

# Methodenvalidierung fünf verschiedener Analysegeräte für die Ammoniakmessung des Hundes unter Einbeziehung wichtiger präanalytischer Faktoren

---

Sabine Maria Thalmeier



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere,  
klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Andreas Moritz

**Methodenvalidierung fünf verschiedener Analysegeräte  
für die Ammoniakmessung des Hundes  
unter Einbeziehung wichtiger präanalytischer Faktoren**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Sabine Maria Thalmeier**

Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Moritz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Roth

Tag der Disputation: 28.04.2017

## **Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung und Literaturübersicht.....</b>	<b>1</b>
1.1 Ammoniak.....	2
1.1.1 Indikation der Ammoniakmessung .....	2
1.1.2 Bestimmungsmethode .....	3
1.1.3 Referenzbereich.....	3
1.2 Präanalytische Faktoren .....	4
1.2.1 Lagerung.....	4
1.2.2 Interferenzen Ikterus, Hämolyse und Lipämie.....	5
1.2.3 Antikoagulanzen.....	6
1.2.4 Ammoniakkonzentration in Vollblut, Serum und Plasma.....	6
1.2.5 Weitere Einflussfaktoren .....	7
1.3 Methodvalidierung .....	8
1.3.1 Linearitätsstudie .....	10
1.3.2 Replikationsstudie.....	10
1.3.3 Interferenzstudie Ikterus, Hämolyse und Lipämie .....	12
1.3.4 Methodenvergleich.....	12
1.3.5 Akzeptabilität der Methode.....	14
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1 Proben.....	15
2.2 Evaluierte Geräte und Reagenzien.....	17
2.2.1 PocketChem™ BA PA-4140 .....	17
2.2.2 FUJI DRI-CHEM NX500i.....	18
2.2.3 solo .....	20
2.2.4 scil VitroVet.....	22
2.2.5 Vergleichsgerät ABX Pentra 400 .....	23

---

2.3	Methodenvalidierung .....	25
2.3.1	Linearitätsstudie .....	25
2.3.2	Replikationsstudie .....	26
2.3.4	Interferenzstudie Ikterus, Hämolyse und Lipämie .....	26
2.3.5	Lagerungsstudie .....	27
2.3.6	Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA .....	27
2.3.7	Methodenvergleich .....	27
2.4	Statistische Auswertung .....	28
2.4.1	Linearität .....	28
2.4.2	Replikationsstudie .....	28
2.4.3	Interferenzstudie Ikterus, Hämolyse und Lipämie .....	28
2.4.4	Lagerungsstudie .....	28
2.4.5	Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA .....	29
2.4.6	Methodenvergleich .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1	Linearitätsstudie .....	30
3.2	Replikationsstudie .....	34
3.2.1	Kurzzeitreplikationsstudie .....	34
3.2.2	Langzeitreplikationsstudie .....	36
3.3	Interferenzstudie Ikterus, Hämolyse und Lipämie .....	36
3.4	Lagerungsstudie .....	40
3.5	Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA .....	45
3.6	Methodenvergleich .....	47
3.7	Akzeptabilität der Methode .....	55
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
4.2	Replikationsstudie .....	61
4.2.1	Kurzzeitreplikationsstudie .....	61
4.2.2	Langzeitreplikationsstudie .....	62
4.3	Interferenzstudie Ikterus, Hämolyse, Lipämie .....	63
4.4	Lagerungsstudie .....	66
4.5	Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA .....	69
4.6	Methodenvergleich .....	71
4.7	Akzeptabilität der Methode .....	76

---

<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>79</b>
<b>6 Summary.....</b>	<b>79</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>93</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	PocketChem™ BA-PA-4140; ARKRAY, Inc. ....	17
Abbildung 2.	FUJI DRI-CHEM NX500i; FUJIFILM Corporation. ....	18
Abbildung 3.	solo; Firma Eurolyser Diagnostica GmbH. ....	20
Abbildung 4.	scil VitroVet; scil animal care company GmbH.....	22
Abbildung 5.	ABX Pentra 400, HORIBA, Ltd.....	23
Abbildung 6.	Ammoniakmessbereich der Geräte.....	31
Abbildung 7.	Lagerungsstudie PocketChem™.....	40
Abbildung 8.	Lagerungsstudie FUJI.....	41
Abbildung 9.	Lagerungsstudie solo.....	42
Abbildung 10.	Lagerungsstudie VitroVet.....	43
Abbildung 11.	Lagerungsstudie Pentra.....	44
Abbildung 12.	Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA auf die Ammoniakmessung.....	46
Abbildung 13.	Methodenvergleich der Geräte A = PocketChem™, B = FUJI, C = solo, D = VitroVet mit Vergleichsgerät Pentra für den Parameter Ammoniak anhand der Passing-Bablok Regres- sionsanalyse mit Konfidenzintervallen und Spearman- Rangkorrelationskoeffizient.....	49
Abbildung 14.	Methodenvergleich der Geräte A = PocketChem™, B = FUJI, C = solo, D = VitroVet mit Vergleichsgerät Pentra für den Parameter Ammoniak anhand des Bland-Altman Differenzdiagramms.....	52

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Die verwendeten Geräte mit Spezifikationen der Ammoniakmessung.....	16
Tabelle 2.	Linearitätsstudie der Geräte anhand unterschiedlicher Ammoniakkonzentrationslevel.....	33
Tabelle 3.	Kurzzeitreplikationsstudie der Geräte anhand von Patientenproben mit mittleren Ammoniakkonzentrationen .....	35
Tabelle 4.	Kurzzeitreplikationsstudie der Geräte anhand von Patientenproben mit hohen Ammoniakkonzentrationen .....	35
Tabelle 5.	Langzeitreplikationsstudie der Geräte anhand von Ammoniakkontrollmaterial .....	36
Tabelle 6.	Interferenzstudie PocketChem™ für den Parameter Ammoniak anhand hoher und niedriger, klinisch relevanter Konzentration von Bilirubin, Hämoglobin und Intralipid® .....	37
Tabelle 7.	Interferenzstudie FUJI für den Parameter Ammoniak anhand hoher und niedriger, klinisch relevanter Konzentration von Bilirubin, Hämoglobin und Intralipid® .....	38
Tabelle 8.	Interferenzstudie VitroVet für den Parameter Ammoniak anhand hoher und niedriger, klinisch relevanter Konzentration von Bilirubin, Hämoglobin und Intralipid® .....	38
Tabelle 9.	Interferenzstudie Pentra für den Parameter Ammoniak anhand hoher und niedriger, klinisch relevanter Konzentration von Bilirubin, Hämoglobin und Intralipid® .....	39
Tabelle 10.	Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA auf die Ammoniakmessung der Geräte.....	47
Tabelle 11.	Zusammenfassung Methodenvergleich der Geräte am Vergleichsgerät Pentra für den Parameter Ammoniak der Tierart Hund.....	54

---

Tabelle 12. Akzeptabilität der Geräte für die Ammoniakmessung des Hundes anhand des beobachteten Gesamtfehlers ( $TE_{\text{obs}}$ ) im Vergleich zum zulässigen Gesamtfehler .....	56
Tabelle 13. Akzeptabilität aller Geräte für die Ammoniakmessung des Hundes anhand des beobachteten Gesamtfehlers ( $TE_{\text{obs}}$ ) im Vergleich zum zulässigen Gesamtfehler .....	57

## Abkürzungsverzeichnis

ASVCP	American Society for Veterinary Clinical Pathology
CI	Confidence interval (Konfidenzintervall)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
M	Mittelwert
mmol/l	Millimol pro Liter
n	Probenzahl
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
nm	Nanometer
r	Korrelationskoeffizient
r <sub>s</sub>	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
TE <sub>a</sub>	allowable oder desirable Total Error (zulässiger Gesamtfehler)
TE <sub>obs</sub>	observed oder calculated Total Error (berechneter Gesamtfehler)
U/l	Units pro Liter
μmol/l	Mikromol pro Liter
VK	Variationskoeffizient

## 1 Einleitung und Literaturübersicht

In erhöhter Konzentration ist Ammoniak ein potentes Neurotoxin. Hyperammonämien können verschiedene klinische Zeichen wie Apathie, Lethargie, Stupor, Vomitus, Drangwandern und Koma verursachen sowie tödlich enden (Strombeck et al., 1975b; Rothuizen und van den Ingh, 1982a; Tivers et al., 2014). Der portosystemische Shunt ist die häufigste Erkrankung, die beim Hund zu einer Hyperammonämie führt (Tivers et al., 2014). Weitere Ursachen sind schwere Lebererkrankungen mit einem Funktionsverlust des Parenchyms von über 70 %, das seltener vorkommende Imerlund-Gräsbeck-Syndrom sowie angeborene Enzymopathien des Harnstoffzyklus (Strombeck et al., 1975a; Center, 1996; Battersby et al., 2005; Zandvliet und Rothuizen, 2007; Fyfe et al., 2014).

Die größte Herausforderung der korrekten Ammoniakmessung aus dem Blut ist die labile und reaktionsfreudige Eigenschaft des Analyten selbst. Viele präanalytische Faktoren wie Lagerungsdauer und -temperatur, Hämolyse, Lipämie, verwendete Antikoagulanzen, Futteraufnahme, erhöhte Muskelarbeit, Schweiß oder Rauch können zu einer erheblichen Fehlmessung und -interpretation des Parameters beitragen (Clarke et al., 1959; Brusilow und Gordes, 1968; Da Fonseca-Wollheim, 1973; Davidson und Jennings, 1980; Hitt und Jones, 1986; Snow et al., 1988; Dorwart und Saner, 1992). Auch ist für die tierärztliche Praxis derzeit nur ein ausschließlich für die direkte Ammoniakmessung aus Hundevollblut zufriedenstellend validiertes Analysegerät verfügbar (Goggs et al., 2008). Die Vergleichsmethode ist kostenintensiv und findet in Großlaboren Anwendung. Die damit verbundene Notwendigkeit, die Probe zu versenden, birgt ein hohes Risiko präanalytischer Fehler und ist weniger empfehlenswert. Darüber hinaus ist für intensivmedizinische Patienten mit beispielsweise einer hepatischen Enzephalopathie eine schnelle Ammoniakbestimmung zur Verlaufskontrolle und Therapieanpassung notwendig (Tivers et al., 2014).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation der Leistungsmerkmale fünf verschiedener Analysegeräte für die Ammoniakbestimmung aus Blut für die Tierart Hund in Bezug auf Linearität, Genauigkeit, Richtigkeit und wichtiger präanalytischer Faktoren. Die Validierung von fünf unterschiedlichen Geräten für die

Ammoniakmessung des Hundes in einer Studie ist einzigartig und erlaubt einen objektiven Vergleich der meisten Geräte, die sich zurzeit für die Bestimmung des Parameters auf dem Markt befinden. Darüber hinaus ist es nach Wissen der Autorin die erste Studie in der veterinärmedizinischen Ammoniakmessung, die den berechneten Gesamtfehler ( $TE_{\text{obs}}$ ) zur abschließenden Beurteilung der Geräteleistung mit dem zulässigen Gesamtfehler ( $TE_a$ ) nach den Richtlinien der American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) vergleicht (ASVCP, 2009, 2013a).

## 1.1 Ammoniak

Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) ist gasförmig, allerdings liegt es bei physiologischem pH zu 99 % in Form von Ammoniumionen ( $\text{NH}_4^+$ ) im Blut vor. Der Hauptanteil der täglichen Ammoniakbelastung resultiert aus der Verdauung von Nahrungsproteinen und der bakterielle Ammoniaksynthese im Darm (Thomas, 2012). Ammoniak diffundiert leicht durch die Darmschleimhaut und in den Portalkreislauf, in dem es schließlich zur Leber gelangt. In der Leber wird das Ammoniak von Hepatozyten aufgenommen und im Harnstoffzyklus durch die enzymatische Umwandlung in Harnstoff oder durch den Verbrauch bei der Synthese von Glutamin entgiftet. Der Harnstoff wird in der Regel renal ausgeschieden. Dem Leberstoffwechsel entwichenes Ammoniak gelangt in den systemischen Kreislauf, wo es von anderem Gewebe einschließlich Niere, Muskel, Gehirn und Darm durch die Bildung von Glutamin entgiftet wird (Webster, 2010). In der vorliegenden Arbeit wird der Ausdruck Ammoniak in Bezug auf die Gesamtammoniakkonzentration ( $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ ) verwendet.

