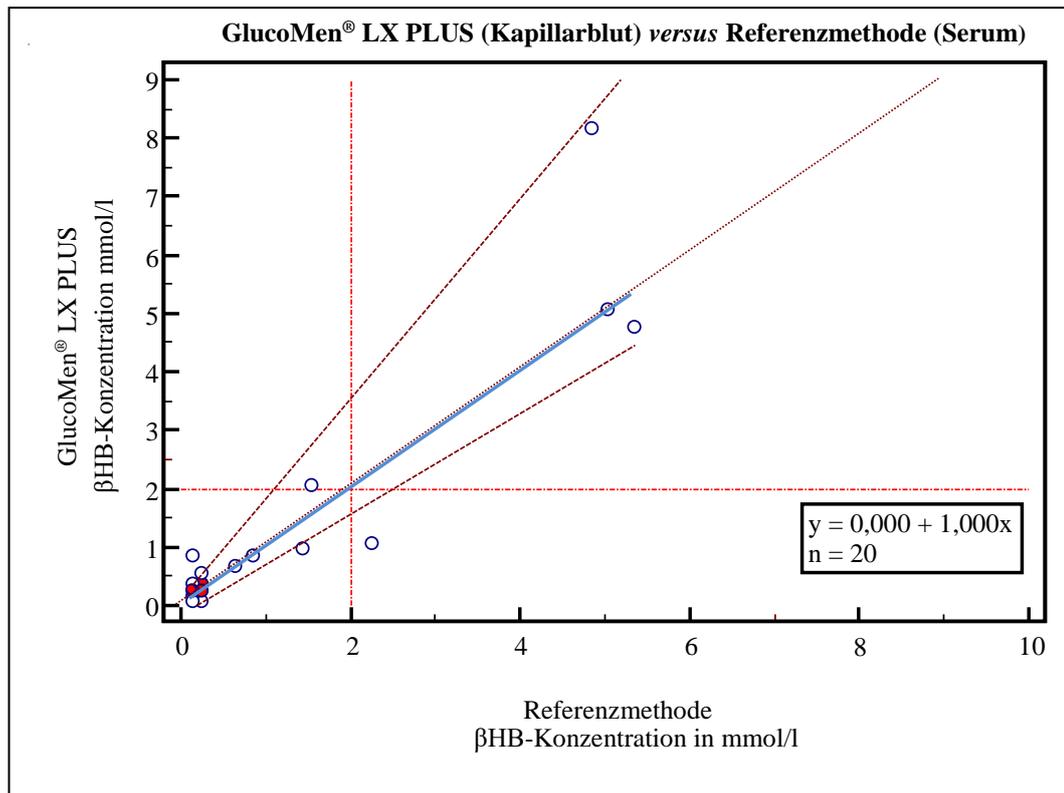


Abbildung 11: Vergleich von GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode der Messungen aus Kapillarblut zur Validierung der βHB-Werte. Streudiagramm nach Passing-Bablok von 20 βHB-Messungen der Diabetikergruppe aus Kapillarblut in mmol/l gemessen mittels GlucoMen® LX PLUS (Y-Achse) versus βHB-Konzentration der Messungen der Referenzmethode aus den entsprechenden Serumproben in mmol/l (X-Achse). Dargestellt sind die Regressionslinie der Regressionsgleichung $y = a + bx$ (blaue durchgehende Linie) mit Konfidenzintervall (braune gestrichelte Linien) und die Identitätslinie nach der Gleichung $y = x$ (braune gepunktete Linie). Zur Kennzeichnung des diagnostisch relevanten Bereiches wurden bei 2 mmol/l jeweils 2 Geraden (rote unterbrochene Linien) eingezeichnet. Die rot dargestellten Punkte zeigen Mehrfachmessungen des gleichen Werts an (βHB = β-Hydroxybutyrat, mmol/l = Millimol pro Liter, n = Probenanzahl).

Der Vergleich der βHB-Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus 20 Proben kapillären Blutes mit den Messwerten der Referenzmethode aus Serumproben zeigte ein Bias von 0,1 mmol/l mit Übereinstimmungsgrenzen von -1,5–1,8 mmol/l. Die SD betrug 0,8 mmol/l. Im Diagramm war kein proportionaler Fehler erkennbar. Es zeigte sich jedoch ein Ausreißer, der nicht innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen lag.

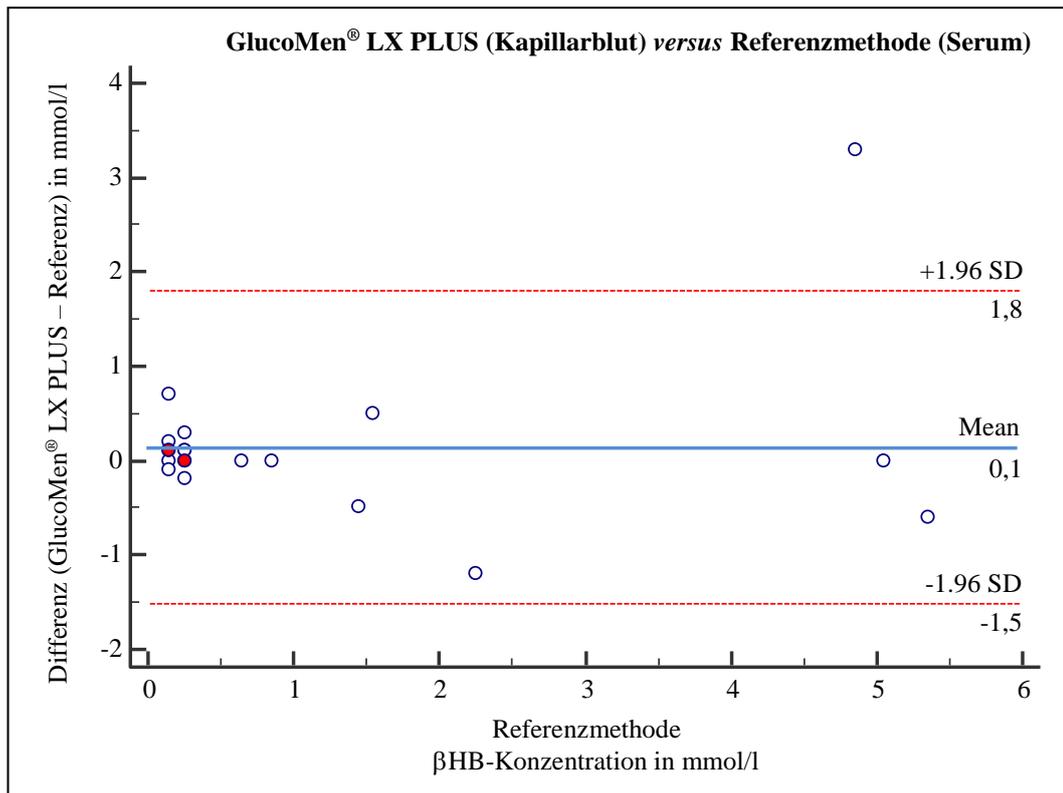


Abbildung 12: Vergleich von GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode der Messungen aus Kapillarblut zur Validierung der β HB-Werte. Streudiagramm nach Bland-Altman mit Darstellung der mittleren Differenz (Bias) von 20 β HB-Messwerten des GlucoMen® LX PLUS aus Proben kapillären Blutes (Y-Achse) versus β HB-Messwerte der Referenzmethode aus den entsprechenden Serumproben in mmol/l (X-Achse) mit Übereinstimmungsgrenzen (Bias \pm 1,96 x SD). Die rot dargestellten Punkte zeigen Mehrfachmessungen des gleichen Werts an (β HB = β -Hydroxybutyrat, mmol/l = Millimol pro Liter, SD = Standardabweichung).

Wie bereits bei der Untersuchung der Proben venösen Vollblutes wurde ein weiteres Streudiagramm nach Bland-Altman für den β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l erstellt (Abbildung 13). Das Diagramm wurde auf der Basis von 17 Messwertepaaren des GlucoMen® LX PLUS und der Referenzmethode erstellt.

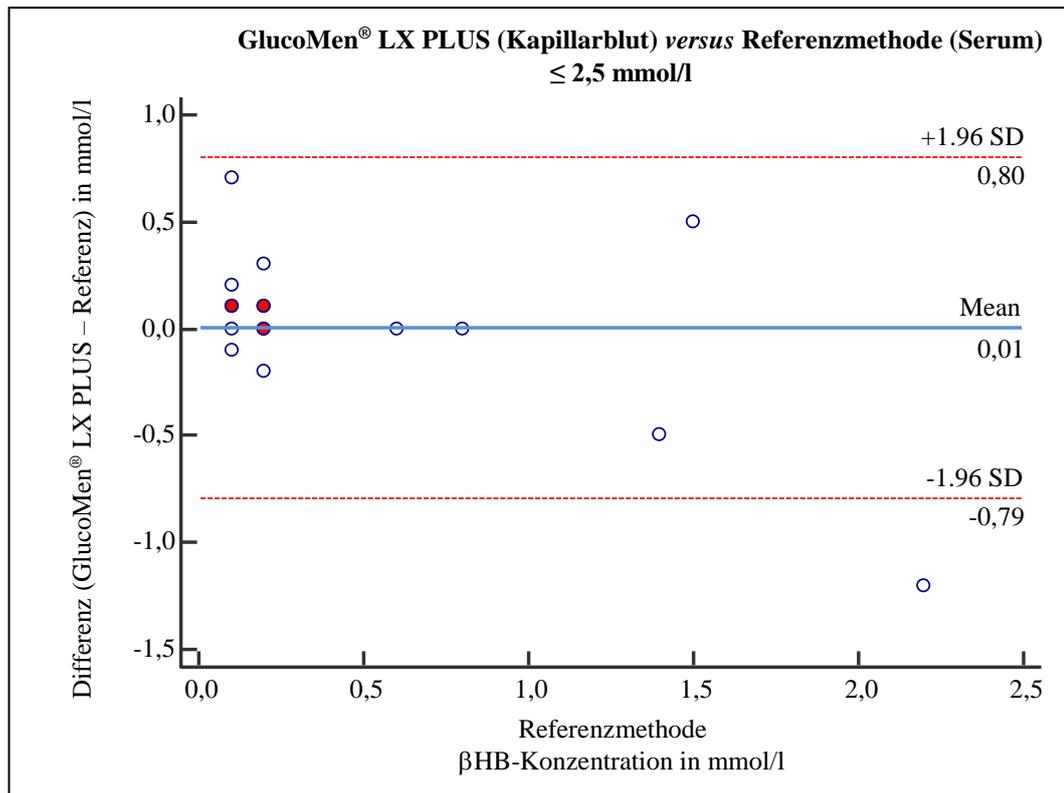


Abbildung 13: Vergleich von GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode der Messungen aus Kapillarblut zur Validierung der β HB-Werte $\leq 2,5$ mmol/l. Streudiagramm nach Bland-Altman mit Darstellung der mittleren Differenz (Bias) von 17 β HB-Messwerten des GlucoMen® LX PLUS aus Proben kapillären Blutes (Y-Achse) versus β HB-Messwerte der Referenzmethode aus den entsprechenden Serumproben in mmol/l (X-Achse) im β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l mit Übereinstimmungsgrenzen (Bias $\pm 1,96 \times$ SD). Die rot dargestellten Punkte zeigen Mehrfachmessungen des gleichen Werts an (β HB = β -Hydroxybutyrat, mmol/l = Millimol pro Liter, SD = Standardabweichung).

Der Vergleich der β HB-Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus 17 Proben kapillären Blutes mit den Messwerten der Referenzmethode aus Serumproben im β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l zeigte ein Bias von 0 mmol/l mit Übereinstimmungsgrenzen von -0,8–0,8 mmol/l. Die SD betrug 0,4 mmol/l. Im Diagramm war ein proportionaler Fehler erkennbar. Es zeigte sich zudem ein Ausreißer, der nicht innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen lag.

2.3. Untersuchung einflussnehmender Parameter

In dieser Studie wurde auch der potenzielle Einfluss verschiedener Blutparameter auf die Richtigkeit der Messergebnisse des GlucoMen® LX PLUS aus Proben venösen Vollblutes des Patientengutes 1 überprüft. Die Untersuchung berücksichtigte den möglichen Einfluss des Antikoagulans EDTA, des Hämatokrits und verschiedener Serumchemieparameter (Fruktosamin,

Triglyzeride, Cholesterin, Bilirubin, Totalprotein, Albumin, Harnstoff, Kreatinin) (Für MW, SD, Median und Messspanne siehe Tabelle 11 und 13).

2.3.1. Einfluss von Ethylendiamintetraacetat

Die mittels GlucoMen® LX PLUS bestimmten β HB-Messwerte aus EDTA-Blut wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Übereinstimmung mit den Messergebnissen der Referenzmethode aus den entsprechenden Serumproben untersucht. Die Berechnung erfolgte aufgrund der Messgrenze des GlucoMen® LX PLUS wie bereits bei den Proben venösen Vollblutes ohne Antikoagulans und den Proben kapillären Blutes unter Ausschluss der Proben, die in der Referenzmessung β HB-Werte > 8 mmol/l ergaben. Der Vergleich erfolgte auf der Basis von 17 Messwertepaaren des GlucoMen® LX PLUS und der Referenzmethode. Das Streudiagramm nach Bland-Altman wurde auch hier zur besseren klinischen Einschätzung des Bias nicht in Prozent, sondern mit absoluten Zahlen erstellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 und 15 dargestellt.

Die Regressionsgleichung nach Passing-Bablok lautete $y = 0,070 + 0,718x$. Die Steigung (slope) wurde mit 0,718 gemessen (95 % CI: 0,530–1,000) und der Achsenabschnitt (intercept) mit 0,070 (95 % CI: -0,100–0,117). Die relevanten Werte 1 (slope) und 0 (intercept) waren im jeweiligen 95 % CI enthalten. Die Regressionsanalyse zeigte damit keinen signifikanten proportionalen oder systematischen Fehler. 2 der mittels GlucoMen® LX PLUS gemessenen Werte lagen außerhalb des Konfidenzintervalls. Der CUSUM-Test zeigte keine Abweichung von der Linearität ($p > 0,05$). Die Anwendung der Regressionsanalyse nach Passing-Bablok als Verfahren zur Überprüfung der Übereinstimmung beider Messmethoden war daher möglich.

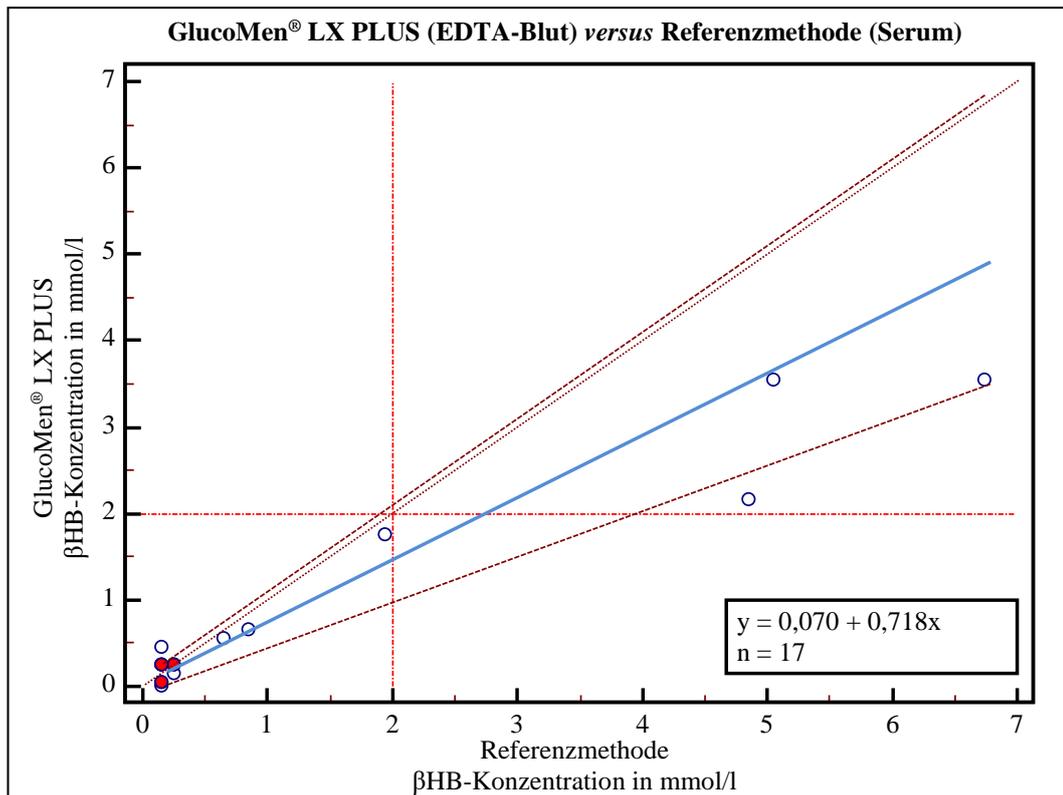


Abbildung 14: Vergleich von GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode der Messungen aus EDTA-Blut zur Validierung der β HB-Werte. Streudiagramm nach Passing-Bablok von 17 β HB-Messungen der Diabetikergruppe aus venösen EDTA-Proben in mmol/l gemessen mittels GlucoMen® LX PLUS (Y-Achse) versus β HB-Konzentration der Messungen der Referenzmethode aus den entsprechenden Serumproben in mmol/l (X-Achse). Dargestellt sind die Regressionslinie der Regressionsgleichung $y = a + bx$ (blaue durchgehende Linie) mit Konfidenzintervall (braune gestrichelte Linien) und die Identitätslinie nach der Gleichung $y = x$ (braune gepunktete Linie). Zur Kennzeichnung des diagnostisch relevanten Bereiches wurden bei 2 mmol/l jeweils 2 Geraden (rote unterbrochene Linien) eingezeichnet. Die rot dargestellten Punkte zeigen Mehrfachmessungen des gleichen Werts an (β HB = β -Hydroxybutyrat, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, mmol/l = Millimol pro Liter, n = Probenanzahl).

Der Vergleich der β HB-Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus 17 mit EDTA antikoagulierten Proben venösen Blutes mit den Messwerten der Referenzmethode aus Serumproben zeigte ein Bias von -0,5 mmol/l mit Übereinstimmungsgrenzen von -2,4–1,5 mmol/l. Die SD betrug 1,0 mmol/l. Trotz der geringen Probenanzahl war im Diagramm ein proportionaler Fehler erkennbar. Des Weiteren waren 2 Ausreißer zu erkennen, die nicht innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen lagen.

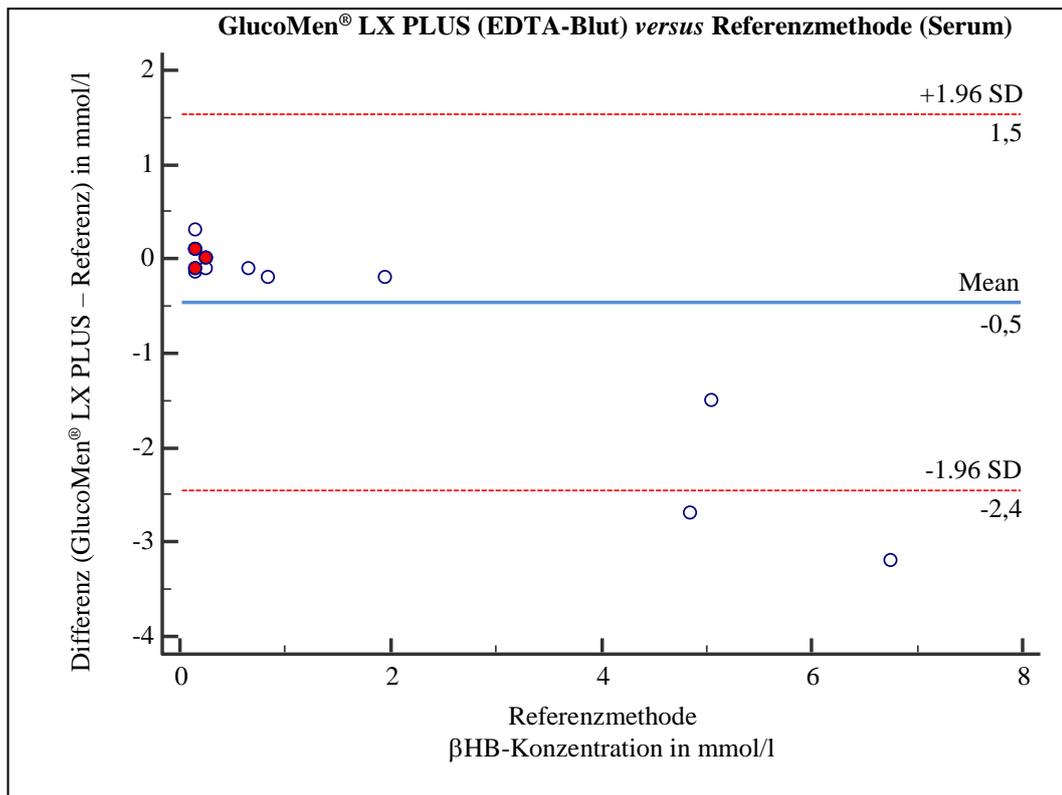


Abbildung 15: Vergleich von GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode der Messungen aus EDTA-Blut zur Validierung der β HB-Werte. Streudiagramm nach Bland-Altman mit Darstellung der mittleren Differenz (Bias) von 17 β HB-Messwerten des GlucoMen® LX PLUS aus EDTA-Blut (Y-Achse) versus β HB-Messwerte der Referenzmethode aus den entsprechenden Serumproben in mmol/l (X-Achse) mit Übereinstimmungsgrenzen (Bias \pm 1,96 x SD). Die rot dargestellten Punkte zeigen Mehrfachmessungen des gleichen Werts an (β HB = β -Hydroxybutyrat, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, mmol/l = Millimol pro Liter, SD = Standardabweichung).