### 1.1.1 Indikation der Ammoniakmessung

Die häufigste Erkrankung, die zu einer Hyperammonämie beim Hund führt, ist der portosystemische Shunt. Es handelt sich um eine angeborene oder erworbene Gefäßanomalie, die das ammoniakreiche Pfortaderblut an der Leber und ihrer Entgiftungsfunktion vorbei in den systemischen Kreislauf leitet (Vitums, 1959; Johnson, 1987; van den Ingh et al., 1995). Auch schwere Lebererkrankungen mit einem Funktionsverlust von über 70 % des Parenchyms führen zur Hyperammonämie (Center, 1996). Defekte im Harnstoffzyklus selbst können

ebenfalls zu erhöhten Ammoniakkonzentrationen führen. Bisher sind Defekte der Enzyme Argininosuccinase und Argininosuccinat-Synthetase beim Hund beschrieben. Allerdings sind diese angeborenen Enzymopathien extrem selten (Strombeck et al., 1975a; Zandvliet und Rothuizen, 2007). Eine Behinderung des Harnstoffzyklus mit resultierender Hyperammonämie zeigt sich bei der ebenfalls sehr seltenen Erkrankung Imlerslund-Gräsbeck-Syndrom. Ein angeborener Gendefekt, der zur Malabsorption von Cobalamin führt und die hieraus resultierende Anhäufung von Metaboliten hat unter anderem eine herabgesetzte Aktivität des Harnstoffzyklus zur Folge (Battersby et al., 2005; Fyfe et al., 2014). Ein ungefähr 2,5-facher Anstieg der Plasmaammoniakkonzentration ist durch eine Harnwegsinfektion mit harnstoffspaltenden Bakterien (Freisetzung von Ammoniak) und gleichzeitiger Harnwegsobstruktion bislang bei einem Hund beschrieben (Hall et al., 1987). Ammoniak ist ein gefährliches Zellgift und Hyperammonämien können eine hepatische Enzephalopathie verursachen sowie tödlich enden, wobei der Schweregrad der klinischen Zeichen nicht mit der Höhe der Ammoniakkonzentration korrelieren muss (Strombeck et al., 1975b; Rothuizen und van den Ingh, 1982a; Tivers et al., 2014).

### **1.1.2 Bestimmungsmethode**

Für die Ammoniakmessung aus Blut ist weder in der Humanmedizin noch in der Veterinärmedizin eine Referenzmethode (also eine hoch qualifizierte Methode, deren Ergebnis mit einer „maßgeblichen Methode“ übereinstimmt) etabliert, die den wahren Wert ermittelt (Tietz, 1979; Haweke, 2012). Am gebräuchlichsten ist die direkte enzymatische Bestimmung, weshalb sie häufig als Vergleichsmethode zur Etablierung neuer Verfahren dient. Die Mikrodiffusionsmethode ist eine indirekte Methode, die häufig in der Point-of-Care-Diagnostik und in Trockenchemiegeräten ihren Einsatz findet (Haweke, 2012). Die detaillierte Funktionsweise der verschiedenen Methoden wird später im Kapitel „Material und Methoden“ erläutert.

### **1.1.3 Referenzbereich**

Der Referenzbereich von Ammoniak in venösem Vollblut oder Plasma liegt beim gesunden, nüchternen Hund je nach Methode und Autor unter 73  $\mu\text{mol/l}$  und ist

meistens kleiner als 59  $\mu\text{mol/l}$  (Clarke et al., 1959; Reif, 1960; Meyer et al., 1978; Rothuizen und van den Ingh, 1982a, 1982b; Hitt und Jones, 1986; Kaneko et al., 2008; Moritz, 2013; Neumann, 2013). Für den Ammoniaktoleranztest liegt die klinische Entscheidungsgrenze bei 100  $\mu\text{mol/l}$  (Center, 1996).

## 1.2 Präanalytische Faktoren

Die größten Fehler der Ammoniakbestimmung entstehen vor der eigentlichen Messung. Die möglichen präanalytischen Faktoren werden im Folgenden näher beschrieben.

### 1.2.1 Lagerung

Die Lagerungsdauer und -temperatur einer Blutprobe bis zur Messung der Ammoniakkonzentration hat einen erheblichen Einfluss auf den Parameter. In der Studie von Hitt und Jones (1986) zeigt sich ein enormer Anstieg der Ammoniakkonzentration in heparinisiertem Hundeplasma nach 24 Stunden, wobei der Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert bei der Lagerungstemperatur von 4 °C (125,65 %) niedriger als bei 21 °C (237,87 %) ausfällt (Hitt und Jones, 1986). Da Fonseca-Wollheim (1990b) empfiehlt für die Ammoniakmessung humaner Blutproben nach der Entnahme die Lagerung des Vollblutes im Eisbad (0 °C), wobei ein Zeitraum von 15 Minuten bis zur Zentrifugation toleriert werden kann. Pro Stunde erfolgt ein medianer Anstieg in EDTA-Plasma (aus EDTA antikoaguliertem Vollblut hergestelltes Plasma) von 3,9, 5,2 und 25,2  $\mu\text{mol/l}$  pro Stunde bei jeweils 0, 20 und 37 °C (Da Fonseca-Wollheim, 1990b). Schuff-Werner und Steiner zeigen, dass die Ammoniakkonzentration bei Raumtemperatur humaner EDTA-Plasmaproben, wenn die Gewinnung des Plasmas unmittelbar nach Blutentnahme erfolgt, innerhalb von drei Stunden lediglich um 5 % im Vergleich zur Ausgangskonzentration differiert (Schuff-Werner und Steiner, 2015). Lagerungsstudien humaner Heparin-Plasmaproben bei 4 °C zeigen einen Unterschied zur Ausgangskonzentration von 18 % nach einer Stunde, 20 % nach zwei und 25 % nach drei Stunden. Hier handelt es sich aber nicht um Blutproben gesunder Probanden, sodass der Einfluss einer eventuell erhöhten Aktivität der  $\gamma$ -Glutamyltransferase, die einen schnelleren Anstieg der Ammoniakkonzentration bewirkt, nicht ausgeschlossen werden kann. Auch die Dauer bis zur

Abzentrifugation des Plasmas bleibt unklar (Dukic und Simundic, 2015). Allerdings sollte nach Prytz et al. (1970) die Höhe des Ammoniakanstieges nach Blutentnahme bei der Tierart Hund nicht mit der des Menschen gleichgesetzt werden, da der Anstieg in heparinisierendem Menschenvollblut im Gegensatz zum Hund mehr als das Dreifache betragen kann (Prytz et al., 1970). Tierartspezifische Unterschiede sind für Pferde und Katzen beschrieben (Ogilvie et al., 1985). Darüber hinaus gibt es Unterschiede im Anstieg zwischen Plasma und Vollblut; so steigt die Ammoniakkonzentration mit der Zeit in EDTA-Pferdevollblut signifikant stärker an als in EDTA-Pferdeplasma (Lindner und Bauer, 1993).

### **1.2.2 Interferenzen Ikterus, Hämolyse und Lipämie**

Hämolyse verursacht erhöhte Ammoniakkonzentrationen in humanen Blutproben, da die Konzentration in den Erythrozyten etwa dreifach höher als im Plasma ist (Seligsson und Hirahara, 1957). Diese Erkenntnis trifft auch auf Blutproben von Hunden zu (Davidson und Jennings, 1980). Stark hämolytische sowie lipämische Proben führen zu trübungsbedingten Extinktionsänderungen und sind für die enzymatische Ammoniakmessung nicht geeignet (Da Fonseca-Wollheim, 1973). Ammoniaktestanleitungen verschiedener Hersteller weisen darauf hin, dass sowohl die Enzym- als auch die Mikrodiffusionsmethode durch Hämolyse, Ikterus oder Lipämie ab bestimmten Konzentrationen störanfällig sind (Labor + Technik LT-SYS®; ARKRAY Inc., 2009; FUJIFILM Corporation, 2012). Eine pathologisch erhöhte  $\gamma$ -Glutamyltransferase, wie sie bei schweren Lebererkrankungen zu finden ist, spaltet das in der Probe vorhandene Glutamin unter der Bildung von Ammoniak ab, so dass es in vitro zu einer erhöhten Ammoniakkonzentration kommt. Der Ammoniakanstieg in humanen Blutproben kann mehr als das 30-fache im Vergleich zu Proben mit einer physiologischen Aktivität der  $\gamma$ -Glutamyltransferase betragen. Eine gezielte Inhibition der  $\gamma$ -Glutamyltransferase wird mit dem Zusatz von Natriumborat und L-Serin erreicht (Da Fonseca-Wollheim, 1990a). Direkt nach der Blutentnahme abzentrifugierte humane EDTA-Plasmaproben mit einer erhöhten  $\gamma$ -Glutamyltransferase zeigen, gelagert bei 4 °C, einen Ammoniakanstieg von 9 % nach einer Stunde und 16 % nach zwei und drei Stunden. Gelagert bei Raumtemperatur, beträgt der Anstieg nach zwei Stunden 13 % und nach drei Stunden 27 %. Plasmaproben mit einer normalen Aktivität der

$\gamma$ -Glutamyltransferase differieren zum Ausgangswert selbst bei Raumtemperatur lediglich um 5 % innerhalb von drei Stunden. Daraus folgt, dass Ammoniak in Plasma mit einer erhöhten  $\gamma$ -Glutamyltransferase umgehend gemessen werden sollte, aber das Plasma mit einer normalen Aktivität der  $\gamma$ -Glutamyltransferase bis zu drei Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden kann, vorausgesetzt, das Plasma wird unmittelbar nach der Blutentnahme abzentrifugiert (Schuff-Werner und Steiner, 2015).

### 1.2.3 Antikoagulanzen

Die Wahl der Antikoagulanzen kann die Ammoniakmessung ebenfalls beeinflussen. In humanen Heparin-Plasmaproben sind bei der enzymatischen Bestimmung teilweise niedrigere Werte im Vergleich zu EDTA-Plasmaproben beschrieben. Die Differenzen einzelner Proben liegen zwischen 5,3 % und 88,9 %, was zu falsch negativen Resultaten führen kann (Dorwart und Saner, 1992; Wannasilp et al., 2006). Für die Ammoniakbestimmung mittels Mikrodifusion an den Geräten PocketChem<sup>TM</sup> und FUJI werden Heparin und EDTA als potentielle Antikoagulanzen vom Hersteller angegeben (ARKRAY Inc., 2008; FUJIFILM Corporation, 2012). Bei der bereits validierten Mikrodifusionsmethode VetTest 8008 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Heparin- und EDTA-Hundeplasma (Sterczner et al., 1999). Ob sich bei den in dieser Studie untersuchten Geräten Unterschiede ergeben, kann nach Stand der aktuellen Literatur zum Zeitpunkt der Arbeit nicht gesagt werden.

### 1.2.4 Ammoniakkonzentration in Vollblut, Serum und Plasma

Unter Vermeidung der Artefaktmöglichkeiten (wie oben beschrieben) enthält EDTA-Vollblut vor Einsetzen der Hämolyse nicht wesentlich mehr Ammoniak als EDTA-Plasma (Da Fonseca-Wollheim, 1973). Die Ammoniakkonzentration in Serum ist höher als in Plasma (Howanitz et al., 1984). Die Ammoniakbildung steigt auch mit der Thrombozytenzahl. In plättchenreichem humanen Plasma ist die Ammoniakbildung höher als in plättchenarmem Plasma, in EDTA-Vollblut findet sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Ammoniakbildung (Da Fonseca-Wollheim, 1990b). Die Verwendung von Serum zur Ammoniakbestimmung scheidet aus, da beim Gerinnungsvorgang erhöhte Mengen an Ammoniak

freigesetzt werden (Wenzel und Christ, 1969; Cowley et al., 1985). Es besteht kein signifikanter Unterschied des Ammoniakgehaltes im venösen oder arteriellen Plasma gesunder Hunde (Davidson und Jennings, 1980; Rothuizen und van den Ingh, 1982a). Hunde mit Lebererkrankungen können durchschnittlich im arteriellen Plasma einen 1,5-fach höheren Ammoniakwert als im venösen Plasma aufweisen. Jedoch sind fast alle Hunde mit einer Hyperammonämie, basierend auf arteriellen Proben, auch in den venösen Proben hyperammonämisch (Rothuizen und van den Ingh, 1982a).

### **1.2.5 Weitere Einflussfaktoren**

#### **Futtermaufnahme**

Die Ammoniakmessung erfolgt idealerweise am nüchternen Hund, da die Futtermaufnahme zu erhöhten Ammoniakkonzentrationen führt (Clarke et al., 1959), wobei der Anstieg bei Hunden mit einer schweren Lebererkrankung signifikant höher ausfällt als bei gesunden Hunden und als diagnostisches Mittel zur Detektion eines portosystemischen Shunts genutzt werden kann (Walker et al., 2001).

#### **Muskelarbeit**

Nach starker Muskelarbeit sind im venösen Plasma erhöhte Ammoniakwerte messbar. Eine Untersuchung an Greyhounds unmittelbar nach einem Rennen zeigt eine Erhöhung der venösen Plasmaammoniakkonzentration um mehr als das Dreifache gegenüber dem Ausgangswert (Snow et al., 1988). Der Mechanismus beruht auf der Desaminierung von Adenosinmonophosphat im Muskel, wobei das freiwerdende Ammoniak in das Blut diffundiert (Mutch und Banister, 1983; Harris et al., 1999).

#### **Blutentnahme**

Hämolyse durch zu starkes oder langes Stauen sollte vermieden werden. In humanem Blut steigt die Ammoniakkonzentration bei einer Stauung in Höhe des diastolischen Blutdrucks um durchschnittlich 5 % gegenüber dem ungestaut

entnommenem Blut (Prellwitz et al., 1976). Ein ähnlicher Versuch bei Pferden konnte keinen signifikanten Anstieg nachweisen (Lindner und Bauer, 1993).

### **Rauch**

Patienten, Laborpersonal und Personen, die Blut abnehmen, sollten vor, während und nach der Messung nicht rauchen, da Zigarettenrauch den Ammoniakgehalt signifikant erhöht (Brunnemann und Hoffmann, 1975; Gerron et al., 1976).

### **Schweiß**

Die mittlere Ammoniakkonzentration im menschlichen Schweiß ist bis zu 57-fach höher als im menschlichen Blut (Brusilow und Gordes, 1968; Diaz et al., 1995), weshalb es zu falsch hohen Konzentrationen bei Kontakt mit der Blutprobe kommen kann (Huizenga und Gips, 1983). Brusilow und Gordes (1968) untersuchten außerdem die Ammoniakkonzentration in Katzenschweiß und konnten Konzentrationen nachweisen, die ungefähr 7-fach höher waren als im Blut, ausgehend von einen Referenzbereich der Blutammoniakkonzentration bis 60  $\mu\text{mol/l}$  (Diaz et al., 1995).

### **Chemotherapie**

In der Humanmedizin ist bekannt, dass hochdosierte Chemotherapie zur Hyperammonämie führen kann (Thomas, 2012b). Für den Hund ist bisher ein Fallbericht nach der Gabe von L-Asparaginase, beschrieben (Lyles et al., 2011).

## **1.3 Methodvalidierung**

Vor ihrer Inbetriebnahme müssen neue Geräte oder Testverfahren überprüft werden, damit sichergestellt wird, dass sie den Standards des Labors und den Herstelleransprüchen entsprechen (ASVCP, 2009). Anders als humanmedizinische, klinische Labore unterliegen veterinärmedizinische Labore bezüglich Qualitätssicherung und Qualitätsstandards keinen staatlichen Regulierungen (ASVCP, 2009). Ein eigenständiges Engagement in diesem Bereich zeigt die American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) durch Gründung des ASVCP Quality Assurance and Laboratory Standards Committee (QALS) und die Verfassung der ASVCP-Qualitätskontrollrichtlinien mit

den Prinzipien der Qualitätssicherung und -standards für die veterinärmedizinische Labordiagnostik (ASVCP, 2009). Die Richtlinien sind auf jedes Labor einschließlich klinikeigener Labore anwendbar, die veterinärmedizinische Testverfahren durchführen. Sie sprechen nicht die pharmazeutischen oder toxikologischen Laborabläufe an, da diese durch die Bestimmungen der GLP-Richtlinien (Good Laboratory Practice) reguliert werden (ASVCP, 2009). Die ASVCP-Richtlinien für die Qualitätssicherung von Point-of-Care Testing in der Veterinärmedizin sind für die Anwendung außerhalb von konventionellen Laboren konzipiert und für privat praktizierende Tierärzte mit hauseigenem Labor gedacht (ASVCP, 2013b).

Wie fehlerhaft ist nun ein durch die Analysemethode erzieltetes Testergebnis? Hinter dieser Frage verbirgt sich der Sinn der Methodvalidierung, die Fehlerabschätzung (Westgard, 2008). Die Validierung einer Methode beinhaltet verschiedene Studien zur Ermittlung unterschiedlicher Fehlerarten. Ein zufälliger Fehler, auch Ungenauigkeit oder Impräzision genannt, ist ein Fehler, der entweder positiv oder negativ ausfällt, dessen Richtung und Größe aber nicht voraussagen sind. Zufällige Fehler und im Umkehrschluss die Genauigkeit (auch als Präzision bezeichnet) einer Methode werden durch Replikationsstudien abgeschätzt (Westgard, 2008). Ein systematischer Fehler, auch Bias oder Unrichtigkeit genannt, ist ein Fehler, der immer in eine Richtung verläuft. Bleibt der systematische Fehler über einem gewissen Konzentrationsbereich unverändert, handelt es sich um einen konstanten systematischen Fehler. Ändert er sich hingegen mit dem Konzentrationsbereich, bezeichnet man ihn als proportionalen systemischen Fehler. Der konstante systematische Fehler wird durch Interferenzstudien, der proportionale systematische Fehler durch Wiederfindungsanalysen bestimmt. Beide systematischen Fehler, die zusammen die Unrichtigkeit sowie umgekehrt die Richtigkeit einer Methode verdeutlichen sind durch die Methodenvergleichsstudie zu ermitteln (Westgard, 2008).

Letztendlich ist der  $TE_{obs}$  der kombinierte Effekt aus dem zufälligen Fehler und dem systematischen Fehler, also die Summe aller aufgetretenen Fehler. Der  $TE_{obs}$  errechnet sich aus dem Bias der Methodenvergleichsstudie plus zwei Mal den Variationskoeffizient (VK) aus der Replikationsstudie (Westgard, 2008; ASVCP, 2013a). Der  $TE_{obs}$  dient zur Beurteilung der Leistung einer Methode (Westgard,

2008; ASVCP, 2009). Als Maßstab für die Leistungsfähigkeit einer Methode dienen analytische Qualitätsanforderungen wie beispielsweise der  $TE_a$  oder klinische Entscheidungsgrenzen (ASVCP, 2009). In der Humanmedizin stehen zahlreiche regulatorische Vorschriften für die Methodvalidierung zur Verfügung (CAP; COLA; JC; CLIA, 1992; Ricós et al., 1999). Seit März 2013 ist die Richtlinie der American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) für den  $TE_a$  von klinisch-chemischen Parametern verfügbar (ASVCP, 2013a). Der  $TE_a$  für den Parameter Ammoniak beträgt nach den Richtlinien 20 %. Er dient als abschließendes Beurteilungs- und Akzeptabilitätskriterium der Methodvalidierung und ist auf jeder klinisch wichtigen Entscheidungsebene anwendbar. Ist der ermittelte  $TE_{obs}$  einer untersuchten Methode größer als der  $TE_a$  des entsprechenden Parameters, ist die Methode zurückzuweisen (ASVCP, 2009, 2013a).

### 1.3.1 Linearitätsstudie

Die Linearitätsstudie dient der Bestimmung des Messbereichs einer Methode einschließlich der niedrigsten und höchsten Messwerte, die zuverlässig sind (Westgard, 2008). Das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) empfiehlt ein Minimum von vier, die ASVCP ein Minimum von fünf verschiedenen Konzentrationsstufen (CLSI document EP06-A, 2003; ASVCP, 2009). Drei bis vier Wiederholungsmessungen jeder Konzentrationsstufe sind ausreichend. Die Mittelwerte der Messergebnisse werden auf der y-Achse, die erwarteten Konzentrationsstufen auf der x-Achse aufgetragen. Das Diagramm wird anschließend auf Ausreißer, Linearität und Lage der Mittelwertlinie geprüft (Westgard, 2008; ASVCP, 2009). Die Fehler können durch Vergleich der gemessenen Mittelwerte mit den zu erwartenden theoretischen Werten unter Einbeziehung des  $TE_a$  für den entsprechenden Parameter quantifiziert werden (Westgard, 2008).

### 1.3.2 Replikationsstudie

Die Replikationsstudie wird ausgeführt, um die Ungenauigkeit oder den zufälligen Fehler einer Methode zu ermitteln (Westgard, 2008). Die Ungenauigkeit einer Methode hängt stark von der durchgeführten Zeitdauer des Experiments ab. Wenn

die Studie beispielsweise innerhalb einer Analyseserie stattfindet, bleibt der Effekt durch tagesabhängige Schwankungen der Betriebsbedingungen unbemerkt (Westgard, 2008). Die Ungenauigkeit eines Experiments, die innerhalb einer Analyseserie auftritt, ist bekannt als „within-run“-Ungenauigkeit oder das Experiment als Kurzzeitreplikationsstudie, wogegen die Ungenauigkeit einer Studie, die über mehrere Tage und mehrere Analyseserien hinweg erstellt ist als „between-run“-Ungenauigkeit oder das Experiment als Langzeitreplikationsstudie bekannt ist (Westgard, 2008) (CLSI document EP05-A3,É). Die Anzahl der zu testenden Materialien und Konzentrationen hängt von den klinischen Entscheidungsgrenzen des Parameters ab. Es ist wichtig, Proben zu verwenden, die mit ihrer Matrix so nahe wie möglich an die richtige Probe heranreichen. Patientenproben sind bei der Kurzzeitreplikationsstudie zu bevorzugen, bei der Langzeitreplikationsstudie kommt es auf die Probenstabilität an. Sind Parameter empfindlich, können auch Standardlösungen oder Kontrollmaterial verwendet werden. (Westgard, 2008). Die Konzentration des Parameters sollte im Bereich der klinischen Entscheidungsgrenzen liegen. Ein Minimum von zwei Konzentrationen (normal und hoch) ist zu empfehlen, wenn eine Erhöhung des Parameters medizinisch bedeutsam ist (ASVCP, 2009). Ein Minimum von drei Wiederholungsmessungen pro Tag über fünf Tage (CLSI document EP15-A3, 2014) beziehungsweise zwanzig Wiederholungsmessungen über zwanzig Tage (CLSI document EP05-A3, 2014) sind für die Langzeitreplikationsstudie angegeben, wobei die Ungenauigkeit durch eine größere Probenanzahl besser zu bestimmen ist. Für die Kurzzeitreplikationsstudie sind zwanzig Wiederholungsmessungen einer Probe ideal (Westgard, 2008). Berechnet werden der Mittelwert (M), die Standardabweichung (SD) und der VK. Der M beschreibt die zentrale Lage der Messergebnisse und die SD beschreibt die Verteilung der Ergebnisse um den M (66 % der Werte liegen voraussichtlich innerhalb  $\pm 1SD$ ; 95 % innerhalb  $\pm 2SD$  und 99,7 % innerhalb  $3SD$ ), wenn die Daten normalverteilt sind. Der VK ist gleich die SD, dividiert durch den M und in % ausgedrückt (Westgard, 2008). Zur Beurteilung der Ungenauigkeit oder des zufälligen Fehlers werden anschließend die ermittelte SD und der VK mit dem Laborstandard ( $TE_a$  oder klinische Entscheidungsgrenze) des Parameters verglichen. Wenn die SD oder VK den Standard übersteigen, sollte der Test nicht akzeptiert werden (ASVCP, 2009).