Wie bereits bei der Messung aus venösem Vollblut und Kapillarblut wurde ein weiteres Streudiagramm nach Bland-Altman für den β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l erstellt (Abbildung 16). Das Diagramm wurde auf der Basis von 14 Messwertepaaren des GlucoMen® LX PLUS und der Referenzmethode erstellt.

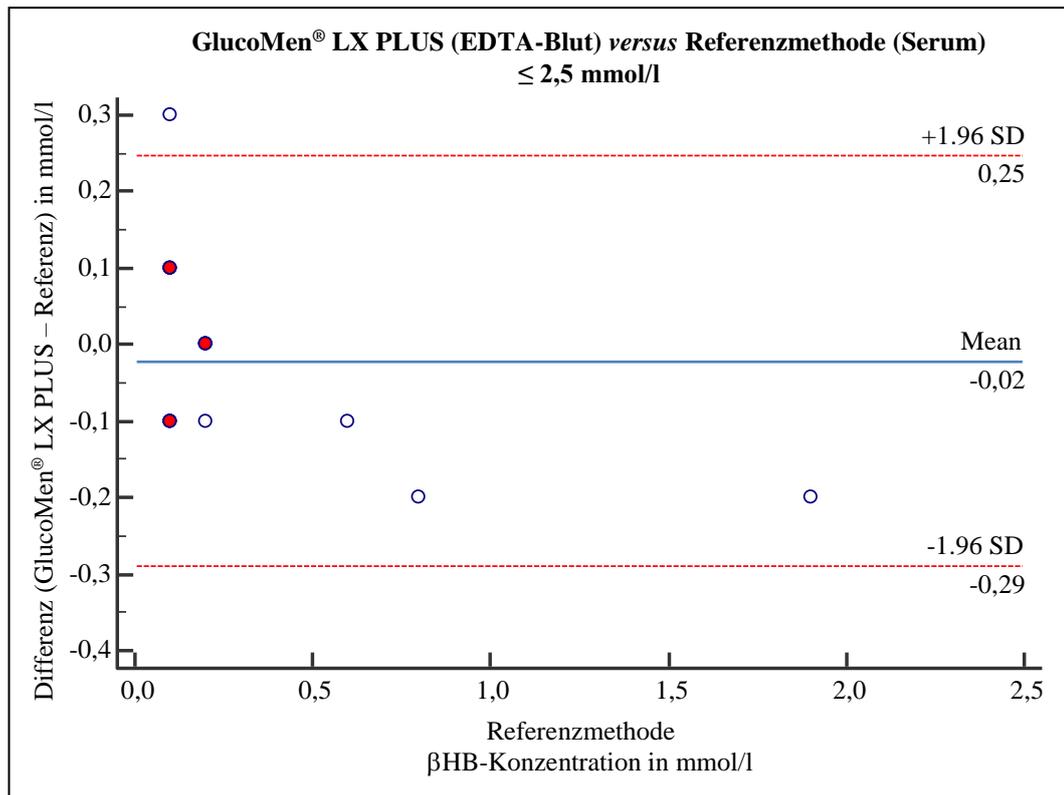


Abbildung 16: Vergleich von GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode der Messungen aus EDTA-Blut zur Validierung der βHB-Werte ≤ 2,5 mmol/l. Streudiagramm nach Bland-Altman mit Darstellung der mittleren Differenz (Bias) von 14 βHB-Messwerten des GlucoMen® LX PLUS aus EDTA-Blut (Y-Achse) versus βHB-Messwerte der Referenzmethode aus den entsprechenden Serumproben in mmol/l (X-Achse) im βHB-Konzentrationsbereich ≤ 2,5 mmol/l mit Übereinstimmungsgrenzen (Bias ± 1,96 x SD). Die rot dargestellten Punkte zeigen Mehrfachmessungen des gleichen Werts an (βHB = β-Hydroxybutyrat, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, mmol/l = Millimol pro Liter, SD = Standardabweichung).

Der Vergleich der βHB-Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus 14 mit EDTA antikoagulierten Proben venösen Blutes mit den Messwerten der Referenzmethode aus Serumproben im βHB-Konzentrationsbereich ≤ 2,5 mmol/l zeigte ein Bias von 0 mmol/l mit Übereinstimmungsgrenzen von -0,3–0,3 mmol/l. Die SD betrug 0,1 mmol/l. Ein Wert lag nicht innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen.

2.3.2. Einfluss des Hämokrits

Der Einfluss des Hämokrits auf die Richtigkeit der βHB-Messergebnisse des GlucoMen® LX PLUS aus Proben venösen Vollblutes wurde mittels Korrelationskoeffizienten nach Kendall-Tau (τ) untersucht. Die hier untersuchte Messspanne des Hämokrits umfasste Werte von 13,6–48,6 % (siehe auch

Tabelle 11). Tabelle 17 zeigt den Koeffizienten mit dem zugehörigen p-Wert.

Tabelle 17: Korrelation der β HB-Messergebnisse des GlucoMen® LX PLUS mit der Höhe des Hämatokrits und Angabe des p-Werts nach Kendall-Tau (τ). Ein statistisch signifikanter Einfluss ist durch einen fett gedruckten p-Wert gekennzeichnet ($p < 0,01$ signifikant).

| Laborparameter | Probenanzahl | Korrelationskoeffizient τ | p-Wert |
|----------------|--------------|--------------------------------|--------|
| Hämatokrit | 32 | 0,176 | 0,178 |

2.3.3. Einfluss von Serumchemieparametern

Der Einfluss verschiedener Serumchemieparameter (Fruktosamin, Triglyzeride, Cholesterin, Bilirubin, Totalprotein, Albumin, Harnstoff, Kreatinin) auf die Richtigkeit der β HB-Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus Proben venösen Vollblutes wurde ebenfalls mittels Korrelationskoeffizienten nach Kendall-Tau (τ) untersucht. Die hier untersuchten Messspannen der jeweiligen Serumchemieparameter umfassten folgende Werte: Fruktosamin 223–842 $\mu\text{mol/l}$; Triglyzeride 0,32–8,39 mmol/l; Cholesterin 0,94–24,33 mmol/l; Bilirubin 2,9–176 $\mu\text{mol/l}$; Totalprotein 46,7–80,2 g/l; Albumin 23,6–43,1 g/l; Harnstoff 2,9–81,6 mmol/l; Kreatinin 44–723 $\mu\text{mol/l}$ (siehe auch Tabelle 13). Tabelle 18 zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten mit den zugehörigen p-Werten.

Tabelle 18: Korrelation der β HB-Messergebnisse des GlucoMen® LX PLUS mit der Konzentration verschiedener Serumchemieparameter und Angabe des p-Werts nach Kendall-Tau (τ). Statistisch signifikante Einflüsse sind durch fett gedruckte p-Werte gekennzeichnet ($p < 0,01$ signifikant).

| Laborparameter | Probenanzahl | Korrelationskoeffizient τ | p-Wert |
|----------------|--------------|--------------------------------|-------------------|
| Fruktosamin | 30 | -0,266 | 0,048 |
| Triglyzeride | 49 | 0,140 | 0,167 |
| Cholesterin | 49 | -0,760 | 0,450 |
| Bilirubin | 55 | 0,342 | < 0,001 |
| Totalprotein | 54 | 0,063 | 0,517 |
| Albumin | 54 | -0,082 | 0,401 |
| Harnstoff | 55 | -0,031 | 0,747 |
| Kreatinin | 53 | -0,097 | 0,326 |

2.4. Cut-off-Werte

Neben der Regressionsanalyse, der Berechnung des Intra-Assay-CV und der graphischen Darstellung mittels Streudiagramm nach Bland-Altman zur Validierung des GlucoMen® LX PLUS erfolgte die Ermittlung von spezifischen β HB-Cut-off-Werten zur Diagnose einer DKA. Sie diente auch zur Beurteilung, ab welchem Wert eine schlechte glykämische Kontrolle eines DM mit erhöhten Blutglukosewerten vorliegt und daher vermehrt Ketonkörper gebildet werden.

2.4.1. Cut-off-Wert zur Diagnose einer diabetischen Ketoazidose

Die ROC-Analyse zur Ermittlung eines β HB-Cut-off-Werts zur Diagnose einer DKA für den GlucoMen® LX PLUS erfolgte wie bei der Referenzmethode auf der Basis der klinischen Symptome, der venösen Blutgaswerte (pH-Wert, HCO_3^- , AG), der Blutglukosekonzentration, und, sofern vorhanden, den Testergebnissen der Nitroprussid-Urinteststreifen-Untersuchung. Ein Patient wurde in die Gruppe der DKA (Gruppe 1) eingeteilt, wenn folgende Kriterien erfüllt waren: pH-Wert $\leq 7,27$; $\text{HCO}_3^- \leq 14$ mmol/l; AG $> 20,6$ mmol/l; Blutglukose $> 11,1$ mmol/l (200 mg/dl) und ggf. Ketonurie. Die Tiere, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden in die zweite Gruppe eingeteilt (Tiere mit DK und stabile Diabetiker). Von den 26 diabetischen Studientieren wurde ein Patient ausgeschlossen, weil zuvor eine

intravenöse Gabe von Natriumbikarbonat erfolgt war. Ein weiterer Patient wurde ausgeschlossen, da eine schwere Herzerkrankung vorlag, die für den schlechten Zustand des Tieres verantwortlich war. Beides hätte die Ergebnisse verfälscht. 2 Tiere mussten ausgeschlossen werden, weil nicht alle für die ROC-Kurve benötigten Werte von den Patienten vorlagen.

Zusätzlich konnten weitere Diabetiker, deren Daten retrospektiv untersucht wurden, in die Untersuchung eingeschlossen werden. Patientendaten konnten mehrfach eingeschlossen werden, wenn diese von unterschiedlichen Besuchen stammten. Insgesamt wurden 43 Proben unterschiedlicher Besuche von 39 Patienten analysiert. Die unterschiedliche Probenanzahl für die ROC-Analyse der Referenzmethode ($n = 18$) und des GlucoMen[®] LX PLUS ($n = 43$) ergibt sich aus den in die Untersuchung des GlucoMen[®] LX PLUS aufgenommenen Werten der retrospektiven Daten. Tabelle 19 zeigt die Daten des Patientengutes 2.1. Die Kurve der zugehörigen ROC-Analyse ist in Abbildung 17 dargestellt.

Tabelle 19: Ergebnisse des Patientengutes 2.1, das in der ROC-Analyse zur Erstellung eines β HB-Cut-off-Werts zur Diagnose einer DKA für den GlucoMen® LX PLUS verwendet wurde. Signalement und Laborparameter (Mittelwert und Standardabweichung) der Diabetiker (n = 39) (AG = Anionenlücke, β HB = β -Hydroxybutyrat, DKA = diabetische Ketoazidose, HCO_3^- = Bikarbonat, GM = GlucoMen® LX PLUS, mk = männlich kastriert, mmol/l = Millimol pro Liter, n = Probenanzahl, wk = weiblich kastriert). Bei 10 Patienten waren keine Ergebnisse der Nitroprussid-Urinteststreifen-Untersuchung verfügbar. Die Prozente beziehen sich auf die Anzahl der vorliegenden Urineststreifen-Ergebnisse (n = 31). 2 Patienten waren mit je 2 Werten von unterschiedlichen Besuchen in der Untersuchung vertreten.

| Parameter | DKA (n = 24) | andere (n = 19) |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| Alter (Jahre) | 11,9 \pm 3,2 | 11,6 \pm 3,2 |
| Geschlecht | 15 mk/ 7 wk | 11 mk/ 7 wk |
| pH-Wert (venös) | 7,13 \pm 0,10 | 7,34 \pm 0,05 |
| Blutglukose (mmol/l) | 25,9 \pm 7,0 | 21,7 \pm 8,8 |
| HCO_3^- (mmol/l) | 11,7 \pm 3,9 | 20,5 \pm 3,0 |
| AG (mmol/l) | 33,0 \pm 7,4 | 20,5 \pm 4,0 |
| Nitroprussid-Urinteststreifen | | |
| negativ | 3 (18,8 %) | 12 (80 %) |
| 1+ | 2 (12,5 %) | 3 (20 %) |
| 2+ | 8 (50 %) | |
| 3+ | 3 (18,8 %) | |
| β HB GM (mmol/l) | 4,9 \pm 1,9 | 1,2 \pm 1,2 |

Die AUC ergab einen Wert von 0,954 (95 % CI: 0,843–0,994). Der ermittelte β HB-Cut-off-Wert zur Diagnose einer DKA mit dem besten Kompromiss aus Sensitivität und Spezifität lag bei $> 1,9$ mmol/l und hatte eine Sensitivität von 95,8 % (95 % CI: 78,9–99,9 %) mit einer Spezifität von 84,2 % (95 % CI: 60,4–96,6 %). Das positive LR lag bei 6,1. Der Wert mit dem höchsten positiven LR von 14,3 lag bei $> 3,2$ mmol/l. Der diagnostische β HB-Cut-off-Wert wurde wie bei der Referenzmethode auf 2 mmol/l festgelegt.

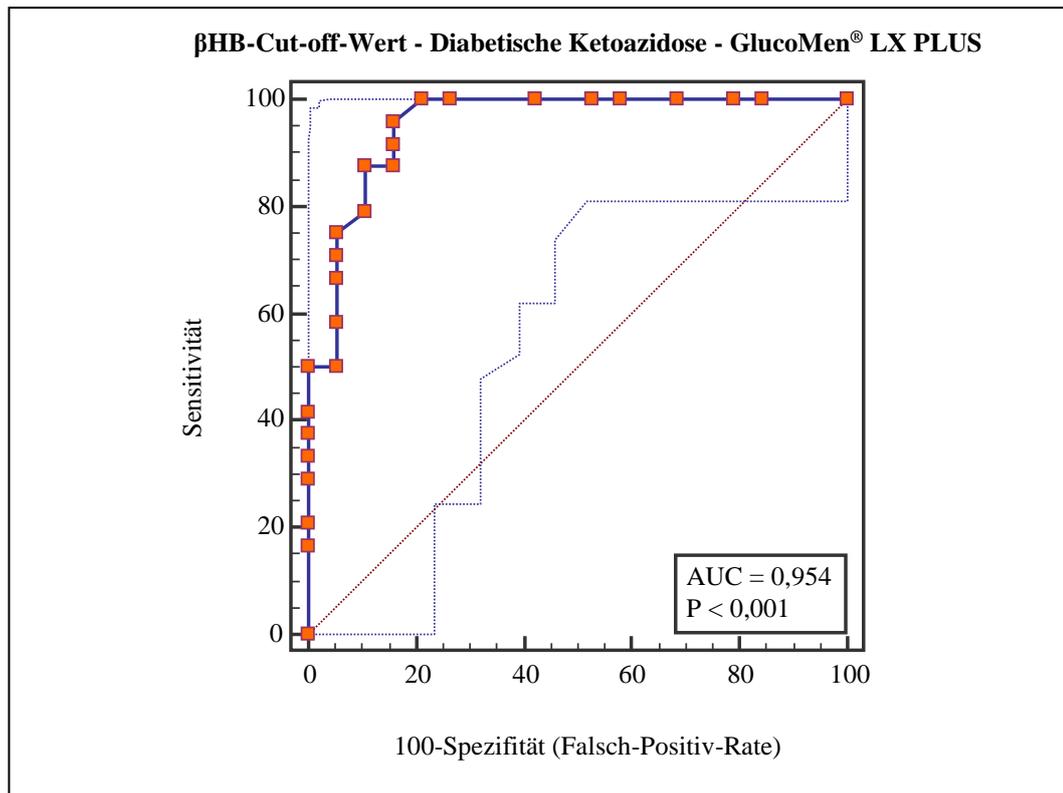


Abbildung 17: Kurve der ROC-Analyse (blaue durchgehende Linie) der Ermittlung des β HB-Cut-off-Werts des GlucoMen® LX PLUS zur Diagnose einer diabetischen Ketoazidose mit Konfidenzintervall (blaue unterbrochene Linien) und Winkelhalbierender (rote unterbrochene Linie) basierend auf 43 β HB-Werten von 39 Diabetikern (stabil; DK; DKA). Jeder Punkt (orange) auf der ROC-Kurve entspricht einem bestimmten Cut-off-Wert und repräsentiert ein Paar aus Sensitivität und Spezifität (AUC = area under curve, β HB = β -Hydroxybutyrat, DK = diabetische Ketose, DKA = diabetische Ketoazidose, P = p-Wert).

2.4.2. Cut-off-Wert zur Beurteilung der Diabetes-mellitus-Einstellung

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung eines β HB-Cut-off-Werts zur Differenzierung eines gut von einem schlecht eingestellten DM mit erhöhten Blutglukosewerten und vermehrter Ketonkörperbildung. Für die Analyse wurden die prospektiven Daten der Diabetiker und der gesunden Kontrollgruppe verwendet. Die Kontrollgruppe wurde bei der Ermittlung des Cut-off-Werts in dieser Analyse berücksichtigt und zusammen mit den gut eingestellten Diabetikern eingruppiert, da sich ein gut eingestellter und kontrollierter Diabetiker metabolisch gesehen nicht wesentlich von einem gesunden Tier unterscheiden sollte. Die Einteilung der Tiere erfolgte anhand der klinischen Symptome (Polyurie, Polydipsie, Polyphagie), der Blutglukosewerte im Tagesprofil und/ oder der Fruktosaminwerte. Ein Diabetiker wurde als gut eingestellt eingestuft, wenn die Blutglukose im Tagesverlauf $\leq 13,8$ mmol/l (250 mg/dl) und/oder der

Fruktosaminwert $< 450 \mu\text{mol/l}$ lag und keine auffälligen klinischen Symptome des DM mehr bestanden. Von den 26 Diabetikern, die in dieser Studie untersucht wurden, wurde ein Patient aufgrund einer schweren Herzerkrankung ausgeschlossen. Dies hätte die Ergebnisse verfälscht. Ein weiteres Tier wurde ausgeschlossen, da es zwar unter einem schlecht eingestellten DM litt, aber eine Hypoglykämie ursächlich war. 2 Tiere musste ausgeschlossen werden, weil nicht alle für die ROC-Kurve benötigten Werte der Patienten vorlagen. Die βHB -Werte der 22 verbliebenen Tiere wurden in die Untersuchung aufgenommen.

Zusätzlich wurden die Diabetiker, deren Daten retrospektiv untersucht wurden, in die Untersuchung eingeschlossen. Patientendaten konnten mehrfach eingeschlossen werden, wenn diese von unterschiedlichen Besuchen stammten. Insgesamt wurden 65 Proben unterschiedlicher Besuche von 39 Patienten und 12 Kontrolltieren analysiert. Die unterschiedliche Probenanzahl für die ROC-Analyse der Referenzmethode ($n = 34$) und des GlucoMen® LX PLUS ($n = 65$) ergibt sich aus den in die Untersuchung des GlucoMen® LX PLUS aufgenommenen Werten der retrospektiven Daten. Tabelle 20 zeigt die Daten des Patientengutes 2.2. Die Kurve der zugehörigen ROC-Analyse ist in Abbildung 18 dargestellt.