### 1.3.3 Interferenzstudie Ikterus, Hämolyse und Lipämie

Änderungen der Blutprobe in Farbe, Trübung oder Zusammensetzung durch Hämoglobin, Bilirubin und Fett sowie deren Auswirkung auf die Richtigkeit von Messergebnissen im Sinne von falsch hohen oder falsch niedrigen Werten sind ein häufiges Problem verschiedener Analysemethoden (Bellamy und Olexson, 2000). Die Interferenzstudie dient der Abschätzung des durch Störsubstanzen in den zu analysierenden Proben verursachten systematischen Fehlers, wobei der systematische Fehler konstant ist und sich die Fehlergröße proportional zur Konzentration der Störsubstanz verhält (Westgard, 2008; ASVCP, 2009). Das Volumen der zugeführten Störsubstanz sollte möglichst niedrig sein, um Veränderungen der Probenmatrix zu vermeiden (Westgard, 2008). Mehrfachbestimmungen der Proben sind notwendig, da der zufällige Fehler der Messmethode den systemischen Fehler durch die Störsubstanz überdecken kann (CLSI document EP07-A2, 2005; Westgard, 2008). Die Datenanalyse entspricht der gepaarten t-Test-Statistik. Die Berechnung des systematischen Fehlers (Bias) erfolgt durch Berechnung der Durchschnittsdifferenz aus den Mittelwerten der Mehrfachmessungen von Proben mit Störsubstanzen (Spikeproben) und ohne (Blankproben) (Westgard, 2008; ASVCP, 2009). Ist der festgestellte systematische Fehler kleiner als  $TE_a$  des entsprechenden Tests, ist das Kriterium für eine akzeptable Leistung der Methode erfüllt (Westgard, 2008; ASVCP, 2009; CLSI document C56-A, 2012).

### 1.3.4 Methodenvergleich

Der Vergleich von Methoden dient der Abschätzung des systematischen Fehlers (Bias) einer Messmethode (Westgard und Hunt, 1973; Westgard, 2008). Die zum Vergleich herangezogene Analysemethode muss sorgfältig gewählt sein, da die Interpretation der Ergebnisse von ihrer Korrektheit abhängig ist (Westgard, 2008; ASVCP, 2009). Bestenfalls ist eine „Referenzmethode“ – diese ist definiert als hoch qualifizierte Methode, deren Ergebnis mit einer „maßgeblichen Methode“ (ermittelt den wahren Wert) oder mit der Rückverfolgbarkeit von standardisiertem Referenzmaterial übereinstimmt – zu verwenden (Tietz, 1979). Meist ist eine solche Methode nicht vorhanden, so dass eine Vergleichsmethode, also eine Methode, die routinemäßig für die Bestimmung des entsprechenden Parameters

eingesetzt wird, zu benutzen ist (Tietz, 1979). Sollten hierbei große und medizinisch inakzeptable Unterschiede auftreten, ist es notwendig herauszufinden, welche Methode ungenau misst (Westgard, 2008).

Mindestens vierzig verschiedene Patientenproben sind mit beiden Methoden zu prüfen (CLSI document EP09-A2-IR, 2010), wobei wichtiger als die Anzahl der Proben die gleichmäßige Verteilung über den klinisch bedeutsamen Messbereich ist (Westgard, 2008). Der Versuch sollte über fünf bis zwanzig Tage andauern und zwei bis fünf Messungen pro Tag enthalten, wobei der längere Zeitraum zu bevorzugen ist (ASVCP, 2009). Zu Beginn der Datenauswertung wird ein Vergleichsdiagramm für die visuelle Prüfung des neuen Testverfahrens (y-Achse) mit der Vergleichsmethode (x-Achse) empfohlen. Ausreißer sollten wiederholt gemessen werden, solange die Probe frisch ist (Westgard, 2008). Eine Regressionsgerade kann basierend auf der visuellen Beurteilung der Daten gezogen werden (Westgard, 2008). Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) erfolgt bei normalverteilten Daten nach Pearson und bei nicht normalverteilten Daten nach Spearman ( $r_s$ ) (Spearman, 1907). Der Korrelationskoeffizient gibt eine Aussage darüber, wie gut die ermittelten Daten den Analysebereich abdecken, er ist kein Maß für die Übereinstimmung der Methoden (Westgard und Hunt, 1973). Er wird benötigt, um die richtige statistische Gleichung zur Berechnung des systematischen Fehlers (Bias) auszuwählen. Für Parameter, die sich über einen weiten analytischen Bereich erstrecken, ist typischerweise die Regressionsanalyse zur Bestimmung des Bias sinnvoll (Westgard, 2008; ASVCP, 2009). Wenn  $r \geq 0,99$  ist, sind einfache Standardregressionsanalysestatistiken anzuwenden. Der systematische Fehler (Bias) auf einer bestimmten Entscheidungsebene ( $X_c$ ) kann dann durch die Berechnung des zugehörigen y-Wertes ( $Y_c$ ) auf der Regressionsgeraden bestimmt werden. Die Berechnung lautet wie folgt:

$$Y_c = a(\text{Steigung})X_c + b(\text{y-Schnittpunkt})$$

$$\text{systematischer Fehler (Bias)} = Y_c - X_c.$$

Wenn  $r < 0,99$  ist, sind komplexere Regressionsanalysen nach Passing und Bablok oder Deming anzuwenden (Passing und Bablok, 1983; Stöckl et al., 1998; Westgard, 2008). Gleichfalls wird die Erstellung eines Differenzdiagramms nach

Bland-Altman empfohlen (ASVCP, 2009). Auf der y-Achse wird der Unterschied der Messergebnisse zwischen dem Test und der Vergleichsmethode und auf der x-Achse der Durchschnittswert beider Methoden graphisch dargestellt. Die Differenzlinie gibt den systematischen Fehler (Bias) an. Bei Tests ohne Bias sind die Ergebnisse um die Nulllinie verteilt, wobei sich etwa eine Hälfte über- und eine Hälfte unterhalb der Linie (Bland und Altman, 1986; ASVCP, 2009).

### 1.3.5 Akzeptabilität der Methode

Am Ende der Methodendvalidierung kann durch die ermittelten Fehlerarten aus den verschiedenen Studien die Leistung der Methode beurteilt werden. Der berechnete  $TE_{obs}$  beinhaltet den systematischen Fehler (Bias), der durch jedes Vergleichsexperiment bestimmt wird sowie den zufälligen Fehler in Form der SD oder des VK aus der Langzeitreplikationsstudie (Westgard, 2008; ASVCP, 2009).

$$TE_{obs} = 2VK [\%] + Bias [\%] \text{ oder } 2SD + \text{Mittelwertdifferenz}$$

Die Leistung der Methode wird für akzeptabel befunden, wenn der  $TE_{obs}$  kleiner als der  $TE_a$  ist (Westgard, 2008; ASVCP, 2009, 2013a).

$$TE_{obs} < TE_a$$

Der  $TE_a$  für den Parameter Ammoniak beträgt nach den Richtlinien der American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) 20 %. Ist der  $TE_{obs}$  größer als der  $TE_a$ , ist die Methode zurückzuweisen oder es müssen weitere Anstrengungen zur Identifizierung und Korrektur von Ungenauigkeit (hoher VK) oder Unrichtigkeit (hoher Bias) der Methode unternommen werden (ASVCP, 2013a).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Proben

Von Februar 2013 bis Januar 2016 wurden im Zentrallabor der Abteilung für Innere Medizin der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen Restblutmengen von gesunden Hunden und Hunden mit portosystemischem Shunt (n = 150) im Rahmen von Routineuntersuchungen untersucht. Als Proben dienten je nach Fragestellung mit K3-EDTA oder Lithium-Heparin (im Folgenden als EDTA oder Heparin bezeichnet) versetztes Vollblut oder Plasma.

Die Blutentnahme erfolgte bei Raumtemperatur mit einer sterilen Einmalkanüle durch die Punktion der nur kurz angestauten Vena cephalica antebrachii oder der Vena saphena lateralis. Der Beginn jeder Messung lag bei unter drei Minuten nach Blutentnahme. Die Geräte für den zu evaluierenden Parameter Ammoniak befanden sich im Zentrallabor. Die Reihenfolge der Geräte (siehe auch Tabelle 1: Geräte mit Spezifikationen der Ammoniakmessung) für die schnellstmögliche Abarbeitung der Proben war wie folgt: PocketChem™ BA PA-4140 der Firma ARKRAY, Inc., FUJI DRI-CHEM NX 500i der Firma FUJIFILM Corporation, solo der Firma Eurolyser Diagnostica GmbH, scil VitroVet der Firma scil animal care company GmbH und ABX Pentra 400 der Firma HORIBA, Ltd. Das laboreigene Analysegerät ABX Pentra 400 wurde zeitgleich durch eine medizinisch-technische Mitarbeiterin des Zentrallabors bedient. Die Ammoniakmessung am PocketChem™ BA PA-4140 erfolgte aus EDTA-Vollblut, die anderen Geräte erhielten EDTA-Plasma. Proben mit sichtbarer Hämolyse, Lipämie, Ikterus oder einer Erhöhung der  $\gamma$ -Glutamyltransferase wurden ausgeschlossen.

Die Kalibrierung und Qualitätssicherung erfolgte für jedes Gerät nach Herstellerangaben. Darüber hinaus erfolgte täglich vor jedem Versuch die Überprüfung der Geräte mittels Kontrollmaterial. Für die Geräte ABX Pentra 400 und scil VitroVet wurden Reagenzien und Kontrollmaterial der Firma Labor + Technik verwendet (Tabelle 1). Die entsprechenden Materialien sind an ähnlichen Geräten (Roche Cobas, Cobas Integra®) validiert.

Tabelle 1. Die verwendeten Geräte mit Spezifikationen der Ammoniakmessung

Gerät	Analytik/ Methode	Proben- volumen	Analyse- Zeit	Reagenz	Kontrolle
<b>PocketChem</b> <sup>TM1</sup>	Trockenchemie/ Mikrodiffusion	20 µl Vollblut	3,20 Min.	Ammoniak Test Kit II <sup>TM</sup>	Trockenstreifen PA-4140
<b>FUJI</b> <sup>2</sup>	Trockenchemie/ Mikrodiffusion	10 µl Plasma	3 Min.	FUJI DRI- CHEM SLIDE NH3-PII	FUJI DRI-CHEM CONTROL QN
<b>solo</b> <sup>3</sup>	Nasschemie/ Enzymmethode	20 µl Plasma	8 Min.	solo NH3 Ammoniak- Test-Kit	solo NH3 Ammoniak- Control-Kit
<b>VitroVet</b> <sup>4</sup>	Nasschemie/ Enzymmethode	20 µl Plasma	5 Min.	LT-AM 0025 <sup>6</sup>	LT-ZA 1005 <sup>6</sup> LT-ZA 2005 <sup>6</sup>
<b>Pentra</b> <sup>5</sup>	Nasschemie/ Enzymmethode	20 µl Plasma	3,40 Min.	LT-AM 0025 <sup>6</sup>	LT-ZA 1005 <sup>6</sup> LT-ZA 2005 <sup>6</sup>

<sup>1</sup>PocketChem<sup>TM</sup> BA PA-4140, ARKRAY, Inc. Kyoto Miyuki Bldg. 10F, 689 Takanna-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8153, JAPAN, [www.arkray.co.jp](http://www.arkray.co.jp).

<sup>2</sup>FUJI DRI-CHEM NX 500i, FUJIFILM Corporation, 26-30, Nishiazabu 2-Chome, Minato-Ku, Tokyo, Japan, [www.fujifilm.com](http://www.fujifilm.com).

<sup>3</sup>solo, Eurolyser Diagnostica GmbH, Bayernstraße 11a, 5020 Salzburg, Österreich, [www.eurolyser.com](http://www.eurolyser.com).

<sup>4</sup>scil VitroVet, scil animal care company GmbH, Dina-Weissmann-Alle 6, 68519 Viernheim, Deutschland, [www.scilvet.com](http://www.scilvet.com).

<sup>5</sup>ABX Pentra 400, HORIBA, Ltd, 2 Miyahonogashi, Kisshoin, Minami-Ku Kyoto, 601-8510, Japan, [www.horiba.com](http://www.horiba.com).

<sup>6</sup>LT-SYS® Reagenz für die quantitative in vitro - Bestimmung von Ammoniak in Humanplasma an photometrischen Systemen, Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH, Robert-W.-Kempner-Straße 6, 14167 Berlin, Deutschland, [www.lt-sys.de](http://www.lt-sys.de).

## 2.2 Evaluierte Geräte und Reagenzien

Im folgenden Kapitel werden kurz die evaluierten Geräte und die verwendeten Reagenzien für die Ammoniakmessung beim Hund beschrieben.

### 2.2.1 PocketChem™ BA PA-4140



Abbildung 1. PocketChem™ BA-PA-4140;  
ARKRAY, Inc.