Tabelle 20: Ergebnisse des Patientengutes 2.2, das in der ROC-Analyse zur Ermittlung eines βHB -Cut-off-Werts zur Beurteilung der Einstellung eines DM für den GlucoMen® LX PLUS verwendet wurde. Signalement und Laborparameter (Mittelwert und Standardabweichung) der Diabetiker ($n = 39$) und der Kontrollgruppe ($n = 12$) ($\beta\text{HB} = \beta\text{-Hydroxybutyrat}$, GM = GlucoMen® LX PLUS, m = männlich intakt, mk = männlich kastriert, $\mu\text{mol/l}$ = Mikromol pro Liter, mmol/l = Millimol pro Liter, n = Probenanzahl, w = weiblich intakt, wk = weiblich kastriert). Ein Patient war mit 6 Werten, 2 Patienten waren mit je 3 Werten und 5 Patienten waren mit je 2 Werten von unterschiedlichen Besuchen in der Untersuchung vertreten.

| Parameter | gute glykämische Kontrolle (n = 20) | schlechte glykämische Kontrolle (n = 45) |
|---|-------------------------------------|--|
| Alter (Jahre) | $6,2 \pm 5,6$ | $12,0 \pm 3,0$ |
| Geschlecht | 6 m/ 7 mk/ 2 w/ 4 wk | 24 mk/ 11 wk |
| Blutglukose (mmol/l) | $7,0 \pm 3,4$ | $18,5 \pm 4,7$ |
| Fruktosamin ($\mu\text{mol/l}$) (nur Diabetikergruppe) | 346 ± 68 | 577 ± 107 |
| βHB GM (mmol/l) | $0,1 \pm 0,1$ | $3,0 \pm 2,5$ |

Die AUC ergab einen Wert von 0,926 (95 % CI: 0,833–0,976). Der ermittelte

β HB-Cut-off-Wert von $> 0,3$ mmol/l ergab den besten Kompromiss aus Sensitivität und Spezifität mit einer Sensitivität von 82,2 % (95 % CI: 67,9–92 %) und eine Spezifität von 100 % (95 % CI: 83,2–100 %). Ein positives LR konnte aufgrund der Spezifität (100%) nicht berechnet werden. Bei einem β HB-Wert $> 0,3$ mmol/l besteht die Wahrscheinlichkeit, dass ein schlecht eingestellter DM mit zu hohen Blutglukosewerten und einer vermehrten Ketonkörperbildung vorliegt.

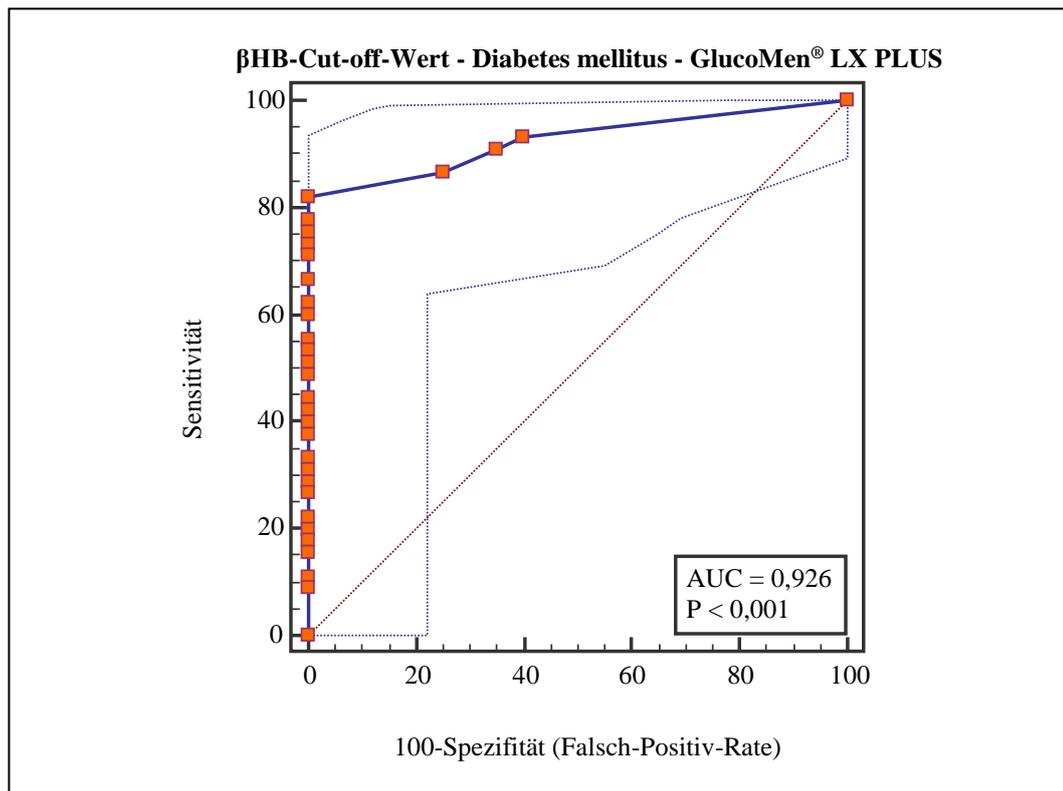


Abbildung 18: Kurve der ROC-Analyse (blaue durchgehende Linie) der Ermittlung des β HB-Cut-off-Werts des GlucoMen® LX PLUS zur Beurteilung der Diabetesmellitus-Einstellung mit Konfidenzintervall (blaue unterbrochene Linien) und Winkelhalbierender (rote unterbrochene Linie) basierend auf 65 β HB-Werten von 39 Diabetikern (stabil; DK; DKA) und 12 gesunden Kontrolltieren. Jeder Punkt (orange) auf der ROC-Kurve entspricht einem bestimmten Cut-off-Wert und repräsentiert ein Paar aus Sensitivität und Spezifität (AUC = area under curve, β HB = β -Hydroxybutyrat, P = p-Wert).

3. Nitroprussid-Urinteststreifen

Der Vergleich der Ergebnisse der Ketonkörpermessung aus Urin mittels Nitroprussid-Urinteststreifen mit den Ergebnissen der Ketonkörpermessung aus Blutproben mittels GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode erfolgte mit den

Daten des Patientengutes 3. Es konnten 35 Urinproben von Diabetikern, die mittels Teststreifen auf Ketonkörper untersucht wurden, im Vergleich mit den β HB-Messergebnissen des GlucoMen® LX PLUS ausgewertet werden. Zum Vergleich mit den β HB-Messergebnissen der Referenzmethode konnten 18 dieser Urinproben analysiert werden.

Bei einem der vorgestellten Patienten konnte aufgrund mangelnden Urinvolumens in der Harnblase keine Urinprobe gewonnen werden. Bei einem Patienten wurde aufgefangener Urin, bei allen übrigen Patienten wurde Zystozentese-Urin für diese Untersuchung verwendet. Bei den mittels Zystozentese gewonnenen Urinproben wurde zusätzlich eine bakteriologische Untersuchung des Urins durchgeführt. Von den Patienten, von denen initial keine oder nur eine Probe aufgefangenen Urins in die Nitroprussid-Teststreifen-Untersuchung eingegangen war, wurde zu einem späteren Zeitpunkt eine erneute Probe mittels Zystozentese entnommen und anschließend auf das Vorliegen eines bakteriellen Harnwegsinfekts untersucht. Bei keinem der Patienten konnte mittels bakteriologischer Untersuchung ein Harnwegsinfekt nachgewiesen werden, der aufgrund des potenziellen Ketonkörperabbaus durch Bakterien einen Einfluss auf die AcAc-Konzentration im Urin haben konnte.

Die Übereinstimmung der Ergebnisse der Ketonkörpermessung mittels Nitroprussid-Teststreifen-Untersuchung aus Urin mit den Ergebnissen der Ketonkörpermessung der Referenzmethode (Serum) und des GlucoMen® LX PLUS (Vollblut) wurde mittels des exakten Fisher-Tests untersucht. Um dabei die diagnostische Übereinstimmung der Nitroprussid-Teststreifen-Ergebnisse mit denen der Referenzmethode und des GlucoMen® LX PLUS zu vergleichen, wurde als Nachweisgrenze für Ketonkörper im Urin der zuvor ermittelte β HB-Cut-off-Wert zur Diagnose einer DKA von 2 mmol/l für beide Methoden gewählt. Ab diesem diagnostisch relevanten β HB-Wert sollte eine ausreichende AcAc-Konzentration, also Ketonurie, vorliegen. Im Nitroprussid-Test können lediglich AcAc und Aceton nachgewiesen werden.

3.1. Referenzmethode und Nitroprussid-Urinteststreifen-Untersuchung

Beim Vergleich der Ergebnisse der Ketonkörpermessung aus Urin mittels der Nitroprussid-Teststreifen-Untersuchung mit den Blut- β HB-Konzentrationen aus Serum, gemessen mit der Referenzmethode, zeigten 6 Tiere (33,3 %) ein positives

Urinergebnis auf Ketonkörper (Keton 2+ bis 3+) und gleichzeitig erhöhte β HB-Werte > 2 mmol/l (4,8 mmol/l; 6,2 mmol/l; 8 mmol/l; 11,1 mmol/l; 15,3 mmol/l; 19,8 mmol/l) in der Referenzmessung. Bei einem Patienten (5,6 %) konnte nur eine geringe Menge an Ketonkörpern im Urin nachgewiesen werden (Keton 1+) bei einem gemessenen β HB-Wert im Blut von 13,8 mmol/l. 9 Tiere (50 %) hatten ein negatives Urinergebnis und die mittels Referenzmethode gemessenen β HB-Werte dieser Patienten lagen zwischen 0,1–1,9 mmol/l. 2 der Patienten (11,1 %) zeigten ein negatives Urinergebnis, obwohl bei ihnen erhöhte β HB-Konzentrationen im Blut vorlagen (2,2 mmol/l; 5 mmol/l). Tabelle 21 zeigt die Daten des Patientengutes 3. Ein Patient konnte aufgrund einer zuvor durchgeführten intravenösen Bikarbonatgabe bez. seines pH-Werts nicht beurteilt werden und wurde daher nicht in dieser Tabelle aufgeführt.

Tabelle 22 zeigt die sogenannte „Vierfeldertafel“ mit den Ergebnissen des exakten Fisher-Tests.

Der im exakten Fisher-Test ermittelte p-Wert lag $< 0,05$ (Signifikanzniveau). Daher kann die hier überprüfte Nullhypothese, dass die β HB-Messung aus Serum mittels Referenzmethode und die Ketonkörperbestimmung aus Urin mittels Nitroprussid-Teststreifen bei dem in dieser Studie ermittelten diagnostischen β HB-Cut-off-Wert von 2 mmol/l gleichwertige Diagnostika zum Nachweis einer DKA sind, verworfen werden. Beide Methoden zeigen Unterschiede bezüglich ihrer Fähigkeit, eine DKA zu diagnostizieren.

Tabelle 21: Ergebnisse des Patientengutes 3, das im exakten Fisher-Test zum Vergleich der Ergebnisse der Ketonkörpermessung aus Urin mit den Ergebnissen der β HB-Messung aus Blut mittels Referenzmethode verwendet wurde. Signalement und Laborparameter (Mittelwert und Standardabweichung) der Diabetiker ($n = 17$) (AG = Anionenlücke, β HB = β -Hydroxybutyrat, HCO_3^- = Bikarbonat, DKA = diabetische Ketoazidose, mmol/l = Millimol pro Liter, mk = männlich kastriert, n = Probenanzahl, Referenz = Referenzmethode, wk = weiblich kastriert).

| Parameter | DKA (n = 8) | andere (n = 9) |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| Alter (Jahre) | 11,8 \pm 2,8 | 13,4 \pm 3,5 |
| Geschlecht | 5 mk/ 3 wk | 6 mk/ 3wk |
| pH-Wert (venös) | 7,15 \pm 0,06 | 7,35 \pm 0,07 |
| Blutglukose (mmol/l) | 24,5 \pm 6,2 | 15,6 \pm 6,5 |
| HCO_3^- (mmol/l) | 12,5 \pm 2,5 | 21,1 \pm 3,7 |
| AG (mmol/l) | 30,0 \pm 6,3 | 17,9 \pm 1,6 |
| Nitroprussid- Urinteststreifen | | |
| negativ | 1 (12,5 %) | 9 (100 %) |
| 1+ | 1 (12,5 %) | |
| 2+ | 4 (50 %) | |
| 3+ | 2 (25 %) | |
| β HB Referenz (mmol/l) | 10,2 \pm 5,5 | 0,5 \pm 0,6 |

Tabelle 22: Vierfeldertafel zur Darstellung der mittels des exakten Fisher-Tests ermittelten Übereinstimmung der Ergebnisse der Nitroprussid-Urinteststreifen und der Referenzmethode (Serum) bei einer festgelegten Nachweisgrenze von 2 mmol/l (β HB-Konzentration) basierend auf 18 Untersuchungen. Der ermittelte p-Wert (zweiseitig) ergab einen Wert $< 0,05$ (0,022). (β HB = β -Hydroxybutyrat, mmol/l = Millimol pro Liter).

| Urinteststreifen | Referenzmethode β HB-Konzentration | | Summe (in Prozent) |
|--------------------|---|-----------------|--------------------|
| | < 2 mmol/l | ≥ 2 mmol/l | |
| negativ | 11 | 2 | 13 (72,2 %) |
| positiv | 1 | 4 | 5 (27,8 %) |
| Summe (in Prozent) | 12 (66,7 %) | 6 (33,3 %) | 18 (100 %) |

3.2. GlucoMen® LX PLUS und Nitroprussid-Urinteststreifen-Untersuchung

Der Vergleich der Ergebnisse der Ketonkörpermessung aus Urin mittels der Nitroprussid-Urinteststreifen-Untersuchung mit den Blut- β HB-Konzentrationen aus venösem Vollblut gemessen mittels GlucoMen® LX PLUS erfolgte auf Basis der Daten der im prospektiven Teil ($n = 21$) und im retrospektiven Teil der Studie untersuchten Diabetiker ($n = 14$). Insgesamt wurden 35 Datensätze ausgewertet. 16 der 35 Katzen (45,7 %) hatten ein positives Urinergebnis auf Ketonkörper und gleichzeitig mittels GlucoMen® LX PLUS messbare Blut- β HB-Konzentrationen (Messbereich: 0,9 mmol/l bis „HI“). Bei 4 dieser Patienten konnte nur eine geringe Ketonurie (Keton 1+) festgestellt werden, wogegen die Messung des GlucoMen® LX PLUS einen vergleichsweise hohen und als kritisch zu bewertenden β HB-Wert ergab (2,6 mmol/l; 2,7 mmol/l; 4,9 mmol/l; 5,3 mmol/l). Bei den anderen 12 Patienten zeigten sich Überschneidungen in den semiquantitativen Kategorien der Teststreifen-Untersuchung (Keton 1+ bis 3+) im gesamten mittels GlucoMen® LX PLUS gemessenen β HB-Konzentrationsbereich. Bei 10 (28,6 %) der Patienten konnten keine Ketonkörper im Urin nachgewiesen werden, obwohl die Messung mittels GlucoMen® LX PLUS erhöhte β HB-Werte ergab (3,2 mmol/l; 3,1 mmol/l; 2,2 mmol/l; 2 mmol/l; 1,9 mmol/l; 1,4 mmol/l; 1,3 mmol/l (3 Patienten); 1,1 mmol/l). 9 Patienten (25,7 %) zeigten ein negatives Urinergebnis und in der Messung mittels GlucoMen® LX PLUS niedrige bis nicht messbare β HB-Werte („LO“ bis 0,4 mmol/l). Tabelle 23 zeigt die Daten des Patientengutes 3. Ein Patient konnte aufgrund einer zuvor durchgeführten intravenösen Bikarbonatgabe bez. seines pH-Werts nicht beurteilt werden und wurde daher nicht in dieser Tabelle aufgeführt. Tabelle 24 zeigt die Vierfeldertafel mit den Ergebnissen des exakten Fisher-Tests.

Tabelle 23: Ergebnisse des Patientengutes 3, das im exakten Fisher-Test zum Vergleich der Ergebnisse der Ketonkörpermessung aus Urin mit den Ergebnissen der β HB-Messung aus Blut mittels GlucoMen® LX PLUS verwendet wurde. Signalement und Laborparameter (Mittelwert und Standardabweichung) der Diabetiker (n = 31) (AG = Anionenlücke, β HB = β -Hydroxybutyrat, DKA = diabetische Ketoazidose, GM = GlucoMen® LX PLUS, HCO_3^- = Bikarbonat, mmol/l = Millimol pro Liter, mk = männlich kastriert, n = Probenanzahl, wk = weiblich kastriert).

| Parameter | DKA (n = 16) | andere (n = 18) |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| Alte (Jahre) | 12,2 \pm 2,7 | 11,7 \pm 3,2 |
| Geschlecht | 9 mk/ 5 wk | 10 mk/ 7 wk |
| pH-Wert (venös) | 7,13 \pm 0,09 | 7,34 \pm 0,05 |
| Blutglukose (mmol/l) | 26,0 \pm 7,1 | 21,9 \pm 8,8 |
| HCO_3^- (mmol/l) | 11,8 \pm 3,0 | 20,6 \pm 3,0 |
| AG (mmol/l) | 32,1 \pm 6,9 | 20,2 \pm 3,1 |
| Nitroprussid-Urinteststreifen | | |
| negativ | 3 (18,8 %) | 15 (83,3 %) |
| 1+ | 2 (12,5 %) | 3 (16,7 %) |
| 2+ | 8 (50 %) | |
| 3+ | 3 (18,8 %) | |
| β HB GM (mmol/l) | 4,6 \pm 2,1 | 1,0 \pm 1,2 |

Tabelle 24: Vierfeldertafel zur Darstellung der mittels des exakten Fisher-Tests ermittelten Übereinstimmung der Ergebnisse der Nitroprussid-Urinteststreifen und des GlucoMen® LX PLUS (Vollblut) bei einer festgelegten Nachweisgrenze von 2 mmol/l (β HB-Konzentration) basierend auf 35 Untersuchungen. Der ermittelte p-Wert (zweiseitig) ergab einen Wert < 0,05 (0,001) (β HB = β -Hydroxybutyrat, mmol/l = Millimol pro Liter).

| Urinteststreifen | GlucoMen® LX PLUS β HB-Konzentration | | Summe (in Prozent) |
|--------------------|--|-----------------|--------------------|
| | < 2 mmol/l | \geq 2 mmol/l | |
| negativ | 16 | 5 | 21 (60 %) |
| positiv | 2 | 12 | 14 (40 %) |
| Summe (in Prozent) | 18 (51,4 %) | 17 (48,6 %) | 35 (100 %) |

Der im exakten Fisher-Test ermittelte p-Wert lag $< 0,05$ (Signifikanzniveau). Daher kann die hier überprüfte Nullhypothese, dass die β HB-Messung aus Vollblut mittels GlucoMen[®] LX PLUS und die Ketonkörperbestimmung aus Urin mittels Nitroprussid-Teststreifen bei dem in dieser Studie ermittelten diagnostischen β HB-Cut-off-Wert von 2 mmol/l gleichwertige Diagnostika zum Nachweis einer DKA sind, verworfen werden. Beide Methoden zeigen Unterschiede bezüglich ihrer Fähigkeit, eine DKA zu diagnostizieren.

V. DISKUSSION

In der Humanmedizin gehören portable Blutglukosemessgeräte (PBGM) mit Ketonkörpermessfunktion zu den standardmäßig verwendeten diagnostischen Hilfsmitteln bei Diabetikern, da sie schnell und einfach zu bedienen sind und im Vergleich zu standardisierten Labormethoden ebenso präzise und valide Messwerte liefern (BYRNE et al., 2000; NOYES et al., 2007; JANSSEN et al., 2010). Auch in der Veterinärmedizin gewinnen die portablen Geräte an Bedeutung. Bis vor kurzem waren keine Geräte zur Ketonkörpermessung speziell für den veterinärmedizinischen Markt erhältlich. Mit dem PBGM Wellion[®]Vet BELUA wurde inzwischen ein Gerät zur Blutglukose- und Ketonkörpermessung aus kapillärem und venösem Blut von Hunden und Katzen auf den Markt gebracht, das ein Blutprobenvolumen von 0,8 µl benötigt. Allerdings liefern die Angaben des Herstellers keine Informationen zur Richtigkeit und Präzision dieses Gerätes (WELLION[®]VET MEDTRUST HANDELSGES.M.B.H., 2016) und unabhängige Studien hierzu wurden noch nicht publiziert. In 3 Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass auch humanmedizinische Geräte für den diagnostischen Einsatz bei Katzen geeignet sind (HOENIG et al., 2008; WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). Aktuell sind 2 humanmedizinische Geräte auf dem Markt (Precision Xtra[™] und Precision Xceed), die zwar für den Einsatz bei Katzen validiert worden sind, aber mit 10 und 1,5 µl ein relativ großes Blutprobenvolumen benötigen, was v. a. bei der Messung aus kapillären Blutproben (WESS & REUSCH, 2000; CASELLA et al., 2002; VAN DE MAELE et al., 2005), aber auch bei der Messung aus venösen Proben Probleme bereiten kann.

Das Ziel dieser Studie war es daher, das für die Humanmedizin entwickelte PBGM mit Ketonkörpermessfunktion, den GlucoMen[®] LX PLUS, der lediglich ein Blutprobenvolumen von 0,8 µl für ein βHB-Messergebnis benötigt, für den diagnostischen Einsatz bei Katzen zu validieren und zu untersuchen, ob andere Blutparameter, wie Hämatokrit oder verschiedene Serumchemieparameter einen Einfluss auf die Richtigkeit der Messwerte haben können. Ein weiteres Ziel war die Ermittlung von spezifischen βHB-Cut-off-Werten für den GlucoMen[®] LX PLUS und die Referenzmethode zur Diagnose einer DKA und zur Differenzierung zwischen einem gut und schlecht eingestellten DM.

Zunächst wurde in der vorliegenden Untersuchung die Präzision des GlucoMen® LX PLUS und die der Referenzmethode anhand des Intra-Assay-CV aus venösen Vollblut- und aus Serumproben ermittelt. Der ermittelte CV für die Referenzmethode lag bei 1,2 % mit einer SD von 0,1 mmol/l für hohe (5,8–6,0 mmol/l) und bei 0 % mit einer SD von 0 mmol/l für niedrige β HB-Konzentrationen (0,1 mmol/l). Für den GlucoMen® LX PLUS ergab sich in dieser Studie ein CV von 6,2 % für hohe β HB-Konzentrationen (3,8–4,8 mmol/l) mit einer SD von 0,3 mmol/l und ein CV von 18,2 % mit einer SD von 0,0 mmol/l für niedrige Konzentrationen (0,2–0,3 mmol/l). Die von ZEUGSWETTER und REBUZZI (2012) ermittelten Werte für das Ketonometer Precision Xtra™ ergaben einen Intra-Assay-CV von 29,4 % für niedrige (MW 0,3 mmol/l \pm 0,1 mmol/l), einen CV von 5,2 % für mittlere (MW 2,4 mmol/l \pm 0,1 mmol/l) und von 6 % für hohe β HB-Konzentrationen (MW 4,7 mmol/l \pm 0,3 mmol/l) (ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). Das Precision Xceed konnte dagegen noch präzisere Messungen aufweisen mit einem CV von 1,3 % für niedrige (0–0,3 mmol/l), 6,6 % für mittlere (0,4–3,5 mmol/l) und 1,9 % für hohe β HB-Konzentrationen (> 3,5 mmol/l) (WEINGART et al., 2012b). Die Präzision dieser beiden Geräte wurde als gut bewertet (WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). In der ISO-Norm 15197:2013 zur Validierung von PBGM finden sich keine genauen Anforderungen an Variationskoeffizienten für die Geräte (TECHNICAL COMMITTEE ISO/TC 212, 2013). Im Allgemeinen spricht jedoch ein Intra-Assay-CV von < 15 % für eine gute diagnostische Präzision einer Methode (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al., 2001). Der GlucoMen® LX PLUS schneidet aufgrund seines relativ hohen CV bei niedrigen Konzentrationen im Vergleich zu der in der vorliegenden Studie verwendeten Referenzmethode oder dem Precision Xceed schlechter ab. Dies ist jedoch akzeptabel, da sich die Abweichungen im Bereich < 1 mmol/l auf diagnostisch nicht relevante Werte beziehen. Im β HB-Konzentrationsbereich, der für die Diagnose und Therapie einer DKA entscheidend ist (> 1,9 mmol/l) ergibt sich eine gute Präzision.

Die Überprüfung der Richtigkeit der β HB-Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus venösem Vollblut, Kapillarblut und mit EDTA versetztem venösem Blut von Katzen erfolgte durch Vergleich dieser Messwerte mit den Ergebnissen der enzymatischen spektrophotometrischen Referenzmethode aus gleichzeitig den

Tieren entnommenen Serumproben. Die β HB-Messwerte des GlucoMen[®] LX PLUS aus Proben venösen Vollblutes zeigten insgesamt eine akzeptable Übereinstimmung mit den Werten, die mittels der Referenzmethode aus Serum bestimmt worden waren. Das Bias betrug $-0,3$ mmol/l mit einer SD von $0,6$ mmol/l und Übereinstimmungsgrenzen von $-1,4$ – $0,9$ mmol/l. Auch wenn die durchschnittliche Differenz zwischen beiden Methoden gering war, konnten die mittels GlucoMen[®] LX PLUS gemessenen Werte bis zu $1,4$ mmol/l unter oder $0,9$ mmol/l über den mittels Referenzmethode gemessenen β HB-Werten liegen. Diese Abweichungen sind bezüglich ihrer klinischen Relevanz durchaus kritisch zu beurteilen und können für den Patienten und das weitere diagnostische und therapeutische Vorgehen entscheidend sein. Abweichungen nach unten von bis zu $1,4$ mmol/l sind problematisch, wenn die mittels GlucoMen[®] LX PLUS gemessene β HB-Konzentration unterhalb des diagnostisch relevanten Werts liegt und der Patient trotz des tatsächlichen Vorliegens einer signifikanten Ketose oder Ketoazidose nicht als kritisch eingestuft würde. Diese Tatsache kann weiterführende Diagnostik nach sich ziehen und den Therapiebeginn auf diese Weise verzögern. Dagegen kann die Angabe einer um $0,9$ mmol/l zu hohen β HB-Konzentration dazu führen, dass Patienten kritisch bezüglich ihrer Stoffwechselsituation eingeschätzt und entsprechend aufgrund einer vermeintlichen DKA behandelt würden. Eine intensiv kontrollierte Therapieform schadet dem Patienten in diesem Fall zwar nicht und viele Tiere können von der Therapie profitieren, jedoch sind die dabei anfallenden Kosten für den Besitzer zu bedenken.

Die beobachteten Abweichungen zwischen den Messungen des GlucoMen[®] LX PLUS und denen der Referenzmethode ergaben sich vor allem im β HB-Wertebereich $> 2,5$ mmol/l. Da ein proportionaler Fehler vorlag, der dazu führte, dass die Messergebnisse mit steigender β HB-Konzentration ungenauer wurden und stärker in Bezug zur Referenzmethode streuten, wurde noch ein weiteres Streudiagramm nach Bland-Altman für den β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l erstellt. Hier betrug das Bias $-0,1$ mmol/l mit einer SD von $0,2$ mmol/l und Übereinstimmungsgrenzen von $-0,5$ – $0,3$ mmol/l. Der GlucoMen[®] LX PLUS zeigte damit bei β HB-Konzentrationen $\leq 2,5$ mmol/l eine sehr gute Übereinstimmung mit der Messung der Referenzmethode aus Serumproben. Abweichungen von $0,5$ mmol/l oder $0,3$ mmol/l sind in den wenigsten Fällen als

problematisch zu sehen und es sollten sich aufgrund dessen keine negativen Konsequenzen für die Katze bezüglich der Diagnose und Therapie der DKA ergeben.

Die oben genannten Ergebnisse des Bland-Altman-Diagrammes dieser Studie sind im Einklang mit den Ergebnissen von ZEUGSWETTER und REBUZZI (2012) sowie WEINGART und Mitarbeitern (2012b). Der GlucoMen® LX PLUS zeigte bei der Messung aus venösem Vollblut eine deutliche Tendenz die β HB-Werte bei tatsächlich (laut Referenzmethode) höheren Konzentrationen zu niedrig anzugeben. ZEUGSWETTER und REBUZZI (2012) kamen bei dem in ihrer Studie evaluierten Precision Xtra™ zu einer ähnlichen Erkenntnis. Sie beschrieben eine akzeptable Reproduzierbarkeit und Übereinstimmung mit der Referenzmethode bei niedrigen bis mittleren β HB-Konzentrationen, während jedoch bei höheren Konzentrationen ein negatives Bias von bis zu 9 mmol/l (median -3,3 mmol/l; 95 % CI: -0,78 bis -8,97 mmol/l) festgestellt wurde. Auch WEINGART und Mitarbeiter (2012b) konnten eine ähnliche Tendenz beim Precision Xceed feststellen und zeigten, dass bei der Messung aus venösem Blut bei β HB-Werten < 4 mmol/l eine gute Übereinstimmung ($r = 0,97$; $p \leq 0,01$) mit der Referenzmethode bestand. Diese Übereinstimmung nahm allerdings bei β HB-Konzentrationen > 4 mmol/l ab ($r = 0,32$; $p \leq 0,01$), und die Werte wurden vom Ketonometer Precision Xceed in 83 % der Fälle (bei 20 von 24 Katzen) fälschlicherweise zu niedrig angegeben.

In der vorliegenden Studie erzielte die Untersuchung der β HB-Messergebnisse aus Kapillarblut im Vergleich zu der Referenzmessung aus Serum ebenfalls zufriedenstellende Ergebnisse mit einem Bias von 0,1 mmol/l und Übereinstimmungsgrenzen von -1,5–1,8 mmol/l. Die SD betrug hier 0,8 mmol/l. Damit lag bei dieser Untersuchung durchschnittlich ein geringeres Bias vor als beim Vergleich der gesamten Messwerte des GlucoMen® LX PLUS aus Proben venösen Blutes mit den Werten der Referenzmethode zu erkennen war. Allerdings waren hier die Übereinstimmungsgrenzen weiter. Der GlucoMen® LX PLUS gab im Vergleich mit der Referenzmethode um bis zu 1,5 mmol/l niedrigere β HB-Werte an, was mit der Messung aus venösem Vollblut (1,4 mmol/l) vergleichbar war. Es wurden jedoch auch um bis zu 1,8 mmol/l höhere β HB-Werte von dem Gerät gemessen (Vollblut venös: 0,9 mmol/l).

Die Angabe einer fälschlicherweise zu hohen β HB-Konzentration ist für den

Patienten selbst als weniger problematisch zu sehen. Im Falle eines symptomatischen und auffällig gewordenen Diabetikers würde dies zu einem früheren Therapiebeginn als notwendig oder beim Einsatz des Gerätes im Heimmonitoring zu einer früheren Vorstellung beim Tierarzt führen. In beiden Fällen würden jedoch zusätzliche Kosten für den Tierhalter entstehen.

Um zu überprüfen, ob die Verwendung von Kapillarblut auch im β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l die beste Übereinstimmung mit der Referenzmethode zeigte, wurde ein weiteres Streudiagramm nach Bland-Altman erstellt. Hier zeigte sich ein Bias von 0 mmol/l bei einer SD von 0,4 mmol/l und Übereinstimmungsgrenzen von -0,8–0,8 mmol/l. Diese Ergebnisse belegen, dass sowohl die β HB-Messungen aus Kapillarblut wie auch aus venösem Vollblut gerade im niedrigeren und mittleren Ketonkörperkonzentrationsbereich valide Messwerte liefern.

WEINGART und Mitarbeiter (2012b) untersuchten ebenfalls die Verwendung von Kapillarblut ($n = 17$) als Probenmaterial für das Precision Xceed. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die Messungen aus Kapillarblut über den gesamten untersuchten β HB-Konzentrationsbereich eine gute Übereinstimmung mit denen aus venösem Blut aufwiesen ($r = 0,999$; $p \leq 0,01$) (WEINGART et al., 2012b).

Die Untersuchung der Proben kapillären Blutes ist für die Validierung des GlucoMen[®] LX PLUS besonders bedeutend, da die Teststreifen zur β HB-Bestimmung laut Hersteller für die Messung aus frischem kapillären Vollblut konzipiert wurden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen darauf schließen, dass sowohl Proben kapillären Blutes als auch Proben venösen Vollblutes von Katzen als Probenmaterial für das Gerät geeignet sind. Die Ergebnisse der Kapillarblutmessung sind besonders im Hinblick auf die mögliche Verwendung des Gerätes bei der Überwachung diabetischer Katzen durch ihren Besitzer bedeutend. Die Kenntnis der Richtigkeit dieser Messwerte ist hierbei unerlässlich. Die β HB-Messung aus Kapillarblut ist die einzige, die der Besitzer selbst durchführen kann. Bei der Überwachung der diabetischen Katzen zu Hause ist besonders der niedrige β HB-Konzentrationsbereich relevant, da hier bereits leichte Erhöhungen der β HB-Konzentration dem Besitzer eine beginnende Störung im Stoffwechsel anzeigen können und ihn dazu veranlassen sollten, den Rat eines Tierarztes einzuholen. Hierfür ist der GlucoMen[®] LX PLUS gut geeignet.

Bei den vorliegenden Ergebnissen der Messung aus Kapillarblut muss allerdings berücksichtigt werden, dass eine relativ geringe Probenanzahl ($n = 20$ (β HB-Konzentration ≤ 8 mmol/l); $n = 17$ (β HB-Konzentration $\leq 2,5$ mmol/l)) ausgewertet wurde. Zur besseren Beurteilung der Eignung von Kapillarblut für dieses Messverfahren sind weitere Untersuchungen mit einer größeren Probenanzahl zu empfehlen.

Da die GlucoMen[®]-LX-PLUS-Messstreifen ursprünglich für die kapilläre Messung konzipiert wurden, ist die gute Übereinstimmung der venösen β HB-Messwerte mit denen der Referenzmethode positiv zu werten. Trotzdem erstaunen auch die validen kapillären Messungen im gesamten β HB-Konzentrationsbereich, da der GlucoMen[®] LX PLUS laut Herstellerangaben nicht zur Verwendung bei Dehydratation, im Schock, bei Hypertension oder im hyperosmolaren Zustand geeignet ist. Der Großteil der in der Studie untersuchten Tiere befand sich aufgrund der Erkrankung in einer schlechten Kreislaufsituation, sodass bei der Messung von Substraten im Blut Unterschiede zwischen venöser und kapillärer Messung möglich sind. In dieser Studie konnte jedoch kein negativer Einfluss der o. g. Faktoren auf die β HB-Messwerte aus Kapillarblut demonstriert werden.

Um zu überprüfen, ob der GlucoMen[®] LX PLUS trotz der bestehenden Abweichungen von der Referenzmethode zur Diagnosestellung herangezogen werden kann, wurde mittels ROC-Analyse für beide Methoden ein β HB-Cut-off-Wert zur Diagnose einer DKA ermittelt. Sowohl für die Referenzmethode als auch für den GlucoMen[®] LX PLUS wurde anhand der in der Analyse ermittelten Ergebnisse ein β HB-Wert von 2 mmol/l festgelegt. Aufgrund der guten Übereinstimmung mit der Referenzmethode im β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l kann der GlucoMen[®] LX PLUS daher trotz der teilweise stärkeren Streuung bei hohen β HB-Konzentrationen zur Diagnose der DKA bei der Katze eingesetzt werden.

Ferner wurde im Rahmen der ROC-Analyse mithilfe der AUC untersucht, wie gut der GlucoMen[®] LX PLUS und die Referenzmethode zur Diagnose einer DKA geeignet sind. Die AUC ergab einen Wert von 1,000 (95 % CI: 0,815–1,000) für die Referenzmethode und 0,954 (95 % CI: 0,843–0,994) für den GlucoMen[®] LX PLUS. Die „perfekte“ Kurve der ROC-Analyse der Referenzmethode lässt sich vermutlich auf die geringe Patientenzahl und den bei ihnen gemessenen hohen β HB-Werten (MW $9,9 \pm 5,1$ mmol/l) zurückführen. Zur besseren Beurteilung der

diagnostischen Qualität der Referenzmethode ist eine Untersuchung weiterer Patientenzahlen mit β HB-Konzentrationen im mittleren Konzentrationsbereich ($\geq 2,5$ – $3,5$ mmol/l) zu empfehlen.

Sowohl Referenzmethode als auch GlucoMen[®] LX PLUS sind damit sehr gut geeignet, um im Rahmen der DKA-Diagnostik genutzt zu werden. Da es sich bei einer DKA immer um eine Notfallsituation handelt, bei der eine sofortige Diagnosestellung essenziell ist, wird in den meisten Fällen nur ein POC-Test wie der GlucoMen[®] LX PLUS genutzt werden können, da im Allgemeinen keine Zeit besteht, auf Ergebnisse einer Referenzmethode zu warten, für die eine Blutprobe in der Regel eingeschickt werden muss.

Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Studien von WEINGART und Mitarbeitern (2012b) sowie ZEUGSWETTER und REBUZZI (2012), die die Ketonometer Precision Xceed bzw. Precision Xtra[™] auf Validität untersuchten. Die Diagnosestellung einer DKA sollte jedoch nie auf einem einzelnen Test beruhen, sondern zusätzliche Untersuchungen in Form einer Blutgasanalyse und die Bestimmung der Blutglukosekonzentration sind grundsätzlich zu empfehlen, um die Diagnose abzusichern (DUARTE et al., 2002; WEINGART et al., 2012a).

Neben der diagnostischen Nutzung in der Praxis und bei der Verwendung im Heimmonitoring, liegt eine weitere potenzielle Einsatzmöglichkeit des Ketonometers im Bereich der Therapiekontrolle bei DKA-Patienten. Die unmittelbare Kontrolle ohne verzögerte Messergebnisübermittlung der β HB-Konzentration ermöglicht eine sichere und eine umgehend an den Patienten anzupassende Insulintherapie und kann unnötigen langen, intensiven Behandlungszeiten vorbeugen (WIGGAM et al., 1997; NOYES et al., 2007). Damit kann neben dem geringeren Risiko einer insulinbedingten Hypoglykämie durch eine nicht angepasste Therapie auch eine Reduktion der Kosten erreicht werden (VANELLI et al., 2003). Eine verlässliche Therapiekontrolle mittels GlucoMen[®] LX PLUS ist allerdings erst ab Werten $\leq 2,5$ mmol/l gegeben. Im Rahmen des initialen Therapiemonitorings nach erfolgter Diagnosestellung kann die Messung der Ketonkörper mittels GlucoMen[®] LX PLUS daher nicht empfohlen werden, da die Werte zu stark in Bezug zur Referenzmethode streuen, um eine mögliche Verbesserung der Stoffwechselsituation des Patienten zuverlässig zu erkennen.

Die alleinige Verwendung des GlucoMen® LX PLUS im Therapiemonitoring der DKA kann also aufgrund der falschen Angabe einer zu niedrigen β HB-Konzentration dazu verleiten, die Insulindosis frühzeitig zu verringern, und die Therapie kann sich durch die darauf folgende Verschlechterung des Patienten unnötig verlängern. Hier sollten daher weiterhin die klinische Symptomatik und die Kontrolle des Blutglukosespiegels und der Blutgaswerte im Vordergrund der Beurteilung stehen.