Der PocketChem™ BA PA-4140 (im Folgenden als PocketChem™ bezeichnet) der Firma ARKRAY, Inc. ist ein initial für den humanmedizinischen Gebrauch konzipiertes, handliches Analysegerät zur ausschließlichen Messung der Ammoniakkonzentration im Vollblut und bereits für den Hund (Sterczer et al., 1999; Goggs et al., 2008) validiert. Das Reflexionsmessgerät dient der direkten Ammoniakmessung am Patienten aus Vollblut oder aus mit Heparin oder EDTA antikoaguliertem Vollblut (Heparin-Vollblut, EDTA-Vollblut) und ist mit den Maßen von 12,4 x 0,85 x 0,38 cm und 150 g höchst kompakt. Ein eingebauter Temperatursensor hält die Temperatur konstant auf 37 °C. Die Messung erfolgt mit Hilfe der Mikrodiffusionsmethode basierend auf einem kolorimetrischen Test anhand von Teststreifen. Auf den Teststreifen werden 20 µl Vollblut von Hand pipettiert und nach 180 Sekunden erfolgt die Messung des Farbumschlags bei einer Wellenlänge von 635 nm. Die Messdauer beträgt 20 Sekunden. Kontinuierliche Messungen von bis zu zwölf Proben in 15-Sekunden-Intervallen sind ebenfalls möglich.

### Reagenz PocketChem™

Für den PocketChem™ wurde der Test AMMONIA TEST KIT II™ der Firma ARKRAY, Inc. verwendet. Der Test ist für die Ammoniakbestimmung aus frischem Vollblut sowie aus EDTA- und Heparin-Vollblut konzipiert. Grundlage ist der pH-Indikator Bromkresolgrün. Ein Teststreifen besteht aus mehreren Schichten. Die Aufnahmeschicht für die Blutprobe enthält Borsäure (42,6 mg) und Natriumhydroxid (18,7 mg). Die Anzeigeschicht enthält den Indikator Bromkresolgrün mit 4,0 mg. Es werden 20 µl Vollblut auf die Aufnahmeschicht des Teststreifens gegeben, es löst sich der Borat-Puffer, der die Schicht durchtränkt und die Probe alkalisch macht. Die Ammonium-Ionen in der Probe wechseln durch den alkalischen Zustand ihren Aggregatzustand zu Ammoniakgas. Das Ammoniakgas dringt durch die Poren des Zwischenstücks zur Anzeige und bewirkt durch den Indikator Bromkresolgrün einen Farbumschlag. Die Farbveränderung ist proportional zur Konzentration des erzeugten Ammoniakgases und der Ammoniakspiegel im Blut wird mengenmäßig durch Messung der Farbe mit Hilfe des PocketChem™ durch Einzelwellenlängen-Reflexion bei 635 nm bestimmt. Der Messbereich beträgt 7–286 µmol/l.

### 2.2.2 FUJI DRI-CHEM NX500i



Abbildung 2. FUJI DRI-CHEM NX500i; FUJIFILM Corporation.

Der FUJI DRI-CHEM NX500i (im Folgenden als FUJI bezeichnet) der Firma FUJIFILM Corporation ist ein Trockenchemiegerät, das Blut und Urin analysieren kann. Es können der kolorimetrische Endpunkt bestimmt, sowie kinetische und potentiometrische Tests durchgeführt werden. Der FUJI ist ein kompaktes Tischgerät mit den Maßen 47 x 36 x 42 cm, wiegt 24 kg und kommt in tierärztlichen Praxen und Kliniken zum Einsatz. Das Gerät kompensiert die Unterschiede der verschiedenen Chargen/Lot-Nummern der Trockenchemieplättchen einer Packung, indem es die Daten, welche auf der beiliegenden Kalibrierungskarte gespeichert sind, übernimmt. Vor dem Einlegen in den Plättchenhalter sind die im Kühlschrank gelagerten Plättchen auf Raumtemperatur zu erwärmen. Pro Probenstart können maximal 20 Plättchen (inklusive Elektrolytplättchen) in den Halter gegeben werden. Die Probe ist in Proben-Cups (0,5 ml, 1,5 ml) oder im Primärröhrchen in den Probenhalter zu stellen. Der Probenarm nimmt eine Einmalpipettenspitze auf, detektiert die Oberfläche und Konsistenz der Probe, zieht ein festgelegtes Volumen auf und pipettiert es auf das Plättchen. Im Inkubator können sich maximal zwölf kolorimetrische Plättchen und ein Elektrolyt-Plättchen gleichzeitig befinden. Die Inkubationszeit beträgt ca. fünf Minuten bei 37 °C je nach Parameter. Das Photometer (acht Wellenlängen von 400 nm bis 650 nm) unter dem Inkubator misst den Farbumschlag sowie die Reflexionen der weißen und schwarzen Referenzflächen unter den Plättchen. Das Analysegerät benötigt die Reflexionen der Plättchen sowie der Referenzflächen zusammen mit der Standardkurve und den Informationen der Kalibrierungskarte, um die Konzentration der Probe zu bestimmen. Das Potentiometer unter dem Inkubator wird für die Elektrolytmessungen (Natrium, Kalium und Chlorid) verwendet. Gebrauchte Plättchen und Pipettenspitzen entsorgen sich automatisch über den Abfallbehälter. Probenröhrchen müssen von Hand entfernt werden. Das Analysegerät hat einen Durchlauf von 128 Tests pro Stunde, wobei gleichzeitig kolorimetrische- und Elektrolyt-Tests messbar sind.

### Reagenz FUJI

Als Reagenz wurde das Testdia FUJI DRI-CHEM SLIDE NH<sub>3</sub>-PII der Firma FUJIFILM Corporation verwendet. Der Test ist für die Ammoniakbestimmung aus humanem Heparin- und EDTA-Plasma entwickelt. Als Grundlage dient der pH-Indikator Bromphenolblau. Das Testdia besteht aus folgenden Schichten: Verteilungsschicht, Reaktionsschicht, gasdurchlässige Schicht, Nachweisschicht und transparente Trägerschicht. Als Farbindikator dient Bromphenolblau mit 0,026 µmol pro Dia. Der FUJI pipettiert 10 µl Plasma auf das Testdia. Die Probe breitet sich auf der Verteilungsschicht aus und diffundiert in die darunterliegende Reaktionsschicht, wobei gelöste Ammonium-Ionen reagieren und Ammoniakgas erzeugen. Das Ammoniakgas dringt durch eine gasdurchlässige Schicht und bewirkt durch den Farbindikator Bromphenolblau in der Nachweisschicht einen Farbumschlag. Die optische Reflexionsdichte wird bei 600 nm gemessen. Die optische Reflexionsdichte wird durch eine in den FUJI vorinstallierte Kalibrationskurve in die entsprechende Ammoniakkonzentration konvertiert. Der Messbereich beträgt 7–357 µmol/l.

### 2.2.3 solo



Abbildung 3. solo; Firma Eurolyser Diagnostica GmbH.

Der solo der Firma Eurolyser Diagnostica GmbH ist ein nasschemisches Analysegerät zur quantitativen Bestimmung einzelner klinisch-chemischer Parameter für den veterinärmedizinischen Gebrauch. Das Laborphotometer kann Endpunkttests sowie Kinetiktests analysieren. Es ist mit den Abmessungen 26 x 14,5 x 14 cm und einem Gewicht von 3,5 kg sehr kompakt und wurde als Point-of-Care Messgerät für die Veterinärmedizin konzipiert. Das Instrument ist mit einem Kartenlesemodul zur Funkidentifikation (Radio Frequency Identification, RFID) ausgestattet, welches die zum Betrieb notwendigen RFID-Karten aus den Testpackungen des jeweiligen Testanbieters ausliest. Auf den RFID-Karten sind neben den Chargen/LOT- und Kalibrationsdaten auch die testspezifischen Arbeitsschritte hinterlegt. Aufgrund der Daten arbeitet das Gerät den Test automatisch ab. Zur Messung wird das Gerät mit einer Küvette, in der das Reagenz des jeweiligen Reagenzienanbieters abgefüllt ist, bestückt. Die Probe wird per Hand in die Küvette pipettiert und anschließend von dem Gerät automatisch mit dem Reagenz vermischt. Das Photometer temperiert sich auf  $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Es misst die Absorption des Lichtstrahles, die mathematisch in das Messresultat überführt und auf dem Touch-Display zu sehen ist. Anschließend erfolgt ein automatisches Öffnen der Testklappe und die Küvette kann von Hand entnommen werden. Nach Bestätigung des Ergebnisses ist das Gerät bereit für eine neue Messung. Das Gerät führt nur Einzelmessungen durch. Die Messdauer für den Parameter Ammoniak beträgt circa acht Minuten.

### **Reagenz solo**

Als Reagenz wurde das solo NH<sub>3</sub> Ammoniak-Test-Kit der Firma Eurolyser Diagnostica GmbH verwendet, welches ausschließlich für die Analyse von Hunde- und Katzenblut konzipiert ist. Es handelt sich um einen enzymatischen Farbtest zur Bestimmung von Ammoniak aus EDTA-Plasma. Die genaue Zusammensetzung wird vom Hersteller zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit nicht angegeben. Der Messbereich beträgt 10–1100 µmol/l.

### 2.2.4 scil VitroVet



Abbildung 4. scil VitroVet; scil animal care company GmbH.

Der scil VitroVet (im Folgenden als VitroVet bezeichnet) der scil animal care company GmbH ist ein neues, vollautomatisches, nasschemisches Gerät für Analysen mittels Photometrie und Potentiometrie. Momentan sind 30 Reagenzien am VitroVet für die Tierarten Hund, Katze und Pferd validiert, allerdings nicht Ammoniak. Zur Diagnostik klinisch-chemischer Parameter dienen Vollblut, Serum, Plasma und Urin. Das Gerät wiegt 45 kg mit den Maßen von 79 x 58 x 54 cm. Für die Bedienung wird zusätzlich ein Computer benötigt (mit den Betriebssystemen Windows 2000, XP oder Vista sowie Bildschirm, Drucker, Maus und Tastatur). Das Gerät hat einen Reagenzienteller mit 30 Positionen, wobei es möglich ist, unter Verwendung von doppelt gekammerten Reagenzbehältern 60 verschiedene Reagenzien zu verwenden. Der Reagenzienteller kühlt 8–10 °C niedriger als Raumtemperatur. Der Probenenteller hat 40 Positionen für Proben und zehn Positionen für Standards und Kontrollseren. Das Probenahmesystem besteht aus einer Sonde, die erst das Reagenz und dann die Probe aufnimmt und sie anschließend in eine Messküvette abgibt. Das Analysemodul besteht aus einem Karussell mit 50 Plastikkuvetten, die auf 37 °C ± 0,5 °C geheizt und nach Gebrauch durch eine automatische Waschstation gereinigt werden. Das Photometer misst monochromatisches Licht und verfügt über neun Wellenlängen von 340–700 nm. Das Analysegerät hat einen maximalen Durchsatz von 240

Tests pro Stunde. Für den VitroVet ist zusätzlich ein ionenselektives Elektrodenmodul zur Messung von Lithium, Natrium, Kalium und Chlorid erhältlich. Das verwendete Reagenz für die Ammoniakmessung am VitroVet ist im folgenden Abschnitt aufgeführt.

### 2.2.5 Vergleichsgerät ABX Pentra 400



Abbildung 5. ABX Pentra 400, HORIBA, Ltd.