Der Vergleich der β HB-Messwerte aus dem mit EDTA antikoagulierten venösen Vollblut mit den Ergebnissen der Referenzmethode aus Serum zeigte ein Bias von $-0,5$ mmol/l mit einer SD von $1,0$ mmol/l und Übereinstimmungsgrenzen von $-2,4$ – $1,5$ mmol/l. Im Vergleich zu den Messwerten aus venösem Vollblut war die Messung damit ungenauer, und die Werte wurden bei der Verwendung von EDTA-Blut bei höheren β HB-Konzentrationen fälschlicherweise um ein weiteres Millimol pro Liter zu niedrig angegeben. Um zu untersuchen, ob die Verwendung von EDTA-Blut auch im relevanten β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l eine schlechtere Übereinstimmung mit der Referenzmethode zeigte, wurde, wie zuvor für die Proben venösen Voll- und kapillären Blutes, ein zusätzliches Streudiagramm nach Bland-Altman erstellt. Hier ergab sich ein Bias von 0 mmol/l mit einer SD von $0,1$ mmol/l und Übereinstimmungsgrenzen von $-0,3$ – $0,3$ mmol/l. EDTA-Blut zeigte somit im niedrigen Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l von allen untersuchten Blutprobenarten die beste Übereinstimmung mit der Referenzmethode. Das Ergebnis ist überraschend, da EDTA-Blut laut Herstellerangaben nicht als Probenmaterial für den GlucoMen® LX PLUS geeignet ist. Da EDTA-Blut aber nur bei geringen Ketonkörperkonzentrationen einsetzbar wäre und die Ketonkörperkonzentration bei Vorstellung des Patienten nicht bekannt ist, sollte EDTA-Blut von Katzen generell nicht für die Messung mittels GlucoMen® LX PLUS eingesetzt werden. Bestenfalls könnte diese Blutprobenart beim Therapiemonitoring der DKA verwendet werden, wenn bereits niedrige Ketonkörperwerte erreicht sind. WEINGART und Mitarbeiter (2012b) untersuchten ebenfalls die Verwendung von EDTA-Blut ($n = 11$) als Probenmaterial für das Precision Xceed. Die Verwendung war für das Gerät jedoch nicht zu empfehlen, da signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten des Ketonometers und denen der Referenzmethode mit Abweichungen von $-0,2$ – $5,3$ mmol/l auftraten ($r = 0,58$; $p \leq 0,01$) (WEINGART

et al., 2012b).

Wie auch bei den Messungen aus Kapillarblut muss berücksichtigt werden, dass eine relativ geringe Probenanzahl ($n = 18$ (β HB-Konzentration ≤ 8 mmol/l); $n = 14$ (β HB-Konzentration $\leq 2,5$ mmol/l)) ausgewertet wurde. Zur besseren Beurteilung der Eignung von EDTA-Blut als Probenmaterial für den GlucoMen® LX PLUS sind weitere Untersuchungen mit einer größeren Probenanzahl zu empfehlen.

Ein wichtiger Faktor bei der Validierung eines neuen Diagnostikums ist die Beeinflussung der Messwerte durch andere Laborparameter. Die Kenntnisse möglicher Veränderungen der Werte durch andere Parameter sind essenziell für den behandelnden Arzt oder Tierarzt, um Laborwerte richtig interpretieren zu können. Bei Verwendung von PBGM konnten sowohl in humanmedizinischen als auch in veterinärmedizinischen Studien Einflüsse verschiedener Blutparameter, wie Hämatokrit oder Triglyzeride, auf die Blutglukosemesswerte nachgewiesen werden (TANG et al., 2000; DAVES et al., 2011). In der ISO-Norm 15197:2013 zur Validierung von PBGM werden zudem Einflüsse durch Kreatinin, Harnstoff, Totalprotein und Albumin beschrieben (TECHNICAL COMMITTEE ISO/TC 212, 2013). Aufgrund der in den Studien und der ISO-Norm dokumentierten Interferenzen wurde in der vorliegenden Studie der potenzielle Einfluss verschiedener Blutparameter auf die β HB-Messung mittels GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode untersucht. In bisherigen Studien zur Evaluation von portablen Ketonometern aus der Humanmedizin für den Einsatz bei Katzen erfolgte lediglich die Untersuchung des Hämatokrits als möglicher Einflussfaktor. Andere Parameter wurden nicht einbezogen (HOENIG et al., 2008; WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). In einer Studie, die den GlucoMen® LX PLUS in seiner Funktion als Glukometer für den Einsatz bei Katzen validierte, wurde der Einfluss der Cholesterin-, Bilirubin-, Albumin- und Harnstoffkonzentration auf die Glukose-Messergebnisse des Gerätes untersucht. Es konnte kein Einfluss dieser Parameter auf die Messergebnisse festgestellt werden (GEIST, 2014). Wie zuvor bereits angemerkt, ist der GlucoMen® LX PLUS nicht geeignet zur Verwendung bei Dehydratation, im Schock, bei Hypertension oder im hyperosmolaren Zustand. Veränderungen dieser Art, allen voran eine Dehydratation, sind jedoch Probleme, die bei DKA-Patienten häufig auftreten. Auch Veränderungen, wie Azotämie, Ikterus oder erhöhte Blutfettwerte,

sind möglicherweise auftretende Veränderungen. Die mittels der Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Kendall-Tau durchgeführte Untersuchung des Einflusses der Blutparameter Fruktosamin, Triglyzeride, Cholesterin, Bilirubin, Totalprotein, Albumin, Harnstoff, Kreatinin und Hämatokrit zeigte im Gegensatz zu den Ergebnissen von GEIST (2014) eine statistisch signifikante Korrelation der Bilirubinkonzentration mit den β HB-Messwerten des GlucoMen[®] LX PLUS aus venösem Vollblut und der Referenzmethode aus Serum. Bei den übrigen Blutparametern konnte kein signifikanter Einfluss nachgewiesen werden. Der hier demonstrierte Einfluss des Bilirubins auf die Messwerte beider Methoden ist jedoch unter Vorbehalt zu sehen. Tiere mit erhöhter Bilirubinkonzentration im Blut litten oftmals unter einer ausgeprägten DKA, die eine begleitende Hepatolipidose (HL) bedingte. Auch kann eine alleinige HL bereits zu erhöhten β HB-Konzentrationen führen (BIOURGE et al., 1994b; PAZAK et al., 1998; AROCH et al., 2012; GORMAN et al., 2016). Eine Hyperbilirubinämie ist ein klassisches Begleitsymptom dieser Erkrankung. In der retrospektiven Studie von AROCH und Mitarbeitern (2012) zur Untersuchung der β HB-Konzentration bei kranken Katzen zeigte sich bei Tieren mit einer erhöhten β HB-Konzentration im Blut eine durchschnittlich höhere Bilirubinkonzentration und häufiger eine Hyperbilirubinämie oder ein Ikterus im Vergleich zu Katzen, deren β HB-Konzentration im Referenzbereich lag. Sie vermuteten, dass dies mit dem häufigen Auftreten der HL in dieser Gruppe zusammenhing (AROCHE et al., 2012). Grundsätzlich sollte jedoch bei Verwendung des GlucoMen[®] LX PLUS oder auch bei der Messung mittels Referenzmethode der mögliche Einfluss des Bilirubins auf die β HB-Messwerte bei der Interpretation bedacht werden.

Die Untersuchung des Einflusses des Hämatokrits auf die Messungen von GlucoMen[®] LX PLUS und Referenzmethode zeigte, wie die Studie von WEINGART und Mitarbeitern (2012b), keine Beeinflussung der β HB-Messwerte. WEINGART und Mitarbeiter (2012b) untersuchten Blutproben von Katzen mit einem Hämatokrit von 17–50 %. In der vorliegenden Studie wurden alle zur Verfügung stehenden Hämatokritwerte in die Untersuchung aufgenommen. Damit wurde der Einfluss des Hämatokrits im Bereich von 13,6–48,6 % (Referenzbereich Hämatokrit: 35–58 %) auf die β HB-Messungen untersucht. Der GlucoMen[®] LX PLUS ist laut Herstellerangaben für Hämatokritwerte von 25–60 % konzipiert worden. Werte außerhalb dieses Bereiches können zu

Messfehlern führen. Da in der vorliegenden Studie hohe Hämatokritkonzentrationen nicht vorhanden waren, ist ein Einfluss bei einem hohen Hämatokritwert nicht auszuschließen.

Die mittels ROC-Analyse ermittelten β HB-Cut-off-Werte für GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode zur Diagnose einer DKA liegen mit 2 mmol/l nahe an den Werten, die bereits in anderen Studien definiert worden waren (WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). ZEUGSWETTER und REBUZZI (2012) ermittelten für das Precision Xtra™ einen β HB-Cut-off-Wert von $> 2,55$ mmol/l (Sensitivität 94 %; Spezifität 64 %), um eine DKA auszuschließen und gaben an, dass das Vorliegen dieser Erkrankung bei einer niedrigeren β HB-Konzentration nicht wahrscheinlich ist und der Tierarzt anderweitige Diagnostik veranlassen sollte, um die Ursache der Ketonkörperbildung abzuklären (ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). WEINGART und Mitarbeiter (2012a) konnten einen β HB-Cut-off-Wert von 2,4 mmol/l zur DKA-Diagnose für die spektrophotometrische Labormethode (Sensitivität 100 %; Spezifität 87 %) bestimmen.

In der ROC-Analyse erfolgte die Zuordnung in die jeweilige Gruppe (1 = DKA; 2 = alle übrigen Diabetiker) anhand der klinischen Symptome, der Blutgasanalyse und der Blutglukosekonzentration. Falls eine Urinanalyse durchgeführt wurde, wurde zusätzlich das Ergebnis der Ketonkörpermessung mittels Nitroprussid-Teststreifen in die Beurteilung aufgenommen. Eine DKA wurde in der vorliegenden Studie folgendermaßen definiert: das Vorhandensein klinischer Symptome (Apathie, Anorexie, Erbrechen, Dehydratation), metabolische Azidose (pH-Wert $\leq 7,27$ und/ oder $\text{HCO}_3^- \leq 14$ mmol/l; AG > 20 , 6 mmol/l), Hyperglykämie $> 11,1$ mmol/l (200 mg/dl) mit oder ohne Ketonurie.

Eine DKA wird allgemein definiert als eine Triade aus Hyperglykämie, metabolischer Azidose mit erhöhter AG und Ketonurie und/oder Ketonämie (FELDMAN & NELSON, 2004), wobei die jeweiligen Angaben zu Glukose-, Bikarbonat- und pH-Werten, die als kritische Werte genannt werden, variieren. (BRUSKIEWICZ et al., 1997; DUARTE et al., 2002; WEINGART et al., 2012a). Von der DKA zu unterscheiden, ist die diabetische Ketose (DK), bei der zwar bereits vermehrt Ketonkörper gebildet werden, aber aufgrund der Kompensationsmöglichkeiten noch keine Azidose besteht. Die betroffenen Patienten zeigen in der Regel keine oder nur wenig Symptome, da diese primär

durch die Entwicklung der Azidose zustande kommen (FELDMAN & NELSON, 2004). Der Säure-Base-Haushalt wird von vielen Faktoren beeinflusst, und der Zeitpunkt, an dem die Pufferkapazitäten des Körpers verbraucht sind, variiert individuell. Eine DK kann bei anhaltender Bildung von Ketonkörpern in eine manifeste DKA fortschreiten (DUARTE et al., 2002). Individuelle Unterschiede im Ketonkörperstoffwechsel, die Konzentration anderer Säuren wie Laktat, oder Unterschiede bei der respiratorischen Kompensation können den Säure-Base-Haushalt beeinflussen (DIBARTOLA, 2011; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). In einer Studie zur Beurteilung des Säure-Base-Haushaltes von Katzen konnten selbst bei gesunden Tieren sehr variable Werte gemessen werden. Folgende Spannen wurden dort ermittelt: pH-Wert: 7,27–7,44; HCO_3^- : 14–21,4 mmol/l; pCO_2 venös: 25,57–37,95; AG: 7,25–20,56 mmol/l (ELLIOTT et al., 2003). Bei vielen Tieren, die an einer DKA erkrankt sind, liegen gemischte Störungen im Säure-Base-Haushalt vor. In einer Studie von ZEUGSWETTER und REBUZZI (2012) zeigte die Mehrheit der Katzen, die βHB -Werte $> 2,55$ oder $> 3,55$ mmol/l ohne begleitende klassische metabolische Azidose ($\text{HCO}_3^- < 14$ mmol/l; AG $> 20,6$ mmol/l) aufwies, eine erhöhte Chloridlücke (berechnet nach der Formel: $120 - [\text{Cl}^-]_{\text{Patient}} \times 156 / [\text{Na}^+]$). Auch in der vorliegenden Studie zeigten sich Überschneidungen bei den βHB -Werten in den beiden Gruppen. Bei einem Patienten lag trotz einem βHB -Wert von 4,5 mmol/l (gemessen mittels GlucoMen® LX PLUS) keine metabolische Azidose vor. Die AG war jedoch deutlich erhöht und es lag eine Hypochlorämie vor (pH 7,39; AG 25,2 mmol/l; HCO_3^- 24,5 mmol/l; Cl^- 91 mmol/l). Aufgrund dieser Befunde, der starken Hyperglykämie (30,6 mmol/l) und seiner klinischen Symptome wurde der Patient in die Gruppe der DKA aufgenommen. Daher sollte die Beurteilung des auffälligen diabetischen Patienten und seiner Behandlung nicht nur vom Vorhandensein einer Azidose abhängen, und die Messung der βHB -Konzentration kann hier einen wesentlichen Beitrag zur Therapieentscheidung leisten. Jedoch zeigte auch die Übersicht der Ergebnisse des Patientengutes 3 (Tabelle 21), dass Patienten (3/18), die nicht die klassischen Laborveränderungen einer DKA mit metabolischer Azidose und keine entsprechenden klinischen Symptome hatten, erhöhte βHB -Werte hatten, die über dem für die DKA ermittelten diagnostischen βHB -Cut-off-Wert dieser Studie lagen. Diese individuellen Unterschiede bei Patienten verdeutlichen, dass der GlucoMen® LX PLUS immer als zusätzliches Diagnostikum neben anderen Untersuchungen eingesetzt werden sollte.

Zusätzlich sollte immer weiterführende Diagnostik durchgeführt werden, um der Ursache der metabolischen Entgleisung des DM auf den Grund zu gehen, da in den meisten Fällen eine Begleiterkrankung zur Entstehung einer DKA führt (CRENSHAW & PETERSON, 1996; BRUSKIEWICZ et al., 1997; FELDMAN & NELSON, 2004).

Der β HB-Cut-off-Wert zur Beurteilung der Einstellung von Katzen mit DM für den GlucoMen® LX PLUS und die Referenzmethode wurde ebenfalls durch eine ROC-Analyse ermittelt. Auch hier ergab die AUC hervorragende Werte von 0,924 (95 % CI: 0,779–0,986) für die Referenzmethode und 0,926 (95 % CI: 0,833–0,976) für den GlucoMen® LX PLUS. Für den GlucoMen® LX PLUS ergab sich ein β HB-Cut-off-Wert von $> 0,3$ mmol/l. Für die Referenzmethode ergab sich ein Wert $> 0,2$ mmol/l. Bei einer β HB-Konzentration über diesem Wert ist die Überprüfung der Einstellung der diabetischen Katze in Form eines Blutglukosetagesprofils zu empfehlen.

Der Wert von 0,3 mmol/l für den GlucoMen® LX PLUS deckt sich weitestgehend mit den Ergebnissen einer anderen Studie zur Einstellung diabetischer Katzen und entspricht im Falle der Referenzmethode dem in dieser Studie ermittelten β HB-Wert (MARTIN & RAND, 2007). MARTIN und RAND (2007) untersuchten verschiedene Laborparameter im Zusammenhang mit den Symptomen von diabetischen Katzen und zeigten, dass unter anderem ein β HB-Wert von $< 0,2$ mmol/l für einen gut eingestellten DM spricht. Andere Studien zeigten jedoch unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der β HB-Werte gesunder Katzen (ZEUGSWETTER et al., 2010; AROCH et al., 2012; WEINGART et al., 2012a), die metabolisch mit gut eingestellten Diabetikern vergleichbar sein sollten. Eine retrospektive Studie zeigte, dass gesunde 12 Stunden gefastete Katzen einen β HB-Wert von bis zu 0,49 mmol/l aufweisen können (AROCH et al., 2012). Hingegen wurden bei ZEUGSWETTER und REBUZZI in einer Studie β HB-Werte von 0,2 mmol/l bei gesunden Katzen (hier erfolgte keine Angabe, ob die Tiere nüchtern waren) und in einer anderen Untersuchung Werte bis 0,1 mmol/l bei gesunden nüchternen Katzen (seit 16 Stunden gefastet) gemessen (ZEUGSWETTER et al., 2010; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). WEINGART und Mitarbeiter (2012a) ermittelten ebenfalls Werte von 0,1 mmol/l für gesunde Katzen einer Kontrollgruppe (hier erfolgte wiederum keine Angabe, ob die Tiere nüchtern waren). Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch GORMAN und Mitarbeiter

(2016). Sie untersuchten eine Gruppe von 43 gesunden Katzen und ermittelten einen β HB-Referenzbereich von 0–0,1 mmol/l (es erfolgte hier ebenfalls keine Angabe, ob die Tiere nüchtern waren). Damit befinden sich die letztgenannten Studienergebnisse im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie und der von AROCH und Mitarbeitern (2012) ermittelte β H-Wert von 0,49 mmol/l war möglicherweise auf das Fasten zurückzuführen. Geringe individuelle Unterschiede sollten aber grundsätzlich auch bei der Interpretation des β HB-Messergebnisses von diabetischen Katzen bedacht werden. Der hier ermittelte β HB-Cut-off-Wert bietet damit lediglich zusätzliche Informationen und ersetzt nicht das notwendige Blutglukosetagesprofil bei diabetischen Katzen. Dieses liefert die verlässlichsten Informationen über das Ansprechen des Patienten auf die Insulintherapie (THOMPSON et al., 2002).

Die Zusammenstellung der Gruppe aus gesunden Kontrolltieren und gut eingestellten Diabetikern bei der Ermittlung des β HB-Cut-off-Werts erfolgte, da sich klinisch unauffällige, gut eingestellte Diabetiker metabolisch gesehen nicht von gesunden Tieren unterscheiden sollten. Veränderungen der Blutfette und Leberenzymaktivitäten, wie sie häufig zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines DM bestehen, sind bei guter Einstellung rückläufig (KRAUS et al., 1997). Die hohe Wahrscheinlichkeit, dass eine Katze bei einer guten Einstellung des DM in Remission gehen kann, belegt dies weiter (SIEBER-RUCKSTUHL et al., 2008; ZINI et al., 2010; GOSTELOW et al., 2014).

Zusätzlich zum Vergleich der β HB-Messwerte des GlucoMen[®] LX PLUS aus venösem Vollblut und Kapillarblut mit den Messergebnissen der Referenzmethode aus Serum, erfolgte der Vergleich der Ergebnisse der β HB-Messung mittels GlucoMen[®] LX PLUS (Vollblut venös) und der Referenzmethode (Serum) mit den Ergebnissen der Nitroprussid-Urinteststreifen-Untersuchung, die auf die Ketonkörper AcAc und Aceton testet. Als diagnostischer Grenzwert wurde der zuvor in dieser Studie ermittelte β HB-Wert von 2 mmol/l gewählt. Dieser β HB-Wert zeigte sowohl bei der Messung mittels Referenzmethode als auch mittels GlucoMen[®] LX PLUS den besten Kompromiss aus Sensitivität und Spezifität bezüglich der Diagnose einer DKA. Da der Nachweis von AcAc mittels Nitroprussid-Urinteststreifen ab einer Konzentration von 0,5–1,0 mmol/l möglich ist (COMSTOCK & GARBER, 1990), sollte bei einem β HB-Wert von 2 mmol/l eine messbare AcAc-Konzentration im Urin

vorliegen, um als gleichwertiges Diagnostikum eingesetzt werden zu können. In humanmedizinischen Studien von Diabetikern konnte gezeigt werden, dass bei einem Anstieg der β HB-Konzentration im Blut von 0,1–0,2 auf 1–1,2 mmol/l ein Nachweis von Ketonkörpern im Urin möglich war (ATTIA et al., 1998; GUERCI et al., 1999; LAFFEL, 2000). Die Nierenschwelle für Ketonkörper scheint bei Katzen niedrig zu sein, und beim Vorliegen einer Hyperketonämie können Ketonkörper schnell im Urin nachgewiesen werden (FELDMAN & NELSON, 2004). Dagegen vermuteten ZEUGSWETTER und PAGITZ (2009) aufgrund ihrer Ergebnisse, dass eine hohe AcAc-Konzentration von 4 mmol/l im Blut gegeben sein muss, damit die Urinteststreifen-Untersuchung positiv ausfällt.

Die vorliegenden Ergebnisse einer Vierfeldertafel zeigten, dass die quantitative β HB-Messung aus Blutproben dem semiquantitativen Nachweis von AcAc und Aceton aus Urin überlegen ist. In einigen Fällen (28,6 %) konnten trotz mittels GlucoMen® LX PLUS gemessener erhöhter β HB-Konzentration im Blut (3,2 mmol/l; 3,1 mmol/l; 2,2 mmol/l; 2 mmol/l; 1,9 mmol/l; 1,4 mmol/l; 1,3 mmol/l (3 Patienten); 1,1 mmol/l) keine Ketonkörper im Urin nachgewiesen werden. In 4 Fällen waren nur Spuren von Ketonkörpern in der Urinteststreifen-Untersuchung nachweisbar, während die Messung mittels GlucoMen® LX PLUS einen β HB-Wert von 2,6; 2,7; 4,9 und 5,3 mmol/l ergab. Beim Vergleich der Messergebnisse der Referenzmethode mit den Ergebnissen der Urinteststreifen-Untersuchung ergab sich bei 2 Patienten (11,1 %) ein negatives Urinergebnis, obwohl deutlich erhöhte β HB-Konzentrationen im Blut vorlagen (2,2 mmol/l; 5 mmol/l).

Die Ergebnisse des Patientengutes 3 (Tabelle 21 und 23), das beim Vergleich der Ergebnisse der β HB-Messung mittels GlucoMen® LX PLUS und Referenzmethode mit den Ergebnissen der AcAc-Messung aus Urin mittels Nitroprussid-Teststreifen untersucht wurde, geben eine Übersicht der Nitroprussid-Teststreifen-Untersuchung der DKA-Patienten. Im Patientengut, dessen Proben mit der Referenzmethode gemessen wurden, zeigte 1 von 8 (12,5 %) DKA-Patienten ein negatives Urinteststreifen-Ergebnis. Die übrigen 7 Patienten (87,5%) hatten ein positives Ergebnis im Urinteststreifen (1+ bis 3+). Der gemessene β HB-Konzentrationsbereich lag bei $10,2 \pm 5,5$ mmol/l (MW und SD). Die Ergebnisse der Patienten, die für den Vergleich mit dem GlucoMen® LX PLUS verwendet wurden, zeigten bei 3 (18,8 %) DKA-Patienten ein negatives Urinteststreifen-Ergebnis. Die übrigen 13 Tiere (81,3 %) hatten ein positives

Ergebnis im Urinteststreifentest (1+ bis 3+). Der gemessene β HB-Konzentrationsbereich lag bei $4,6 \pm 2,1$ mmol/l (MW und SD). In dieser Betrachtung schneidet der Nitroprussid-Urinteststreifen besonders im Vergleich mit der Referenzmethode gut ab. Hier ist jedoch die geringe Patientenzahl mit durchschnittlich sehr hohen β HB-Werten in der Gruppe der Referenzmessung zu berücksichtigen.

Zur Überprüfung, ob beide Testverfahren gleichwertig zur Diagnose einer DKA eingesetzt werden können, wurde aufgrund der geringen Stichprobenmenge der exakte Fisher-Test gewählt. Sowohl für den Vergleich der Nitroprussid-Urinteststreifen-Untersuchung mit der Referenzmethode (β HB-Konzentration aus Serum) ($p = 0,022$) als auch für den Vergleich zwischen den Urinteststreifen-Ergebnissen und den β HB-Messwerten des GlucoMen[®] LX PLUS (β HB-Konzentration aus venösem Vollblut) ($p = 0,001$) konnten p -Werte $< 0,05$ berechnet werden. Damit können die Methoden nicht als gleichwertig hinsichtlich ihrer Fähigkeit, eine DKA zu diagnostizieren, angesehen werden. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen human- und veterinärmedizinischer Studien, die zeigten, dass die Messung der β HB-Konzentration aus Blutproben zur Diagnose einer DKA oder zur Beurteilung der glykämischen Kontrolle eines diabetischen Patienten sensitiver ist als die semiquantitative Bestimmung von AcAc aus Urinproben (MACGILLIVRAY et al., 1982; LAFFEL, 2000; TABOULET et al., 2007; DI TOMMASO et al., 2009; ZEUGSWETTER et al., 2010).

Die Nitroprussid-Urinteststreifen werden in der Veterinärmedizin immer noch standardmäßig zur DKA-Diagnose verwendet (BRADY et al., 2003; FELDMAN & NELSON, 2004; ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009), obwohl sie nachgewiesenermaßen viele Nachteile gegenüber der Bestimmung von Serum- β HB haben (LAFFEL, 1999; SACKS et al., 2011) und in der Humanmedizin mittlerweile ausschließlich die quantitative β HB-Messung aus Blut empfohlen wird (GOLDSTEIN et al., 2004; SACKS et al., 2011).

Falsch negative Ergebnisse aufgrund von abgelaufenen Teststreifen konnten durch regelmäßige Kontrollen in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden. Der Ausschluss von nicht reaktiven Teststreifen war jedoch nicht möglich. Ein begleitender Harnwegsinfekt, der durch den mikrobiellen Abbau von Ketonkörpern zu einem negativen Ergebnis führen kann (OSBORNE et al., 1999; SACKS et al., 2011), konnte in dieser Studie bei keinem der Patienten mittels

bakterieller Kultur aus dem durch Zystozentese gewonnenen Urin nachgewiesen werden.

Auch die Nierenfunktion ist ein Faktor, der bei der Verwendung von Urinteststreifen bedacht werden sollte, da die Exkretion von Ketonkörpern von der GFR abhängig ist (COMSTOCK & GARBER, 1990; FELDMAN & NELSON, 2004), und eine Nierenfunktionsstörung zu verminderter Exkretion und nicht verlässlichen Ergebnissen führen kann (BRADY et al., 2003). In der Humanmedizin konnte gezeigt werden, dass die GFR bei Patienten mit DKA erniedrigt ist und sich bei manchen Patienten sogar erst nach einigen Wochen wieder normalisiert (BERNSTEIN et al., 1952; ADROGUE et al., 1984). Da in der vorliegenden Studie viele der Patienten hochgradig dehydriert waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der damit einhergehenden Beeinflussung der GFR eine verminderte Ketonkörperausscheidung erfolgte und die Urinteststreifen-Untersuchung aus diesem Grund bei einigen Patienten negativ ausfiel.

Eine weitere Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse der Urinteststreifen-Untersuchung und der Ergebnisse des GlucoMen[®] LX PLUS und der Referenzmethode kann im veränderten β HB-AcAc-Verhältnis liegen. Aufgrund des veränderten Redoxpotentials in den Mitochondrien steigt das β HB-AcAc-Verhältnis bei einer DKA auf bis zu durchschnittlich 3 : 1 (bis 10 : 1) an. (MARLISS et al., 1970; STEPHENS et al., 1971; LAFFEL, 1999; UMPIERREZ et al., 2000). In diesem Fall kann der Urinteststreifen, der nur AcAc oder Aceton nachweist, das tatsächliche Ausmaß der Hyperketonämie weder bei Menschen, noch bei Katzen erfassen (LAFFEL, 1999) (HOENIG et al., 2008; ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009; ZEUGSWETTER et al., 2010; WEINGART et al., 2012a).

Ein zusätzliches Problem bei Verwendung der Urinteststreifen kann bei Dehydratation der Patienten auch die Probenentnahme an sich darstellen (BRADY et al., 2003; ZEUGSWETTER & PAGITZ, 2009), da aufgrund mangelnden Urinvolumens auch eine sonographiegesteuerte Zystozentese nicht oder nur schwer durchführbar ist. In der vorliegenden Studie war dies bei einem der Patienten (1 von 21) der Fall.

Wie bereits erwähnt, kann die Untersuchung der β HB-Konzentration neben der

Durchführung eines Blutglukosetagesprofils zusätzliche Informationen über die aktuelle metabolische Stoffwechselsituation und glykämische Kontrolle eines diabetischen Patienten liefern. Die heutzutage für Humanpatienten von der American Diabetes Association und anderen Experten empfohlene Messung von β HB (GOLDSTEIN et al., 2004; LAFFEL et al., 2006) kann auch dem Besitzer einer diabetischen Katze eine bessere Einschätzung einer persistierenden Hyperglykämie ermöglichen, da β HB ein guter Indikator der aktuellen metabolischen Situation ist und die Tendenz zu einer nahen Entgleisung des DM anzeigt (PRISCO et al., 2006). Besonders in den Fällen, in denen die diabetische Katze an einer Begleiterkrankung leidet, steigt das Risiko der Entgleisung des Stoffwechsels mit Entwicklung einer DKA an (CRENSHAW & PETERSON, 1996; BRUSKIEWICZ et al., 1997) und erfordert eine engmaschige Kontrolle des Tieres. Voraussetzung für die Nutzung eines Ketonometers durch den Besitzer ist die Richtigkeit der β HB-Werte bei der Messung aus Kapillarblut, welche im Rahmen dieser Studie untersucht und bereits diskutiert wurde.

Zuletzt soll auf die Limitationen dieser Studie eingegangen werden. Diese sind vor allem in der relativ niedrigen Patientenzahl zu sehen. Da es sich um eine prospektive klinische Studie handelte, war die Anzahl der Studientiere abhängig vom Patientenaufkommen in der Klinik. Die Validierung des GlucoMen[®] LX PLUS erfolgte aufgrund von Mehrfachmessungen auf der Basis von 68 Probenpaaren (Vollblut und Serum). Bei anderen Studien zur Validierung von portablen Ketonkörpermessgeräten für den Einsatz bei Katzen wurden vergleichbare Probenzahlen verwendet (n = 43; n = 51) (WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012). Bei der Erstellung der ROC-Kurve zur Ermittlung von β HB-Cut-off-Werten wurden zusätzlich retrospektiv Daten von Diabetikern, bei denen die β HB-Konzentration mittels GlucoMen[®] LX PLUS bestimmt wurde, ausgewertet und in die Untersuchung aufgenommen. Die Erstellung der Kurve erfolgte im Falle der Untersuchung der Referenzmethode anhand von 18 (Cut-off-Wert DKA-Diagnose) und 34 (Cut-off-Wert DM-Einstellung) β HB-Werten. Im Falle der Untersuchung des GlucoMen[®] LX PLUS konnten aufgrund der retrospektiven Daten 43 (Cut-off-Wert DKA-Diagnose) und 65 (Cut-off-Wert DM-Einstellung) β HB-Werte herangezogen werden. Auch wenn grundsätzlich eine hohe Probenanzahl für eine ROC-Analyse zu empfehlen ist, nennt die Literatur keine Mindestprobenanzahl (ZWEIG & CAMPBELL, 1993;

FAWCETT, 2006; HANCZAR et al., 2010). Selbst bei der Verwendung von 50–200 Patienten kann es zu ungenauen Ergebnissen kommen (HANCZAR et al., 2010). Andere Forscher finden, dass bereits mit Gruppen aus je 10 Patienten eine Aussage getroffen werden kann (FAWCETT, 2006). Daher können die Ergebnisse der vorliegenden Studie trotz der geringen Probenanzahl als valide angesehen werden. Gerade bei der ROC-Analyse gilt es zu berücksichtigen, dass die Diagnosestellung einer DKA immer mit einem POC-Test, also einem portablen Ketonometer, erfolgt, da ein solches Ergebnis sofort zur Verfügung stehen muss. Für die ROC-Analyse mittels GlucoMen® LX PLUS wurde eine ausreichende Probenanzahl analysiert.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse, besonders bezüglich der ROC-Analysen der Referenzmethode zur Ermittlung der Cut-off-Werte sowie bei der Validierung der Messung aus kapillären und EDTA-Blutproben mittels GlucoMen® LX PLUS sind weitere Untersuchungen mit höheren Probenzahlen unterschiedlich hoher β HB-Konzentration zu empfehlen. Die geringe Probenanzahl bei den kapillären und den EDTA-Blutproben ergibt sich aus dem Umstand, dass es sich bei den Katzen zum Teil um sehr kritische Patienten handelte, bei denen im Rahmen der Therapie laufend sowohl venöse als auch kapilläre Blutentnahmen durchgeführt werden mussten. Daher konnte nicht jede Messung für diese Studie durchgeführt werden. Im Interesse der Patienten wurde in vielen Fällen auf die Messungen verzichtet. Insgesamt sind die meisten Ergebnisse dieser Studie im Einklang mit denen anderer Validierungsstudien (WEINGART et al., 2012b; ZEUGSWETTER & REBUZZI, 2012).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der GlucoMen® LX PLUS für die Diagnose einer DKA bei Katzen geeignet ist. Zur Therapiekontrolle einer DKA kann das Gerät allerdings erst eingesetzt werden, wenn der β HB-Konzentrationsbereich von 2,5 mmol/l unterschritten wird. Kapillarblut zeigte für das Heimmonitoring diabetischer Katzen mit einem relevanten β HB-Konzentrationsbereich bis 2,5 mmol/l eine sehr geringe Streuung zur Referenzmethode und erlaubt die Verwendung des Gerätes durch den Tierbesitzer im Rahmen einer engmaschigen Kontrolle zu Hause. Die Verwendung von EDTA-Blutproben ist aufgrund der starken Abweichungen gerade im hohen β HB-Konzentrationsbereich nicht zu empfehlen. Der mögliche Einfluss einer hohen Bilirubinkonzentration sollte bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet

werden. Die Messung von β HB aus Vollblut mit dem GlucoMen® LX PLUS kann einen wertvollen Beitrag zur Diagnose einer DKA liefern und sollte die aktuell noch standardmäßig verwendete, jedoch fehleranfällige Ketonkörperbestimmung aus Urin mittels Nitroprussid-Urinteststreifen ersetzen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Studie wurde das für die Humanmedizin entwickelte portable Glukometer und Ketonometer GlucoMen® LX PLUS für den Einsatz bei Katzen zur Messung des Gehalts an β -Hydroxybutyrat (β HB) im Blut zur Diagnostik einer diabetischen Ketoazidose (DKA) validiert. Dies erfolgte unter Berücksichtigung möglicher Einflüsse anderer Blutparameter. Dieses Gerät war für diese Indikation interessant, da es nur ein geringes Probenvolumen (0,8 μ l) benötigt und gleichzeitig für die Blutglukosemessung bei Katzen verwendet werden kann (GEIST, 2014). Zur Validierung des Geräts wurde ein Vergleich der Ergebnisse des GlucoMen® LX PLUS aus venösem Vollblut mit und ohne Antikoagulans sowie aus Kapillarblut mit den Messergebnissen einer standardisierten spektrophotometrischen Referenzmethode aus Serum vorgenommen.

Weiterhin erfolgte in der vorliegenden Untersuchung die Ermittlung von β HB-Cut-off-Werten zur Diagnose einer DKA und zur Beurteilung eines gut oder schlecht eingestellten Diabetes mellitus (DM). Zusätzlich wurde ein Vergleich der Ergebnisse der Ketonkörpermessung mittels des GlucoMen® LX PLUS und den Ergebnissen der Referenzmethode aus venösem Vollblut und Serum mit den Ergebnissen der Ketonkörperbestimmung mittels Nitroprussid-Teststreifen-Untersuchung aus Urin durchgeführt.

Der GlucoMen® LX PLUS lieferte im Vergleich mit der spektrophotometrischen Referenzmessung aus Serum akzeptable Messwerte. Sowohl die Messung aus venösem Vollblut als auch aus Kapillarblut zeigte zufriedenstellende Ergebnisse (Vollblut venös: -0,3 mmol/l (Bias); 0,6 mmol/l (Standardabweichung); -1,4–0,9 mmol/l (Übereinstimmungsgrenzen); Kapillarblut: 0,1 mmol/l (Bias); 0,8 mmol/l (Standardabweichung); -1,5–1,8 mmol/l (Übereinstimmungsgrenzen)). Im relevanten β HB-Konzentrationsbereich bis 2,5 mmol/l zeigte die Messung aus venösem Vollblut und Kapillarblut eine sehr gute Übereinstimmung mit der Referenzmessung (venöses Vollblut: -0,1 mmol/l (Bias); 0,2 mmol/l (Standardabweichung); -0,5–0,3 mmol/l (Übereinstimmungsgrenzen); Kapillarblut: 0 mmol/l (Bias); 0,4 mmol/l (Standardabweichung); -0,8–0,8 mmol/l (Übereinstimmungsgrenzen)). Bei höheren β HB-Konzentrationen wurden die

Messungen des Gerätes unzuverlässig. Die Verwendung von EDTA-Blut (EDTA: Ethylendiamintetraacetat) kann aufgrund der stärkeren Abweichungen von der Referenzmethode im gesamten β HB-Messbereich (EDTA-Blut: -0,5 mmol/l (Bias); 1,0 mmol/l (Standardabweichung); -2,4–1,5 mmol/l (Übereinstimmungsgrenzen)) nicht empfohlen werden.

Die Ermittlung von β HB-Cut-off-Werten zur Diagnose einer DKA für die Referenzmethode und den GlucoMen® LX PLUS ergab jeweils einen β HB-Wert von ≥ 2 mmol/l. Die Ermittlung von entsprechenden Cut-off-Werten zur Differenzierung eines gut von einem schlecht eingestellten DM ergab für die Referenzmethode einen Wert von $> 0,2$ mmol/l und für den GlucoMen® LX PLUS einen Wert von $> 0,3$ mmol/l.

Bei der Untersuchung des Einflusses anderer Blutparameter auf die Richtigkeit der Messwerte des GlucoMen® LX PLUS und der Referenzmethode konnte der Einfluss der Bilirubinkonzentration nachgewiesen werden. Dies sollte bei der Interpretation der β HB-Messergebnisse berücksichtigt werden.

Aufgrund der zuverlässigen Messung im niedrigen und mittleren β -HB-Konzentrationsbereich kann der GlucoMen® LX PLUS einen sinnvollen Beitrag sowohl in der Diagnose der DKA als auch zur therapeutischen Einstellung von diabetischen Katzen leisten. Die Therapiekontrolle einer DKA mithilfe des Gerätes ist nur für β HB-Werte $\leq 2,5$ mmol/l möglich, da das Gerät nur unterhalb dieses Werts zuverlässig korrekte Werte anzeigt. Kapillarblut kann im Rahmen des Heimmonitorings verwendet werden, da die Messung im β HB-Konzentrationsbereich $\leq 2,5$ mmol/l valide Werte angibt. Dem Tierbesitzer wird damit ermöglicht bereits geringe Veränderungen zu erkennen und entsprechend zu handeln.

Nitroprussid-Urinteststreifen zur Erfassung der Urinketonkörperkonzentration sollten aufgrund ihrer Unzuverlässigkeit und der potenziellen Fehlerquellen nicht mehr routinemäßig in der tierärztlichen Diagnostik verwendet werden. Zudem ist nicht bei allen Patienten aufgrund der schlechten Kreislaufsituation und geringen Urinproduktion die Uringewinnung möglich.

VII. SUMMARY

The portable glucometer and ketone meter GlucoMen[®] LX PLUS was validated in this study for measuring blood β -hydroxybutyrate concentrations in cats. Special attention was paid to any possible interference of values due to other blood parameters. Validation of this device is of great clinical interest as only a small blood volume (0,8 μ l) is necessary and the device has already been validated for measuring blood glucose concentration in cats (GEIST, 2014).

In addition, cut off values were established for the definition of a diabetic ketoacidosis and for the differentiation between a well or poorly controlled diabetic cat.

Furthermore, the results of the β -hydroxybutyrate measurements by the GlucoMen[®] LX PLUS and reference method from blood samples were compared to the ketone body measurements from urine samples measured by urinary dip stick.

Valid and precise measurements were obtained by the GlucoMen[®] LX PLUS in the diagnostic relevant range of up to 2.5 mmol/l compared with the enzymatic spectrophotometric reference measurements taken from serum. Venous whole blood, as well as capillary blood samples, can be used (venous whole blood: -0.3 mmol/l (bias); 0.6 mmol/l (standard deviation); -1.4–0.9 mmol/l (limits of agreement); capillary blood: 0.1 mmol/l (bias); 0.8 mmol/l (standard deviation); -1.5–1.8 mmol/l (limits of agreement)). Of all tested samples (venous whole blood, capillary blood and ethylenediaminetetraacetate blood), capillary blood was found to have the smallest bias in the entire concentration ranges examined. However its limits of agreement were a little wider compared to venous whole blood. In the clinically relevant range up to 2.5 mmol/l the measurements obtained from venous whole blood showed the best agreement with the reference measurement (-0.1 mmol/l (bias); 0.2 mmol/l (standard deviation); -0.5–0.3 mmol/l (limits of agreement)). With increasing β -hydroxybutyrate concentrations (> 2.5 mmol/l) the results tended to get more unreliable. Therefore ethylenediaminetetraacetate samples should not be used due to their higher bias compared to the reference method (ethylenediaminetetraacetate blood: -0.5 mmol/l (bias); 1.0 mmol/l (standard deviation); -2.4–1.5 mmol/l (limits of agreement)).