Der ABX Pentra 400 (im Folgenden als Pentra bezeichnet) der Firma HORIBA, Ltd. ist ein vollautomatisiertes, nasschemisches Gerät für Analysen mittels Kolorimetrie, Turbidimetrie und Potentiometrie. Ursprünglich für den humanen Gebrauch konzipiert, ist er bereits für zahlreiche veterinärmedizinische klinisch-chemische Parameter (ausgenommen Ammoniak) validiert und wird in großen veterinärmedizinischen Laboratorien verwendet, so auch im Zentrallabor des Klinikums Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen. Der Pentra dient in dieser Arbeit als Vergleichsgerät. Das Gerät ist in erster Linie für in-vitro-Analysen homogener Proben wie Serum, Plasma, Urin und Vollblut konzipiert. Der Pentra wiegt 120 kg mit den Abmessungen 101 x 71 x 63 cm, die Kühleinheit wiegt zusätzlich 35 kg bei einer Größe von 29 x 42 x 40 cm. Das Analysegerät beinhaltet einen Reagenzienteller mit 52 Positionen, wovon 44 gekühlt sind (4–8 °C) und acht Raumtemperatur aufweisen. Der Probenenteller kann bis zu 60 Probenpositionen fassen. Das Messsystem besteht aus einer Reagenziennadel, die das Reagenz auf 37 °C ± 0,5 °C vorwärmt und Fibrin erkennt, aus einer

Probennadel, zwei Waschtürmen (einer für jede Nadel) und, jeweils zur Überprüfung der aufgenommenen Volumina, einer Reagenzienspritze sowie einer Probenspritze. Das Analysemodul besteht aus einem automatischen Küvettenwechsler mit einem Fassungsvermögen von bis zu 30 neuen und 30 gebrauchten Küvettensegmenten (ein Küvettensegment enthält zwölf Küvetten), einem Reaktionsteller, der bis zu sechs Küvettensegmente aufnehmen kann und diese mittels Umluft auf  $37\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$  heizt, einem Mischer mit eigenem Waschturm und einem Spektrophotometer, das über 15 Wellenlängen von 340–700 nm verfügt. Das Messprinzip beruht auf der parallelen dichromatischen oder monochromatischen Messung des Lichts, das bei bestimmten Wellenlängen absorbiert wird. Die Messtechnologie besteht aus der Kolorimetrie und der Turbidimetrie. Das Analysegerät beinhaltet außerdem ein ionenselektives Elektrodenmodul (ISE-Modul), bestehend aus drei ionenselektiven Elektroden zur Bestimmung der Natrium-, Kalium- und Chloridkonzentration sowie einer Referenzelektrode. Die Messtechnologie ist hier die Potentiometrie. Das Analysegerät hat einen Durchsatz von 300 Tests pro Stunde ohne ISE-Modul und bis zu 420 Tests pro Stunde mit ISE-Modul.

### Reagenz VitroVet und Pentra

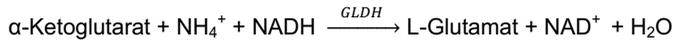
Für die Analysegeräte VitroVet und Pentra wurde das Reagenz LT-AM 0025 der Firma Labor + Technik verwendet. Es handelt sich um einen enzymatischen Farbttest zur Bestimmung von Ammoniak aus humanem Plasma. Zusätzlich ist ein Standard für die Kalibration enthalten.

Das Reagenz besteht aus folgenden Komponenten:

Reagenz	
Trispuffer, pH 8,7 (20 °C)	(100 mmol/l)
$\alpha$ -Ketoglutarat	(7,5 mmol/l)
NADH	(> 0,2 mmol/l)
LDH	( $\geq$ 30000 U/l)
GLDH	( $\geq$ 4000 U/l)
Standard	
Ammoniumsulfat	294 $\mu$ mol/l

Methode:

In Anwesenheit von Nicotinamidadenindinukleotid in reduzierter Form (NADH) werden Ammonium-Ionen ( $\text{NH}_4^+$ ) von der Glutamatdehydrogenase (GLDH) auf  $\alpha$ -Ketoglutarat unter Bildung von L-Glutamat und NAD übertragen. Die Abnahme von NADH wird gemessen. Die Extinktionsabnahme bei 340 nm ist proportional der  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration der Probe.



Das Reagenz enthält einen Überschuss an Laktatdehydrogenase (LDH), sodass endogene Pyruvate schnell reduziert werden und nicht mit dem Test interferieren. Der Messbereich beträgt 14,7–1000  $\mu\text{mol/l}$ .

## 2.3 Methodvalidierung

Die Methodvalidierung erfolgt nach den ASVCP-Qualitätskontrollrichtlinien und die Entscheidung über eine akzeptable Geräteleistung richtet sich nach dem  $\text{TE}_a$ . Der  $\text{TE}_a$  für den Parameter Ammoniak beträgt 20 % und ist den ASVCP-Richtlinien Allowable Total Error von März 2013 entnommen.

### 2.3.1 Linearitätsstudie

Aufgrund der Instabilität des Parameters Ammoniak wurden keine Patientenproben verwendet. Zur Ermittlung der Linearität (Messbereich) diente das Reagenz LT-AM 0025 der Firma Labor + Technik mit 294  $\mu\text{mol/l}$  Ammoniumsulfat und Aqua bidestillata. Die niedrigste Konzentration (Level 1) stellte das bidestillierte Wasser, die höchste Konzentration (Level 5) stellte die Standardlösung dar. Drei zusätzliche Level wurden durch die Verdünnung von Level 5 mit Level 1 hergestellt (Level 2: 25 % von Level 5, Level 3: 50 % von Level 5, Level 4: 75 % von Level 5). Jeder Level wurde dreimal und in aufsteigender Reihenfolge gemessen. Eine Wiederholung mit zusätzlichen Konzentrationsstufen erfolgte für den PocketChem<sup>TM</sup>, da dieser initial lediglich zwei Level innerhalb seines Messbereiches detektierte.

### 2.3.2 Replikationsstudie

Die Präzision innerhalb der Serie (Kurzzeitreplikationsstudie) wurde mit Patientenproben im mittleren und hohen Konzentrationsbereich durch zehn aufeinanderfolgende Messungen ermittelt. Die Überprüfung der Geräte war sowohl zeitlich als auch von den Patientenproben unabhängig. Da die Präzision außerhalb der Serie (Langzeitreplikationsstudie) an möglichst 20 aufeinanderfolgenden Tagen durchzuführen ist, der Parameter Ammoniak aber nur kurze Zeit stabil ist, wurde diese anhand der täglichen Qualitätskontrolle von 20 verschiedenen Tagen ermittelt.

### 2.3.4 Interferenzstudie Ikterus, Hämolyse und Lipämie

Die Interferenzstudie von Ikterus, Hämolyse und Lipämie erfolgte durch die in hoher Anzahl benötigte Probenmenge anhand von gepooltem EDTA-Vollblut für den PocketChem™ und gepooltem EDTA-Plasma für die anderen Geräte. Die Überprüfung der Geräte fand zeitlich unabhängig voneinander statt. Das Alter der Poolproben betrug unter einer Stunde. Anhand des VK aus der Kurzzeitreplikationsstudie betrug die errechnete Anzahl an Replikaten für die einzelnen Geräte zwischen zwei und 13, sodass die entsprechende Anzahl von Wiederholungsmessungen erfolgte. Aufgrund des hohen VK und der hieraus folgenden zu hohen Anzahl von Replikaten war der solo von dem Versuch ausgeschlossen. Zu Beginn erfolgte die Messung der Probe ohne interferierende Substanz (Blankprobe), um den Ausgangswert der Ammoniakkonzentration zu bestimmen. Anschließend sind die Poolproben mit den interferierenden Substanzen in je zwei unterschiedliche, klinisch relevante Konzentrationen versetzt worden (Spikeproben). Zur Nachempfindung von Hämolyse wurde Hemoglobin from bovine blood der Firma SIGMA-Aldrich® verwendet. Die Hämoglobinkonzentration der oberen Spikeprobe betrug 5 g/l und die der unteren 3 g/l. Für die Lipämie wurde Intralipid® der Firma gentian<sup>CE</sup> verwendet. Die Lipidkonzentration der oberen Spikeprobe betrug 10 g/l und die der unteren 4 g/l. Um ikterische Proben nachzustellen, wurde Bilirubin Conjugate von der Firma CALBIOCEM® verwendet. Die Lipidkonzentration der oberen gespikten Probe betrug 800 mg/l und die der unteren 200 mg/l.

### 2.3.5 Lagerungsstudie

Präanalytische Faktoren haben einen großen Einfluss auf die Ammoniakbestimmung, weshalb eine Überprüfung des Einflusses von Lagerungsdauer bei Kühlschranktemperatur (4 °C) sowie bei Raumtemperatur (20 °C) erfolgte. Aufgrund des hohen Probenvolumens und der ausschließlichen Verwendung von Restblutmengen fand die Überprüfung an den Geräten unabhängig voneinander statt. Es erfolgten Dreifachmessungen zu den Zeitpunkten null (direkt nach Entnahme) sowie 30, 60 und 120 Minuten nach Blutentnahme. Jedes Gerät erhielt ein Aliquot, das nach den einzelnen Messungen luftdicht verschlossen und bei der jeweiligen Temperatur gelagert wurde.

### 2.3.6 Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA

Wie bereits erwähnt, ist beim PocketChem™ und FUJI nach Herstellerangaben die Ammoniakmessung aus Heparin- und EDTA-Vollblut beziehungsweise Plasma möglich. Für den solo und die am VitroVet und Pentra verwendeten Reagenzien wird die ausschließliche Verwendung von EDTA-Plasma empfohlen. Zur Überprüfung des Einflusses von Heparin und EDTA auf den Parameter Ammoniak erfolgten zehn bis 14 von den Geräten zeitlich unabhängige Einzelmessungen unterschiedlicher Patientenproben mit den entsprechenden Antikoagulanzen im Wechsel. Wurde zuerst das Probenröhrchen mit Heparin abgenommen, fand die Messung zuerst statt und umgekehrt.

### 2.3.7 Methodenvergleich

Für den Methodenvergleich wurden 43 Patientenproben mit niedriger, mittlerer und hoher Ammoniakkonzentration in Form von Doppelmessungen an den fünf Geräten in der bereits oben erwähnten Reihenfolge und Vorgehensweise verglichen. Als Vergleichsmethode diente der Pentra. Der Konzentrationsbereich der Proben bewegte sich, gemessen an der Vergleichsmethode, innerhalb des Messbereichs der Geräte-Herstellerangaben beziehungsweise der verwendeten Reagenzien. Proben mit Hämolyse, Ikterus, Lipämie oder einer Erhöhung der  $\gamma$ -Glutamyltransferase waren vom Versuch ausgeschlossen.

## 2.4 Statistische Auswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit den Programmen Excel 2010, Version 14.0, Analyse-it<sup>®</sup>, Version 2.30, Excel12+ und GraphPadPrism, Version 6.0.

### 2.4.1 Linearität

Für den Linearitätsversuch wurde der Durchschnitt der gemessenen Werte mit den berechneten Werten der verschiedenen Konzentrationsstufen optisch und mittels Regressionsanalyse verglichen. Für eine akzeptable Leistung musste die prozentuale Abweichung vom gemessenen zum berechneten Wert kleiner als der  $TE_a$  sein.

### 2.4.2 Replikationsstudie

Zur statistischen Prüfung der Präzision innerhalb und außerhalb der Serie wurden der M, die SD und der VK berechnet. Als Beurteilungskriterium diente ebenfalls der zulässige Gesamtfehler für den Parameter Ammoniak von 20 %, wobei dieser nicht zu überschreiten ist ( $SD < TE_a$ ). Zum Vergleich mit dem  $TE_a$  erfolgte die Umrechnung der SD in Prozent.

### 2.4.3 Interferenzstudie Ikterus, Hämolyse und Lipämie

Es erfolgte die Berechnung von M, SD, VK, die absolute Abweichung (Bias in  $\mu\text{mol/l}$ ) von Spikeprobe zur Blankprobe sowie deren prozentuale Abweichung (Bias in %). Eine Interferenz mit der Ammoniakmessung lag vor, wenn der Bias über dem  $TE_a$  lag.

### 2.4.4 Lagerungsstudie

Berechnet wurden die Mittelwerte, die Standardabweichungen, die Variationskoeffizienten sowie die prozentualen Abweichungen zum Ausgangswert (Zeitpunkt null). Der  $TE_a$  diente auch hier als Beurteilungskriterium. Die prozentuale Abweichung der Messwerte vom Ausgangswert sollte den  $TE_a$  von 20 % für den Parameter Ammoniak nicht übersteigen. Die Signifikanz der Effekte (Temperatur, Zeit) sowie deren Wechselwirkung wurde mittels zweifaktorieller

Varianzanalyse ermittelt und die Interpretation der Signifikanz erfolgte anschließend durch den Tukey- und den Sidak-Test.

#### **2.4.5 Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA**

Die maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 5 % (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ). Zur Überprüfung einer normalen Verteilung diente der Shapiro-Wilk-Test. Die Überprüfung zur Gleichheit einer zentralen Tendenz der beiden Antikoagulanzen erfolgte mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (die Mediane unterschieden sich signifikant, wenn  $p < 0,05$ ). Außerdem wurde die prozentuale Abweichung innerhalb der Patientenproben sowie der Mittelwert der prozentualen Abweichung berechnet.

Der solo wurde aufgrund des erhöhten zufälligen Fehlers (erhöhte Ungenauigkeit) aus der Replikationsstudie und den hier geplanten Einzelmessungen nicht berücksichtigt.