A cut off value of ≥ 2 mmol/l was calculated for the diagnosis of diabetic ketoacidosis for the GlucoMen[®] LX PLUS and for the reference method. Cut off values of 0.3 mmol/l were calculated for the GlucoMen[®] LX PLUS and 0.2 mmol/l for the reference method to differentiate a well-controlled diabetic cat from a poorly controlled one.

Bilirubin was the only blood parameter that influenced β -hydroxybutyrate concentrations using both methods (GlucoMen[®] LX PLUS and the reference method) and this should be kept in mind when interpreting test results.

Due to its valid and reliable test results in the low and medium β -hydroxybutyrate concentration range, the device GlucoMen[®] LX PLUS can be used for the diagnosis of a diabetic ketoacidosis in cats. In addition, regulation of a diabetic cat can be assessed – especially in those with uncontrolled hyperglycemia. Overall, as capillary blood samples led to valid test results, this device can be used by owners to monitor β -hydroxybutyrate concentrations at home. But the variance of measurements for β -hydroxybutyrate obtained from capillary blood samples in the range ≤ 2.5 mmol/l should be kept in mind when interpreting the results.

Due to the wider bias with increasing β -hydroxybutyrate concentrations the GlucoMen[®] LX PLUS cannot be used to assess response to treatment in a patient with diabetic ketoacidosis in the initial phase. And the GlucoMen[®] LX PLUS cannot replace other currently used diagnostic tools such as blood gas analysis, blood glucose and electrolyte measurements, but it can be used when β -hydroxybutyrate concentrations have dropped below 2.5 mmol/l.

Urinary dip sticks for measuring urinary ketone concentrations were tested as being unreliable for measuring ketones, and are potential sources of errors and should not be used anymore. Specifically, in the relevant diagnostic cut off range of blood- β -hydroxybutyrate concentrations up to 2 mmol/l the dip sticks frequently tested negative. In addition, obtaining a urinary sample is not possible in all cats with diabetic ketosis or diabetic ketoacidosis due to their poor circulation and low urinary flow rate. Instead of using the urinary dip stick method β -hydroxybutyrate concentrations from venous whole blood or serum should be measured with the GlucoMen[®] LX PLUS or the reference method.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbott Diabetes Care Inc. (2006) Clinical evaluation of a faster, smaller sample volume blood β -ketone test strip, Alameda, CA. 1-12

Adroge HJ, Eknoyan G, Suki WK. Diabetic ketoacidosis: role of the kidney in the acid-base homeostasis re-evaluated. *Kidney Int* 1984; 25: 591-8.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382: 250-2.

Alberti KG, Hockaday TD. Diabetic coma: Serum growth hormone before and during treatment. *Diabetologia* 1973; 9: 13-9.

Alberti KG. Role of glucagon and other hormones in development of diabetic ketoacidosis. *Lancet* 1975; 1: 1307-11.

Arner P, Kriegholm E, Engfeldt P, Bolinder J. Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *J Clin Invest* 1990; 85: 893-8.

Aroch I, Shechter-Polak M, Segev G. A retrospective study of serum beta-hydroxybutyric acid in 215 ill cats: clinical signs, laboratory findings and diagnoses. *Vet J* 2012; 191: 240-5.

Arora S, Henderson SO, Long T, Menchine M. Diagnostic accuracy of point-of-care testing for diabetic ketoacidosis at emergency-department triage: beta-hydroxybutyrate versus the urine dipstick. *Diabetes Care* 2011; 34: 852-4.

Attia N, Jones TW, Holcombe J, Tamborlane WV. Comparison of human regular and lispro insulins after interruption of continuous subcutaneous insulin infusion and in the treatment of acutely decompensated iddm. *Diabetes Care* 1998; 21: 817-21.

Avogaro A, Cryer PE, Bier DM. Epinephrine's ketogenic effect in humans is mediated principally by lipolysis. *Am J Physiol* 1992; 263: E250-60.

Avogaro A, Gnudi L, Valerio A, Maran A, Miola M, Opportuno A, Tiengo A, Bier DM. Effects of different plasma glucose concentrations on lipolytic and ketogenic responsiveness to epinephrine in type I (insulin-dependent) diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 845-50.

Balasse EO, Havel RJ. Evidence for an effect of insulin on the peripheral utilization of ketone bodies in dogs. *J Clin Invest* 1971; 50: 801-13.

Balasse EO, Neef MA. Inhibition of ketogenesis by ketone bodies in fasting humans. *Metabolism* 1975; 24: 999-1007.

Balasse EO, Fery F. Ketone body production and disposal: effects of fasting, diabetes, and exercise. *Diabetes Metab Rev* 1989; 5: 247-70.

Barsanti JA. Urinary disorders. In: *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*, 5th edn. Willard MD, Tvedten H, eds. St. Louis: Elsevier Health Sciences 2011: 130-49.

Bates MW, Krebs HA, Williamson DH. Turnover rates of ketone bodies in normal, starved and alloxan-diabetic rats. *Biochem J* 1968; 110: 655-61.

Beatty CH, Marco A, Peterson RD, Bocek RM, West ES. Acetoacetic acid metabolism by skeletal muscle fibers from control and diabetic rats. *J Biol Chem* 1960; 235: 2774-7.

Beisel WR, Sawyer WD, Ryll ED, Crozier D. Metabolic effects of intracellular infections in man. *Ann Intern Med* 1967; 67: 744-79.

Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL. Der Fettsäurestoffwechsel. In: Stryer Biochemie, 7th edn Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2014: 645-78.

Bernstein LM, Foley EF, Hoffman WS. Renal function during and after diabetic coma. *J Clin Invest* 1952; 31: 711-6.

Besson C, Verwaerde P, Bret-Bennis L, Priymenko N. Metabolic effects of denutrition in dog and cat. *Rev Med Vet* 2006; 157: 285-92.

Biourge V, Groff JM, Morris JG, Rogers QR. Long-term voluntary fasting in adult obese cats: nitrogen balance, plasma amino acid concentrations and urinary orotic acid excretion. *J Nutr* 1994a; 124: 2680s-2s.

Biourge V, Groff JM, Fisher C, Bee D, Morris JG, Rogers QR. Nitrogen balance, plasma free amino acid concentrations and urinary orotic acid excretion during long-term fasting in cats. *J Nutr* 1994b; 124: 1094-103.

Bjorntorp P. Effect of ketone bodies on lipolysis in adipose tissue in vitro. *J Lipid Res* 1966a; 7: 621-6.

Bjorntorp P. Inhibition of lipase activation in rat epididymal fat pads in vitro. *Am J Physiol* 1966b; 210: 733-6.

Blanchard G, Paragon BM, Milliat F, Lutton C. Dietary L-carnitine supplementation in obese cats alters carnitine metabolism and decreases ketosis during fasting and induced hepatic lipidosis. *J Nutr* 2002; 132: 204-10.

Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999; 8: 135-60.

Bland M. The analysis of cross-tabulations. In: *An introduction to medical statistics*, 4th edn New York: OUP Oxford 2015: 193-212.

Brady MA, Dennis JS, Wagner-Mann C. Evaluating the use of plasma hematocrit samples to detect ketones utilizing urine dipstick colorimetric methodology in diabetic dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2003; 13: 1-6.

Bratusch-Marrain PR, Smith D, DeFronzo RA. The effect of growth hormone on glucose metabolism and insulin secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55: 973-82.

Bruskiewicz KA, Nelson RW, Feldman EC, Griffey SM. Diabetic ketosis and ketoacidosis in cats: 42 cases (1980-1995). *J Am Vet Med Assoc* 1997; 211: 188-92.

Byrne HA, Tieszen KL, Hollis S, Dornan TL, New JP. Evaluation of an electrochemical sensor for measuring blood ketones. *Diabetes Care* 2000; 23: 500-3.

Cahill GF, Owen OE. Starvation and survival. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1968; 79: 13-20.

Cantwell BMJ, Pooley J, Harris AL. False-positive ketonuria during ifosfamide and mesna therapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 229-30.

Casella M, Wess G, Reusch CE. Measurement of capillary blood glucose concentrations by pet owners: a new tool in the management of diabetes mellitus. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002; 38: 239-45.

Center SA, Crawford MA, Guida L, Erb HN, King J. A retrospective study of 77 cats with severe hepatic lipidosis: 1975–1990. *J Vet Intern Med* 1993; 7: 349-59.

Chamberlin PE, Furgason WH, Hall VE. Ketone body excretion in the cat: sex difference, and influence of diet, fasting, castration, and male hormone administration. *J Biol Chem* 1937; 121: 599-606.

Charles RA, Bee YM, Eng PH, Goh SY. Point-of-care blood ketone testing: screening for diabetic ketoacidosis at the emergency department. *Singapore Med J* 2007; 48: 986-9.

Comstock JP, Garber AJ. Ketonuria. In: *Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations*, 3rd edn. Walker HK, Hall WD, Hurst JW, eds. Boston: Butterworths 1990: 658-61.

Conn AR, Fell DI, Steele RD. Characterization of alpha-keto acid transport across blood-brain barrier in rats. *Am J Physiol* 1983; 245: E253-60.

Connally HE. Critical care monitoring considerations for the diabetic patient. *Clin Tech Small Anim Pract* 2002; 17: 73-8.

Connolly CC, Steiner KE, Stevenson RW, Neal DW, Williams PE, Alberti KG, Cherrington AD. Regulation of lipolysis and ketogenesis by norepinephrine in conscious dogs. *Am J Physiol* 1991; 261: E466-72.

Crenshaw KL, Peterson ME. Pretreatment clinical and laboratory evaluation of cats with diabetes mellitus: 104 cases (1992-1994). *J Am Vet Med Assoc* 1996; 209: 943-9.

Csako G. False-positive results for ketone with the drug mesna and other free-sulfhydryl compounds. *Clin Chem* 1987a; 33: 289-92.

Csako G. False-positive urinalysis results with acidified urine. *Clin Chem* 1987b; 33: 2321-3.

Csako G. Causes, consequences, and recognition of false-positive reactions for ketones. *Clin Chem* 1990; 36: 1388-9.

Cuthbert C, Alberti KG. Combined enzymatic assays for 3-hydroxybutyrate and lactate: end-point and kinetic methods. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 179-86.

Daves M, Cemin R, Fattor B, Cosio G, Salvagno GL, Rizza F, Lippi G. Evaluation of hematocrit bias on blood glucose measurement with six different portable glucose meters. *Biochem Med (Zagreb)* 2011; 21: 306-11.

Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *Bmj* 2004; 329: 168-9.

Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC. Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 1997; 272: 6823-6.

Di Tommaso M, Aste G, Rocconi F, Guglielmini C, Boari A. Evaluation of a portable meter to measure ketonemia and comparison with ketonuria for the diagnosis of canine diabetic ketoacidosis. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 466-71.

DiBartola SP. Metabolic disorders. In: *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice*, 4th. edn. DiBartola SP, ed. St. Louis: Elsevier Health Sciences 2011: 253-86.

Dobenecker B, Kienzle E, Sallmann HP, Fuhrmann H. Effect of diet on plasma triglycerides, cholesterol, beta-hydroxybutyrate and free fatty acids in cats. *J Nutr* 1998; 128: 2648s-50s.

Duarte R, Simoes DMN, Franchini ML, Marquezi ML, Ikesaki JH, Kogika MM. Accuracy of serum β -hydroxybutyrate measurements for the diagnosis of diabetic ketoacidosis in 116 Dogs. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 411-7.

Durocher LL, Hinchcliff KW, DiBartola SP, Johnson SE. Acid-base and hormonal abnormalities in dogs with naturally occurring diabetes mellitus. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232: 1310-20.

Elliott J, Syme HM, Reubens E, Markwell PJ. Assessment of acid-base status of cats with naturally occurring chronic renal failure. *J Small Anim Pract* 2003; 44: 65-70.

Evinger JV, Nelson RW. The clinical pharmacology of thyroid hormones in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 185: 314-6.

Fawcett T. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters* 2006;

27: 861-74.

Feldman EC, Nelson RW. Diabetic ketoacidosis. In: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3rd. edn. Nelson RW, ed. Saint Louis: Elsevier Science 2004: 580-612.

Fenselau A, Wallis K. Ketone body usage by mammals. Acetoacetate substrate inhibition of coa transferase from various rat tissues. *Life Sci* 1974; 15: 811-8.

Fery F, Balasse EO. Ketone body production and disposal in diabetic ketosis. A comparison with fasting ketosis. *Diabetes* 1985; 34: 326-32.

Fink G, Desrochers S, Des Rosiers C, Garneau M, David F, Daloze T, Landau BR, Brunengraber H. Pseudoketogenesis in the perfused rat heart. *J Biol Chem* 1988; 263: 18036-42.

Fleckman AM. Diabetic ketoacidosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1993; 22: 181-207.

Foster DW, McGarry JD. The metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 1983; 309: 159-69.

Fraser J, Fetter MC, Mast RL, Free AH. Studies with a simplified nitroprusside test for ketone bodies in urine, serum, plasma, and milk. *Clin Chim Acta* 1965; 11: 372-8.

Fredholm BB. Inhibition by β -hydroxybutyrate of lipolysis induced by sympathetic nerve activity in canine subcutaneous adipose tissue in situ. *Metabolism* 1972; 21: 125-31.

Fritzsche I, Buhrdel P, Melcher R, Bohme HJ. Stability of ketone bodies in serum in dependence on storage time and storage temperature. *Clin Lab* 2001; 47: 399-403.

Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 70: 243-51.

Fukao T, Mitchell G, Sass JO, Hori T, Orii K, Aoyama Y. Ketone body metabolism and its defects. *J Inherit Metab Dis* 2014; 37: 541-51.

Galvin RD, Harris JA, Johnson RE. Urinary excretion of beta-hydroxybutyrate and acetoacetate during experimental ketosis. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1968; 53: 181-93.

Garber AJ, Menzel PH, Boden G, Owen OE. Hepatic ketogenesis and gluconeogenesis in humans. *J Clin Invest* 1974; 54: 981-9.

Gardner IA, Greiner M. Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Vet Clin Pathol* 2006; 35: 8-17.

Geist S (2014). Validierung neuer portabler Blutglukosemessgeräte für den Einsatz bei Katzen [Dissertation]. In: Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität, München. 2014.

Gerich JE, Karam JH, Forsham PH. Stimulation of glucagon secretion by epinephrine in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 37: 479-81.

Gerich JE, Tsalikian E, Lorenzi M, Karam JH, Bier DM. Plasma glucagon and alanine responses to acute insulin deficiency in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 40: 526-9.

Gjedde A, Crone C. Induction processes in blood-brain transfer of ketone bodies during starvation. *Am J Physiol* 1975; 229: 1165-9.

Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JJ, Nathan DM, Peterson CM. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27 Suppl 1: S91-3.

Goodman MN, Larsen PR, Kaplan MM, Aoki TT, Young VR, Ruderman NB. Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. *Am J Physiol* 1980; 239: E277-E86.

Gordon-Smith EC, Hows JM, Ward L, Woods K, Dalton JIF. Mesna and false-positive results in ward testing for urinary ketones. *The Lancet* 1982; 319: 563.

Gorman L, Sharkey LC, Armstrong PJ, Little K, Rendahl A. Serum beta hydroxybutyrate concentrations in cats with chronic kidney disease, hyperthyroidism, or hepatic lipidosis. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 611-6.

Gostelow R, Forcada Y, Graves T, Church D, Niessen S. Systematic review of feline diabetic remission: separating fact from opinion. *Vet J* 2014; 202: 208-21.

Guerci B, Meyer L, Sallé A, Charrié A, Dousset B, Ziegler O, Drouin P. Comparison of metabolic deterioration between insulin analog and regular insulin after a 5-hour interruption of a continuous subcutaneous insulin infusion in type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2673-8.

Guerci B, Benichou M, Floriot M, Bohme P, Fougnot S, Franck P, Drouin P. Accuracy of an electrochemical sensor for measuring capillary blood ketones by fingerstick samples during metabolic deterioration after continuous subcutaneous insulin infusion interruption in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2003; 26: 1137-41.

Guerci B, Tubiana-Rufi N, Bauduceau B, Bresson R, Cuperlier A, Delcroix C, Durain D, Fermon C, Le Floch JP, Le Devehat C, Melki V, Monnier L, Mosnier-Pudar H, Taboulet P, Hanaire-Broutin H. Advantages to using capillary blood β -hydroxybutyrate determination for the detection and treatment of diabetic ketosis. *Diabetes Metab* 2005; 31: 401-6.

Ham MR, Okada P, White PC. Bedside ketone determination in diabetic children with hyperglycemia and ketosis in the acute care setting. *Pediatr Diabetes* 2004; 5: 39-43.

Hanczar B, Hua J, Sima C, Weinstein J, Bittner M, Dougherty ER. Small-sample precision of ROC-related estimates. *Bioinformatics* 2010; 26: 822-30.

Harris DC. Grundlagen der Spektralphotometrie, Anwendungen der Spektralphotometrie, Spektralphotometer. In: *Lehrbuch der quantitativen Analyse*, 8th edn. Werner G, Werner T, eds. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2014: 443-539.

Harris S, Ng R, Syed H, Hillson R. Near patient blood ketone measurements and their utility in predicting diabetic ketoacidosis. *Diabet Med* 2005; 22: 221-4.

Hawkins R, Biebuyck J. Ketone bodies are selectively used by individual brain regions. *Science* 1979; 205: 325-7.

Hawkins RA, Williamson DH, Krebs HA. Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem J* 1971; 122: 13-8.

Hellman DE, Senior B, Goodman HM. Anti-lipolytic effects of β -hydroxybutyrate. *Metabolism* 1969; 18: 906-15.

Henderson DW, Schlesinger DP. Use of a point-of-care beta-hydroxybutyrate sensor for detection of ketonemia in dogs. *Can Vet J* 2010; 51: 1000-2.

Hoening M, Dorfman M, Koenig A. Use of a hand-held meter for the measurement of blood beta-hydroxybutyrate in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2008; 18: 86-7.

Holcombe BJ, Hopkins AM, Heizer WD. False positive tests for urinary ketones. *N Engl J Med* 1994; 330: 578.

Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 365-93.

Ikeda T, Ohtani I, Fujiyama K, Hoshino T, Tanaka Y, Takeuchi T, Mashiba H. Uptake of beta-hydroxybutyrate in perfused hindquarter of starved and diabetic rats. *Metabolism* 1991; 40: 1287-91.

Janssen MJ, Hendrickx BH, Habets-van der Poel CD, van den Bergh JP, Haagen AA, Bakker JA. Accuracy of the precision(r) point-of-care ketone test examined by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (lc-ms/ms) in the same fingerstick sample. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 1781-4.

Kandel G, Aberman A. Selected developments in the understanding of diabetic ketoacidosis. *Can Med Assoc J* 1983; 128: 392-7.

Keller U, Gerber PP, Stauffacher W. Stimulatory effect of norepinephrine on ketogenesis in normal and insulin-deficient humans. *Am J Physiol* 1984; 247: E732-9.

Keller U, Lustenberger M, Stauffacher W. Effect of insulin on ketone body clearance studied by a ketone body "clamp" technique in normal man. *Diabetologia* 1988; 31: 24-9.

Kitabchi AE, Umpierrez GE, Murphy MB, Barrett EJ, Kreisberg RA, Malone JI, Wall BM. Management of hyperglycemic crises in patients with diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 131-53.

Klocker AA, Phelan H, Twigg SM, Craig ME. Blood beta-hydroxybutyrate vs. urine acetoacetate testing for the prevention and management of ketoacidosis in Type 1 diabetes: a systematic review. *Diabet Med* 2013; 30: 818-24.

Koch DD, Feldbruegge DH. Optimized kinetic method for automated determination of beta-hydroxybutyrate. *Clin Chem* 1987; 33: 1761-6.

Koeslag JH, Noakes TD, Sloan AW. Post-exercise ketosis. *J Physiol* 1980; 301: 79-90.

Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res* 2002; 43: 1585-94.