#### **2.4.6 Methodenvergleich**

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte durch den Shapiro-Wilk-Test. Wenn sich der p-Wert über dem Signifikanzniveau ( $\alpha = 0,05$ ) befand, lag eine Normalverteilung vor. Die Daten waren nicht normalverteilt, sodass zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ( $r_s$ ) berechnet wurde. Mittels Regressionsanalyse nach Passing-Bablok wurde die Geradengleichung mit den jeweiligen 95 %-Konfidenzintervallen ermittelt. Außerdem wurde ein Differenzdiagramm nach Bland-Altman erstellt, in dem der Bias und der  $TE_a$  ersichtlich waren.

Als abschließendes Kriterium der Akzeptabilität der Geräte galt:  $TE_{obs} < TE_a$ . Die Berechnung des  $TE_{obs}$  war wie folgt: zwei Mal VK [%] geteilt durch Bias [%]. Aufgrund des hohen Bias aus dem Methodenvergleich wurde, um den Einfluss des zufälligen Fehlers der Vergleichsmethode auszuschließen, ebenfalls der berechnete Bias aus der Langzeitreplikationsstudie herangezogen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Linearitätsstudie

In Abbildung 6 werden die Ergebnisse der Linearitätsstudie der einzelnen Geräte (A = PocketChem™, B = FUJI, C = solo, D = VitroVet, E = Pentra) anhand der Geradengleichung, ermittelt aus den berechneten Werten der fünf Ammoniakkonzentrationsstufen (x-Achse) und den Mittelwerten (n = 3) der gemessenen Werte (y-Achse), graphisch dargestellt. Es gilt, den TE<sub>a</sub> von 20 % für den Parameter Ammoniak nicht zu überschreiten.

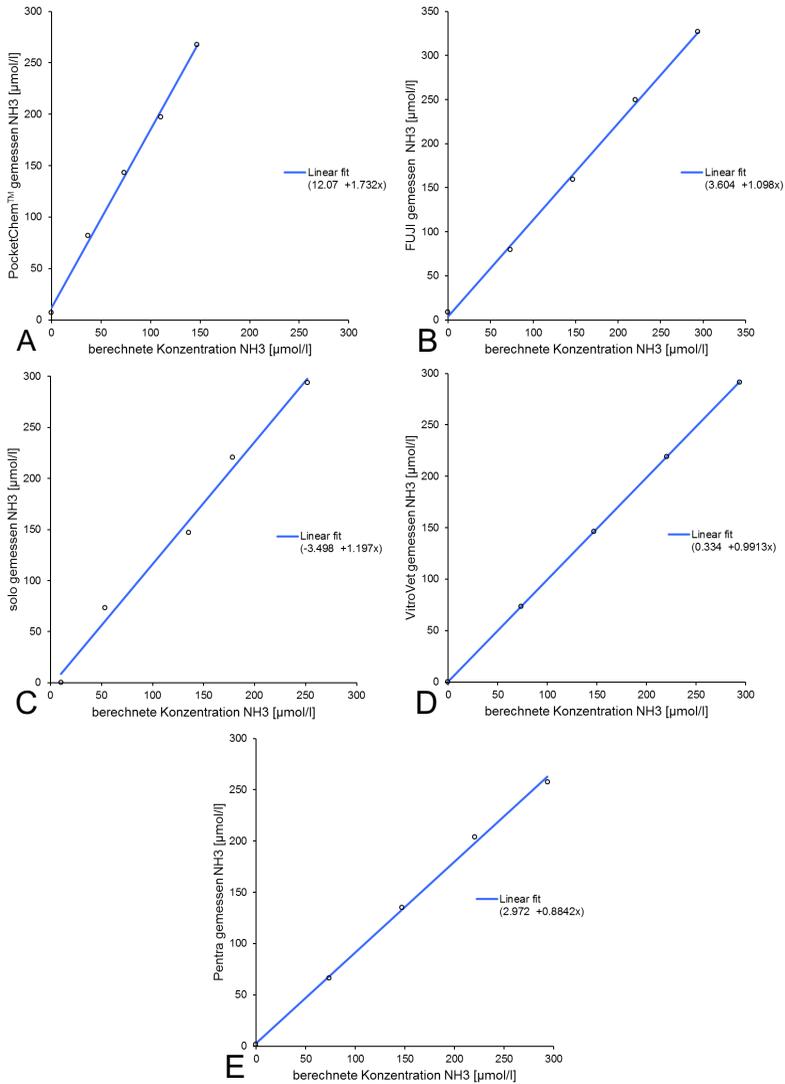


Abbildung 6. Ammoniakmessbereich der Geräte, A = PocketChem™, B = FUJI, C = solo, D = VitroVet, E = Pentra. Die fünf berechneten Konzentrationsstufen (x-Achse) sind aufgetragen gegen die Mittelwerte (n = 3) der gemessenen Werte (y-Achse). Gerät A überschreitet den zulässigen Gesamtfehler ( $TE_a = 20\%$ ) über den gesamten Konzentrationsbereich, D zeigt eine exzellente Linearität, C zeigt eine Überschreitung des  $TE_a$  bei Level 2 (73,5 µmol/l), B und E haben eine gute Linearität und überschreiten den  $TE_a$  nicht (ASVCP, 2013a).

Der PocketChem™ (Abbildung 2, A) übersteigt konstant in allen Konzentrationsleveln den  $TE_a$ . Das Analysegerät FUJI (Abbildung 2, B) zeigt, je nach Konzentrationsstufe, eine Messabweichung von 8–13 % oberhalb der berechneten Level. Der  $TE_a$  wird nicht überschritten. Der solo (Abbildung 2, C) überstieg bei Konzentrationslevel zwei (73,5  $\mu\text{mol/l}$ ) mit 27 % den  $TE_a$ . Die Messwerte der übrigen Konzentrationslevel unterschätzen zwar den berechneten Wert je nach Level um 8–19 %, befinden sich aber noch innerhalb der Mindestanforderung für den Parameter Ammoniak. In der Linearitätsstudie zeigt der ermittelte Messbereich des VitroVet eine exzellente Übereinstimmung mit dem berechneten Messbereich (Abbildung 2, D). Er ist mit der Geradengleichung von  $y = 0,99x + 0,33$  nahe an der gewünschten Steigung von 1 und dem gewünschten Achsenabschnitt von 0. Visuelle Ausreißer sind nicht vorhanden und die prozentuale Abweichung aller fünf Konzentrationsstufen ist kleiner als 1 % und so deutlich kleiner als der  $TE_a$  von 20 % für den Parameter Ammoniak. Das Vergleichsgerät Pentra (Abbildung 2, E) hat je nach Konzentrationslevel eine Messabweichung von 7–13 % unterhalb der berechneten Werte, befindet sich aber innerhalb des Akzeptabilitätskriteriums für den Parameter Ammoniak.

Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Linearitätsstudie unter Angabe der genauen Zahlenwerte sowie zusätzlich die Ergebnisse der Korrelationsanalyse unter Angabe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman ( $r_s$ ). Eine Wiederholung des Versuchs mit neu berechneten Konzentrationsstufen erfolgte für den PocketChem™, da dieser initial lediglich zwei Level innerhalb seines Messbereichs detektierte.

Tabelle 2. Linearitätsstudie der Geräte anhand unterschiedlicher Ammoniakkonzentrationslevel

Gerät Messung Ammoniak [ $\mu\text{mol/l}$ ]/ Berechnung	PocketChem™		FUJI		solo		VitroVet		Pentra	
	berechnete Konz.	Mittelwert gemessen								
Level 1	0,00	7	0,00	8,67	10,00	0,01	1,60			
Level 2	36,70	82	73,50	79,67	53,33	73,57	66,43			
Level 3	73,50	143	147,00	159,67	135,33	146,10	134,90			
Level 4	110,25	197,33	220,50	250,00	178,33	218,97	204,10			
Level 5	147,00	267,66	294,00	327,00	251,67	291,60	257,70			
$r_s$		1		1	1	1	1			
Steigung		1,73		1,10	1,20	0,99	0,88			
Achsenabschnitt		12,07		3,60	-3,50	0,33	2,97			
Abweichung < $TE_a$		n.b.		Ja	Nein	Ja	Ja			

Anmerkung.  $n = 3$ -fach-Messungen, PocketChem™: konstante Überschreitung aller Level, solo: Überschreitung des  $TE_a$  bei Level 2. Abkürzungen: Abweichung = prozentuale Abweichung gemessene Ammoniakkonzentration zur berechneten, berechnete Konz. = berechnete Ammoniakkonzentration, Level 1–5 = angefertigte Konzentrationen aus Ammoniakstandardlösung LT-AM 0025 der Firma Labor + Technik, n.b. = nicht beurteilbar auf Grund des konstanten systematischen Fehlers,  $r_s$  = Korrelationskoeffizienten nach Spearman,  $TE_a$  = zulässiger Gesamtfehler für Ammoniak 20 % (ASVCP, 2013a).

Zusammengefasst zeigt der VitroVet eine exzellente Linearität mit einer unteren Nachweisgrenze von  $0,01 \mu\text{mol/l}$  und einer oberen Nachweisgrenze von  $291,60 \mu\text{mol/l}$ . Die Analysegeräte Pentra und FUJI haben eine gute Linearität, wobei der Pentra die berechneten Konzentrationen leicht unterschätzt und der FUJI sie leicht überschätzt. Die untere und obere Nachweisgrenze des Pentra beträgt  $1,60$  und  $257,70 \mu\text{mol/l}$ , die des FUJI liegt bei jeweils  $8,67$  und  $327 \mu\text{mol/l}$ . Die Geräte solo und PocketChem™ erfüllen die Linearitätskriterien, wie in Tabelle 2 aufgeführt, nicht beziehungsweise nur eingeschränkt. Die untere und obere Nachweisgrenze des solo ist  $10$  und  $251,67 \mu\text{mol/l}$ , die des PocketChem™ beträgt jeweils  $7$  und  $267,66 \mu\text{mol/l}$ . Durch das verwendete Ammoniakstandardreagenz (LT-AM 0025, Labor + Technik) ist die obere Nachweisgrenze (Level 5) auf  $294 \mu\text{mol/l}$  beschränkt. Die niedrigste Ammoniakkonzentration (Level 1) beträgt  $0 \mu\text{mol/l}$ .

## 3.2 Replikationsstudie

### 3.2.1 Kurzzeitreplikationsstudie

Die Daten der Kurzzeitreplikationsstudie (Präzision innerhalb der Serie) sind anhand von Patientenblutproben mit mittleren (Level 1) und hohen (Level 2) Ammoniakkonzentrationen erstellt. Die Messungen an den Geräten erfolgte zeitlich und auch von den Patientenproben unabhängig. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden in Tabelle 3 (Level 1) und Tabelle 4 (Level 2) jeweils die Mittelwerte der zehn Wiederholungsmessungen aufgeführt, gefolgt von den Standardabweichungen, den Variationskoeffizienten und dem Akzeptabilitätskriterium ( $SD < TE_a$ ) für jedes Gerät. Der  $TE_a$  für Ammoniak beträgt nach ASVCP 20 %.

Tabelle 3. Kurzzeitreplikationsstudie der Geräte anhand von Patientenproben mit mittleren (Level 1) Ammoniakkonzentrationen

Level 1	PocketChem™	FUJI	solo	VitroVet	Pentra
M [ $\mu\text{mol/l}$ ]	55,10	63,40	60,10	38,53	75,49
SD [ $\mu\text{mol/l}$ ]	4,20	1,35	10,89	2,74	4,13
VK [%]	7,63	2,13	18,12	7,10	5,47
SD [%] < TE <sub>a</sub> [%]	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja

Anmerkung. n = 10-fach-Messungen, der solo überschreitet bei Level 1 den TE<sub>a</sub>. Abkürzungen: M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, TE<sub>a</sub> = zulässiger Gesamtfehler für Ammoniak 20 %, VK = Variationskoeffizient (ASVCP, 2013a).

Tabelle 4. Kurzzeitreplikationsstudie der Geräte anhand von Patientenproben mit hohen (Level 2) Ammoniakkonzentrationen

Level 2	PocketChem™	FUJI	solo	VitroVet	Pentra
M [ $\mu\text{mol/l}$ ]	107,40	149,10	210,00	120,86	161,90
SD [ $\mu\text{mol/l}$ ]	8,41	1,85	37,29	3,74	11,44
VK [%]	7,83	1,24	17,76	3,10	7,07
SD [%] < TE <sub>a</sub> [%]	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Anmerkung. n = 10-fach-Messungen, alle Geräte erfüllen das Akzeptabilitätskriterium SD < TE<sub>a</sub>. Abkürzungen: M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, TE<sub>a</sub> = zulässiger Gesamtfehler für Ammoniak 20 %, VK = Variationskoeffizient (ASVCP, 2013a).