Kraus MS, Calvert CA, Jacobs GJ, Brown J. Feline diabetes mellitus: a

retrospective mortality study of 55 cats (1982-1994). *J Am Anim Hosp Assoc* 1997; 33: 107-11.

Krebs HA. The regulation of the release of ketone bodies by the liver. *Adv Enzyme Regul* 1966; 4: 339-53.

Kreisberg RA. Diabetic ketoacidosis: new concepts and trends in pathogenesis and treatment. *Ann Intern Med* 1978; 88: 681-95.

Kreisberg RA. Diabetic ketoacidosis. In: *Diabetes mellitus: therapy and practice*, 4th edn. Rifkin H, Porte D, eds. New York: Elsevier Science 1990: 591-603.

Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 1995; 270: 17513-20.

Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 1999; 15: 412-26.

Laffel L. Sick-day management in type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000; 29: 707-23.

Laffel LM, Wentzell K, Loughlin C, Tovar A, Moltz K, Brink S. Sick day management using blood 3-hydroxybutyrate (3-OHB) compared with urine ketone monitoring reduces hospital visits in young people with T1DM: a randomized clinical trial. *Diabet Med* 2006; 23: 278-84.

Legal E. Über eine neue Acetonreaction und deren Verwendbarkeit zur

Harnuntersuchung. Jahresbericht der Schlesischen Gesellschaft für vaterländische Kultur (Breslau) 1882: 89-99.

Li PK, Lee JT, MacGillivray MH, Schaefer PA, Siegel JH. Direct, fixed-time kinetic assays for beta-hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyzer or a computer-backed spectrophotometer. *Clin Chem* 1980; 26: 1713-7.

Lowe DM, Tubbs PK. Succinylation and inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase by succinyl-CoA and its possible relevance to the control of ketogenesis. *Biochem J* 1985; 232: 37-42.

Ludbrook J. Analysis of 2 x 2 tables of frequencies: matching test to experimental design. *Int J Epidemiol* 2008; 37: 1430-5.

Luzi L, Barrett EJ, Groop LC, Ferrannini E, DeFronzo RA. Metabolic effects of low-dose insulin therapy on glucose metabolism in diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 1988; 37: 1470-7.

MacGillivray MH, Li PK, Lee JT, Mills BJ, Voorhess ML, Putnam TI, Schaefer PA. Elevated plasma beta-hydroxybutyrate concentrations without ketonuria in healthy insulin-dependent diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 665-8.

Madison LL, Mebane D, Unger RH, Lochner A. The hypoglycemic action of ketones. II. evidence for a stimulatory feedback of ketones on the pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 1964; 43: 408-15.

Marliss EB, Ohman JL, Jr., Aoki TT, Kozak GP. Altered redox state obscuring ketoacidosis in diabetic patients with lactic acidosis. *N Engl J Med* 1970; 283:

978-80.

Martin GJ, Rand JS. Comparisons of different measurements for monitoring diabetic cats treated with porcine insulin zinc suspension. *Vet Rec* 2007; 161: 52-8.

McGarry J, Wright PH, Foster DW. Hormonal control of ketogenesis. Rapid activation of hepatic ketogenic capacity in fed rats by anti-insulin serum and glucagon. *J Clin Invest* 1975; 55: 1202-9.

McGarry JD, Foster DW. Ketogenesis and its regulation. *Am J Med* 1976; 61: 9-13.

McGarry JD, Robles-Valdes C, Foster DW. Glucagon and ketogenesis. *Metabolism* 1976; 25: 1387-91.

McGarry JD, Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev* 1989; 5: 271-84.

McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997; 244: 1-14.

McMurray CH, Blanchflower WJ, Rice DA. Automated kinetic method for D-3-hydroxybutyrate in plasma or serum. *Clin Chem* 1984; 30: 421-5.

Miles JM, Rizza RA, Haymond MW, Gerich JE. Effects of acute insulin deficiency on glucose and ketone body turnover in man: evidence for the primacy of overproduction of glucose and ketone bodies in the genesis of diabetic

ketoacidosis. *Diabetes* 1980; 29: 926-30.

Mitchell GA, Kassovska-Bratinova S, Boukaftane Y, Robert MF, Wang SP, Ashmarina L, Lambert M, Lapierre P, Potier E. Medical aspects of ketone body metabolism. *Clin Invest Med* 1995; 18: 193-216.

Moore JJ, Marcus M, Sax SM. Kinetic assay of beta-hydroxybutyrate in plasma with a cobas-bio centrifugal analyzer. *Clin Chem* 1982; 28: 702-3.

Muller WA, Faloon GR, Unger RH. The effect of experimental insulin deficiency on glucagon secretion. *J Clin Invest* 1971; 50: 1992-9.

Nair KS, Welle SL, Halliday D, Campbell RG. Effect of beta-hydroxybutyrate on whole-body leucine kinetics and fractional mixed skeletal muscle protein synthesis in humans. *J Clin Invest* 1988; 82: 198-205.

Naunheim R, Jang TJ, Banet G, Richmond A, McGill J. Point-of-care test identifies diabetic ketoacidosis at triage. *Acad Emerg Med* 2006; 13: 683-5.

Nelson DL, Cox MM. Abbau von Fettsäuren. In: *Lehninger Biochemie*, 4th edn Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2009: 856-83.

Nichols R, Crenshaw KL. Complications and concurrent disease associated with diabetic ketoacidosis and other severe forms of diabetes mellitus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995; 25: 617-24.

Noyes KJ, Crofton P, Bath LE, Holmes A, Stark L, Oxley CD, Kelnar CJ. Hydroxybutyrate near-patient testing to evaluate a new end-point for intravenous insulin therapy in the treatment of diabetic ketoacidosis in children. *Pediatr*

Diabetes 2007; 8: 150-6.

Okuda Y, Kawai K, Ohmori H, Yamashita K. Ketone body utilization and its metabolic effect in resting muscles of normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinol Jpn* 1991; 38: 245-51.

Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF, Jr. Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest* 1967; 46: 1589-95.

Owen OE, Felig P, Morgan AP, Wahren J, Cahill GF. Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* 1969; 48: 574-83.

Owen OE, Reichard GA, Jr., Markus H, Boden G, Mozzoli MA, Shuman CR. Rapid intravenous sodium acetoacetate infusion in man. Metabolic and kinetic responses. *J Clin Invest* 1973; 52: 2606-16.

Owen OE, Reichard GA, Jr. Ketone body metabolism in normal, obese and diabetic subjects. *Isr J Med Sci* 1975; 11: 560-70.

Owen OE. Ketone bodies as a fuel for the brain during starvation. *Biochem Mol Biol Educ* 2005; 33: 246-51.

Pancieria DL, Thomas CB, Eicker SW, Atkins CE. Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in cats: 333 cases (1980-1986). *J Am Vet Med Assoc* 1990; 197: 1504-8.

Pardridge WM. Blood-brain barrier transport of glucose, free fatty acids, and ketone bodies. In: *Fuel homeostasis and the nervous system*, 1991/01/01 edn. Vranic M, Efendic S, Hollenberg CH, eds. New York: Plenum Press 1991: 43-53.

Passing H, Bablok. 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* 1983; 21: 709-20.

Pazak HE, Bartges JW, Cornelius LC, Scott MA, Gross K, Huber TL. Characterization of serum lipoprotein profiles of healthy, adult cats and idiopathic feline hepatic lipidosis patients. *J Nutr* 1998; 128: 2747s-50s.

Poon R, Hinberg I. One-step elimination of interference of free-sulphydryl-containing drugs with chemstrip ketone readings. *Clin Chem* 1990; 36: 1527-8.

Poon R, Hinberg I, Peterson RG. N-acetylcysteine causes false-positive ketone results with urinary dipsticks. *Clin Chem* 1990; 36: 818-9.

Porte D, Jr., Graber AL, Kuzuya T, Williams RH. The effect of epinephrine on immunoreactive insulin levels in man. *J Clin Invest* 1966; 45: 228-36.

Porte D, Jr. A receptor mechanism for the inhibition of insulin release by epinephrine in man. *J Clin Invest* 1967; 46: 86-94.

Porter WH, Yao HH, Karounos DG. Laboratory and clinical evaluation of assays for beta-hydroxybutyrate. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 353-8.

Prahl A, Guptill L, Glickman NW, Tetrick M, Glickman LT. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in cats presented to veterinary teaching hospitals. *J Feline Med Surg* 2007; 9: 351-8.

Prisco F, Picardi A, Iafusco D, Lorini R, Minicucci L, Martinucci ME, Toni S, Cerutti F, Rabbone I, Buzzetti R, Crino A, Pozzilli P. Blood ketone bodies in patients with recent-onset type 1 diabetes (a multicenter study). *Pediatr Diabetes* 2006; 7: 223-8.

Quant PA, Tubbs PK, Brand MD. Treatment of rats with glucagon or mannoheptulose increases mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase activity and decreases succinyl-CoA content in liver. *Biochem J* 1989; 262: 159-64.

Quant PA, Tubbs PK, Brand MD. Glucagon activates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in vivo by decreasing the extent of succinylation of the enzyme. *Eur J Biochem* 1990; 187: 169-74.

Rafacho A, Ortsäter H, Nadal A, Quesada I. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. *J Endocrinol* 2014; 223: R49-R62.

Rand J. Current understanding of feline diabetes: Part 1, pathogenesis. *J Feline Med Surg* 1999; 1: 143-53.

Rand J. Feline diabetes mellitus. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology*, 4th edn. Mooney CT, Peterson M, eds. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association 2012: 133-47.

Rand JS, Marshall RD. Diabetes mellitus in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2005; 35: 211-24.

Roche Diagnostics (2011) *Compendium of urinalysis*. Urine test strips and

microscopy, Rotkreuz, Schweiz. 1-180

Rosenbloom AL, Malone JI. Recognition of impending ketoacidosis delayed by ketone reagent strip failure. *JAMA* 1978; 240: 2462-4.

Ruderman NB, Goodman MN. Inhibition of muscle acetoacetate utilization during diabetic ketoacidosis. *Am J Physiol* 1974; 226: 136-43.

Ruderman NB, Myers Jr. MG, Chipkin SR, Tornheim K. Hormone-fuel interrelationships: fed state, starvation, and diabetes mellitus. In: Joslin's diabetes mellitus 14th edn. Kahn CR, King GL, Moses AC, Weir GC, Jacobson AM, Smith RJ, eds. Boston: Lippincott Williams & Wilkins 2005: 127-44.

Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, Lernmark A, Metzger BE, Nathan DM. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2011; 57: e1-e47.

Sapir DG, Owen OE, Cheng JT, Ginsberg R, Boden G, Walker WG. The effect of carbohydrates on ammonium and ketoacid excretion during starvation. *J Clin Invest* 1972; 51: 2093-102.

Sapir DG, Owen OE. Renal conservation of ketone bodies during starvation. *Metabolism* 1975; 24: 23-33.

Schade DS, Eaton RP. The regulation of plasma ketone body concentration by counterregulatory hormones in man. *Diabetes* 1977; 26: 989-96.

Schade DS, Eaton RP. Pathogenesis of diabetic ketoacidosis: a reappraisal.

Diabetes Care 1979a; 2: 296-306.

Schade DS, Eaton R. Prevention of diabetic ketoacidosis. JAMA 1979b; 242: 2455-8.

Schwedt G. Molekülspektroskopische Analysemethoden. In: Taschenatlas der Analytik, 3rd edn. Schwedt G, ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KG 2007: 104-11.

Shamoon H, Hendler R, Sherwin RS. Synergistic interactions among antiinsulin hormones in the pathogenesis of stress hyperglycemia in humans. J Clin Endocrinol Metab 1981; 52: 1235-41.

Sherwin RS, Hendler RG, Felig P. Effect of ketone infusions on amino acid and nitrogen metabolism in man. J Clin Invest 1975; 55: 1382-90.

Sherwin RS, Hendler RG, Felig P. Effect of diabetes mellitus and insulin on the turnover and metabolic response to ketones in man. Diabetes 1976; 25: 776-84.

Sherwin RS, Shamoon H, Hendler R, Saccà L, Eigler N, Walesky M. Epinephrine and the regulation of glucose metabolism: Effect of diabetes and hormonal interactions. Metabolism 1980; 29: 1146-54.

Sieber-Ruckstuhl NS, Kley S, Tschuor F, Zini E, Ohlerth S, Boretti FS, Reusch CE. Remission of diabetes mellitus in cats with diabetic ketoacidosis. J Vet Intern Med 2008; 22: 1326-32.

Smith SW, Manini AF, Szekely T, Hoffman RS. Bedside detection of urine beta-hydroxybutyrate in diagnosing metabolic acidosis. Acad Emerg Med 2008; 15:

751-6.

Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001; 104: 531-43.

Stephens JM, Sulway MJ, Watkins PJ. Relationship of blood acetoacetate and 3-hydroxybutyrate in diabetes. *Diabetes* 1971; 20: 485-9.

Stockham SL, Scott MA. Urinary System. In: *Fundamentals of veterinary clinical pathology*, 2nd edn. Stockham SL, Scott MA, eds. Iowa: Wiley-Blackwell 2008: 415-94.

Stojanovic V, Ihle S. Role of beta-hydroxybutyric acid in diabetic ketoacidosis: a review. *Can Vet J* 2011; 52: 426-30.

Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1988; 240: 1285-93.

Taboulet P, Haas L, Porcher R, Manamani J, Fontaine JP, Feugeas JP, Gautier JF. Urinary acetoacetate or capillary beta-hydroxybutyrate for the diagnosis of ketoacidosis in the emergency department setting. *Eur J Emerg Med* 2004; 11: 251-8.

Taboulet P, Deconinck N, Thurel A, Haas L, Manamani J, Porcher R, Schmit C, Fontaine JP, Gautier JF. Correlation between urine ketones (acetoacetate) and capillary blood ketones (3-beta-hydroxybutyrate) in hyperglycaemic patients. *Diabetes Metab* 2007; 33: 135-9.

Tang Z, Lee JH, Louie RF, Kost GJ. Effects of different hematocrit levels on

glucose measurements with handheld meters for point-of-care testing. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1135-40.

Technical Committee ISO/TC 212 (2013) *International Standard ISO 15197:2013 In vitro diagnostic test systems-requirements for blood-glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus.*, Standardisation IO of edn. Beuth Verlag, Geneva, Switzerland, 2013. 1-46

Thompson MD, Taylor SM, Adams VJ, Waldner CL, Feldman EC. Comparison of glucose concentrations in blood samples obtained with a marginal ear vein nick technique versus from a peripheral vein in healthy cats and cats with diabetes mellitus. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 221: 389-92.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), (CVM) CfVM (2001) *Guidance for industry: bioanalytical method validation.* Food and Drug Administration, Rockville, MD: 2001. 1-22

Umpierrez GE, Watts NB, Phillips LS. Clinical utility of beta-hydroxybutyrate determined by reflectance meter in the management of diabetic ketoacidosis. *Diabetes Care* 1995; 18: 137-8.

Umpierrez GE, DiGirolamo M, Tuvlin JA, Isaacs SD, Bhoola SM, Kokko JP. Differences in metabolic and hormonal milieu in diabetic- and alcohol-induced ketoacidosis. *J Crit Care* 2000; 15: 52-9.

Van de Maele I, Rogier N, Daminet S. Retrospective study of owners' perception on home monitoring of blood glucose in diabetic dogs and cats. *Can Vet J* 2005; 46: 718-23.

Vanelli M, Chiari G, Capuano C, Iovane B, Bernardini A, Giacalone T. The direct measurement of 3-beta-hydroxy butyrate enhances the management of diabetic ketoacidosis in children and reduces time and costs of treatment. *Diabetes Nutr Metab* 2003; 16: 312-6.

Viar MJ, Wright RK, Pratt CB, Goren MP. Abstracts of meeting papers. *Clin Chem* 1987; 33: 880-1037.

Waldhäusl W, Kleinberger G, Korn A, Dudczak R, Bratusch-Marrain P, Nowotny P. Severe hyperglycemia: effects of rehydration on endocrine derangements and blood glucose concentration. *Diabetes* 1979; 28: 577-84.

Wallace TM, Matthews DR. Recent advances in the monitoring and management of diabetic ketoacidosis. *QJM* 2004; 97: 773-80.

Weingart C, Lotz F, Kohn B. Measurement of beta-hydroxybutyrate in cats with nonketotic diabetes mellitus, diabetic ketosis, and diabetic ketoacidosis. *J Vet Diagn Invest* 2012a; 24: 295-300.

Weingart C, Lotz F, Kohn B. Validation of a portable hand-held whole-blood ketone meter for use in cats. *Vet Clin Pathol* 2012b; 41: 114-8.

Wellion©Vet MedTrust Handelsges.m.b.H. Wellion©Vet Belua Messgerät. 2016: http://www.wellion.at/de/tiere-produkte/wellionvet_belua/hunde_katzen/belua_messgeraet/. 18.09.2016.

Wess G, Reusch C. Capillary blood sampling from the ear of dogs and cats and use of portable meters to measure glucose concentration. *J Small Anim Pract* 2000; 41: 60-6.

Wiggam MI, O'Kane MJ, Harper R, Atkinson AB, Hadden DR, Trimble ER, Bell PM. Treatment of diabetic ketoacidosis using normalization of blood 3-hydroxybutyrate concentration as the endpoint of emergency management. A randomized controlled study. *Diabetes Care* 1997; 20: 1347-52.

Wildenhoff KE. The renal excretion of acetoacetate and 3-hydroxybutyrate during absolute fasting. *Acta Med Scand* 1972; 192: 475-9.

Williamson DH, Mellanby J, Krebs HA. Enzymic determination of d(-)- β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. *Biochem J* 1962; 82: 90-6.

Williamson DH, Thornton PS. Ketone body production and metabolism in the fetus and neonate. In: *Fetal and neonatal physiology: fetus-physiology*, 4th edn. Polin RA, Fox WW, Abman SH, eds. Philadelphia: Elsevier/Saunders 2011: 487-96.

Wyckoff J, Abrahamson MJ. Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic state. In: *Joslin's diabetes mellitus*, 14th edn. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ, eds. Boston: Lippincott Williams & Wilkins 2005: 887-900.

Zeugswetter F, Pagitz M. Ketone measurements using dipstick methodology in cats with diabetes mellitus. *J Small Anim Pract* 2009; 50: 4-8.

Zeugswetter F, Handl S, Iben C, Schwendenwein I. Efficacy of plasma beta-hydroxybutyrate concentration as a marker for diabetes mellitus in acutely sick cats. *J Feline Med Surg* 2010; 12: 300-5.

Zeugswetter FK, Rebuzzi L. Point-of-care beta-hydroxybutyrate measurement for the diagnosis of feline diabetic ketoacidaemia. *J Small Anim Pract* 2012; 53: 328-31.

Zini E, Hafner M, Osto M, Franchini M, Ackermann M, Lutz TA, Reusch CE. Predictors of clinical remission in cats with diabetes mellitus. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 1314-21.

Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39: 561-77.

IX. DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in meiner Zeit als Doktorandin und bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann, die es mir ermöglichte meine Dissertation in der Medizinischen Kleintierklinik zu schreiben und als Tierärztin in der Klinik tätig zu sein. Ich bedanke mich für die Korrekturvorschläge während des Verfassens dieser Arbeit.

Meiner Betreuerin Dr. Astrid Wehner möchte ich herzlich danken für ihre allgegenwärtige Unterstützung, ihre Geduld und ihr Verständnis in dieser Zeit. Ihre Betreuung und Beratung beim Verfassen dieser Arbeit waren mir eine unermessliche Hilfe.

Besonders möchte ich mich auch bei PD Dr. Sven Reese für seine Unterstützung und seinen Einsatz bei der statistischen Auswertung bedanken. Herrn Dr. Frank Weber und Frau Ingrid Hartmann sowie dem gesamten Laborteam der Klinik für Wiederkäuer möchte ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit beim Bearbeiten unserer Proben danken.

Ein großes Dankeschön geht an meine ehemaligen Kollegen für die gemeinsame schöne und lehrreiche Zeit in der MTK. Insbesondere an alle, die mir bei der Probensammlung und -bearbeitung für meine Arbeit geholfen haben.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen und nicht zuletzt für ihren Humor bedanken, der alles so viel leichter gemacht hat.

Last but not least möchte ich von Herzen meiner Familie danken. Ohne Eure Hilfe und Unterstützung, Eure unerschütterliche Geduld und Euer Vertrauen in mich, hätte ich diesen Weg nicht gehen können. Danke!