Die Ergebnisse aus Tabelle 3 und 4 zeigen, dass der ermittelte VK des FUJI mit 1,24 % (Level 2) und 2,13 % (Level 1) exzellent ist. Die berechnete SD im mittleren und hohen Konzentrationsbereich liegt mit jeweils 1,35 und 1,85  $\mu\text{mol/l}$  umgerechnet in Prozent deutlich unter dem TE<sub>a</sub> von 20 % für den Parameter Ammoniak. Die Geräte Pentra (Vergleichsgerät), VitroVet und PocketChem™ weisen mit 3,1 bis 7,83 % einen guten VK auf und auch die SD mit 2,74 bis 11,4  $\mu\text{mol/l}$  befindet sich innerhalb des geforderten Akzeptabilitätskriteriums. Der solo zeigt bei Level 2 einen VK von 17,76 % und bei Level 1 einen VK von 18,12 %. Der VK von Level 1 und die dazugehörige SD überschreiten den TE<sub>a</sub> für Ammoniak.

### 3.2.2 Langzeitreplikationsstudie

Die Messwerte der Langzeitreplikationsstudie (Präzision außerhalb der Serie) sind mit Kontrollmaterial (detailliert aufgeführt im Kapitel „Material und Methoden“) erstellt. In Tabelle 5 wird der M aus 20 Einzelmessungen von 20 verschiedenen Tagen angegeben. Der jeweilige Zielwert entspricht dem des verwendeten Kontrollmaterials. Des Weiteren sind die jeweilige SD, der VK und das anschließende Akzeptabilitätskriterium SD kleiner  $TE_a$  angegeben.

Tabelle 5. Langzeitreplikationsstudie der Geräte anhand von Ammoniakkontrollmaterial

Langzeit-Replikation	PocketChem™	FUJI	solo	VitroVet	Pentra
Zielwert [ $\mu\text{mol/l}$ ]	72	60	47	157	157
M [ $\mu\text{mol/l}$ ]	71,95	60,15	52,35	151,97	150,65
SD [ $\mu\text{mol/l}$ ]	1,32	2,16	6,11	7,09	5,20
VK [%]	1,83	3,59	11,67	4,67	3,45
SD [%] < $TE_a$ [%]	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

*Anmerkung.* n = 20 Messungen über 20 Tage, der Zielwert entspricht den Herstellerangaben des Ammoniakkontrollmaterials, alle Geräte befinden sich innerhalb des  $TE_a$ . Abkürzungen: M = Mittelwert, SD = Standardabweichung,  $TE_a$  = zulässiger Gesamtfehler für Ammoniak 20 %, VK = Variationskoeffizient (ASVCP, 2013a).

Der PocketChem™ zeigt in Tabelle 5 einen VK von 1,83 % mit einer SD von 1,32  $\mu\text{mol/l}$  und somit präzisere Werte als in der Replikationsstudie innerhalb der Serie. Die Geräte Pentra, FUJI und VitroVet zeigen eine gute Präzision mit einem VK von jeweils 3,45 %, 3,59 % und 4,67 %. Der solo hat mit 11,67 % den höchsten VK, befindet sich aber mit den anderen Geräten innerhalb des geforderten Akzeptabilitätskriteriums SD kleiner  $TE_a$ .

### 3.3 Interferenzstudie Ikterus, Hämolyse und Lipämie

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der häufig vorkommenden Interferenzen Ikterus, Hämolyse und Lipämie und deren Einfluss auf die Ammoniakmessung an den Geräten PocketChem™, FUJI, VitroVet und Pentra in den Tabellen 6–9 nacheinander aufgeführt. Das Analysegerät solo ist bei diesem Versuch aufgrund des erhöhten zufälligen Fehlers (erhöhte Ungenauigkeit), ermittelt in der

Replikationsstudie und der dadurch benötigten erhöhten Anzahl an Mehrfachmessungen, nicht berücksichtigt. Die Poolproben (EDTA-Vollblut PocketChem™, EDTA-Plasma übrige Geräte) erhalten pro interferierendem Substrat zwei klinisch relevante Konzentrationen (Spikeproben). Es erfolgt die Berechnung von M, SD, VK sowie der absoluten Differenz (Bias in  $\mu\text{mol/l}$ ) und der prozentualen Differenz (Bias in %) zum Ausgangswert der jeweiligen Blankproben. Es liegt eine Interferenz vor, wenn der Bias in % größer als der erlaubte  $\text{TE}_a$  für den Parameter Ammoniak ist.

Tabelle 6. Interferenzstudie PocketChem™ für den Parameter Ammoniak anhand hoher und niedriger, klinisch relevanter Konzentration von Bilirubin, Hämoglobin und Intralipid®

PocketChem™	Bilirubin		Hämoglobin		Intralipid®	
Interferenz [mg/dl]	80	20	500	300	1000	400
M Blank [ $\mu\text{mol/l}$ ]	31,69	31,69	31,69	31,69	31,69	31,69
M Spike [ $\mu\text{mol/l}$ ]	53,31	48,08	115,31	89,46	40,77	33,46
Bias [ $\mu\text{mol/l}$ ]	21,62	16,39	83,62	57,77	9,08	1,77
Bias [%]	68,22	51,72	263,87	182,30	28,65	5,59
Bias > $\text{TE}_a$	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein

Anmerkung. n = 13-fach-Messung, nur Intralipid® mit 400 mg/dl verursacht keine Interferenz. Abkürzungen: M Blank = Mittelwert Blankprobe, M Spike = Mittelwert Spikeprobe,  $\text{TE}_a$  = zulässiger Gesamtfehler für Ammoniak 20 % (ASVCP, 2013a).

Die Ammoniakmessung am PocketChem™ (Tabelle 6) wird besonders stark durch Hämoglobin gestört, die Abweichung beträgt selbst bei der niedrigen Hämoglobinkonzentration (300 mg/dl) 182,30 %. Die niedrigste Störung durch Bilirubin (20 mg/dl) beträgt 51,72 %. Nur die niedrige Konzentration von Intralipid® (400 mg/dl) stört die Ammoniakmessung nicht. Die Standardabweichungen betragen zwischen 1,85 und 9,11  $\mu\text{mol/l}$  und die Variationskoeffizienten liegen zwischen 4,69 und 14,48 %.

Tabelle 7. Interferenzstudie FUJI für den Parameter Ammoniak anhand hoher und niedriger, klinisch relevanter Konzentration von Bilirubin, Hämoglobin und Intralipid®

FUJI	Bilirubin		Hämoglobin		Intralipid®	
Interferenz [mg/dl]	80	20	500	300	1000	400
M Blank [µmol/l]	53,40	53,40	33,80	33,80	33,80	33,80
M Spike [µmol/l]	63,80	61,20	111,40	79,20	46,00	36,60
Bias [µmol/l]	10,40	7,80	77,60	45,40	12,20	2,80
Bias [%]	19,48	14,61	229,59	134,32	36,09	8,28
Bias > TE <sub>a</sub>	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein

Anmerkung. n = 5-fach-Messung, Bilirubin und Intralipid® 400 mg/dl verursachen keine Interferenz. Abkürzungen: M Blank = Mittelwert Blankprobe, M Spike = Mittelwert Spikeprobe, TE<sub>a</sub> = zulässiger Gesamtfehler für Ammoniak 20 % (ASVCP, 2013a).

Tabelle 7 zeigt ebenfalls einen starken Einfluss des Hämoglobins auf die Ammoniakmessung am FUJI, wobei selbst die untere Hämoglobinkonzentration (300 mg/dl) eine Abweichung von 134,32 % im Vergleich zur Blankprobe verursacht. Bilirubin (80 mg/dl) und Intralipid® (400 mg/dl) stören die Ammoniakmessung nicht. Die Standardabweichungen liegen zwischen 0,84 und 2,92 µmol/l und die Variationskoeffizienten betragen zwischen 1,02 und 6,34 %.

Tabelle 8. Interferenzstudie VitroVet für den Parameter Ammoniak anhand hoher und niedriger, klinisch relevanter Konzentration von Bilirubin, Hämoglobin und Intralipid®

VitroVet	Bilirubin		Hämoglobin		Intralipid®	
Interferenz [mg/dl]	80	20	500	300	1000	400
M Blank [µmol/l]	50,95	50,95	25,14	25,14	25,14	25,14
M Spike [µmol/l]	74,97	66,25	115,54	84,37	35,74	32,03
Bias [µmol/l]	24,02	15,30	90,40	59,23	10,59	6,88
Bias [%]	47,14	30,03	359,58	235,60	42,12	27,37
Bias > TE <sub>a</sub>	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Anmerkung. n = 5-fach-Messung, alle Substrate interferieren mit der Ammoniakmessung am VitroVet. Abkürzungen: M Blank = Mittelwert Blankprobe, M Spike = Mittelwert Spikeprobe, TE<sub>a</sub> = zulässiger Gesamtfehler für Ammoniak 20 % (ASVCP, 2013a).

Die Ammoniakmessung am VitroVet (siehe Tabelle 8) wird durch alle Substrate mit einem Bias über dem  $TE_a$  gestört. Die stärkste Abweichung löst Hämoglobin auch in der unteren Konzentration (300 mg/dl) mit einem Bias von 235,60 % aus. Hier ist das gemessene Ammoniak um 59,23  $\mu\text{mol/l}$  höher als der Ausgangswert (Blankprobe). Der Einfluss von Bilirubin und Intralipid<sup>®</sup> ist ebenfalls erhöht und hat selbst bei niedrigen Konzentrationen eine Abweichung von circa 30 % verursacht. Die Standardabweichungen betragen zwischen 1,88 und 8,07  $\mu\text{mol/l}$  und die Variationskoeffizienten liegen zwischen 5,16 % und 11,73 %.

Tabelle 9. Interferenzstudie Pentra für den Parameter Ammoniak anhand hoher und niedriger, klinisch relevanter Konzentration von Bilirubin, Hämoglobin und Intralipid<sup>®</sup>

Pentra	Bilirubin		Hämoglobin		Intralipid <sup>®</sup>	
Interferenz [mg/dl]	80	20	500	300	1000	400
M Blank [ $\mu\text{mol/l}$ ]	76,11	76,11	40,48	40,48	40,48	40,48
M Spike [ $\mu\text{mol/l}$ ]	165,02	151,65	161,16	110,19	84,23	55,84
Bias [ $\mu\text{mol/l}$ ]	88,92	75,54	120,68	69,71	43,75	15,35
Bias [%]	116,83	57,49	298,12	172,21	108,08	37,92
Bias > $TE_a$	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Anmerkung. n = 5-fach-Messung, alle Substrate interferieren mit der Ammoniakmessung am Vergleichsgerät Pentra. Abkürzungen: M Blank = Mittelwert Blankprobe, M Spike = Mittelwert Spikeprobe,  $TE_a$  = zulässiger Gesamtfehler für Ammoniak 20 % (ASVCP, 2013a).

Ähnlich zum VitroVet stören alle Substrate die Ammoniakmessung am Vergleichsgerät Pentra (Tabelle 9). Die stärkste Abweichung verursacht ebenfalls Hämoglobin mit einem Bias von 172,21 %, auch in der niedrigen Konzentration (300 mg/dl). Hier liegt das gemessene Ammoniak um 69,71  $\mu\text{mol/l}$  höher als der Ausgangswert der Blankprobe. Die Abweichung durch Bilirubin und Intralipid beträgt im niedrigen Konzentrationsbereich jeweils 57,49 % und 37,92 %. Die Standardabweichungen liegen zwischen 5,47 und 16,14  $\mu\text{mol/l}$  und die Variationskoeffizienten betragen zwischen 5,23 % und 19,16 %.

Zusammengefasst verursacht Hämoglobin die stärkste Interferenz bei der Ammoniakmessung, und das an allen Analysegeräten.

### 3.4 Lagerungsstudie

Im folgenden Kapitel werden der Einfluss der Lagerungsdauer (Zeitpunkt 0, 30, 60 und 120 Minuten nach Blutentnahme) und der Lagerungstemperatur (4 und 20 °C) auf den Parameter Ammoniak für die Tierart Hund dargestellt. Die Veränderungen des Parameters werden jeweils für die Geräte PocketChem™, FUJI, solo, VitroVet und Pentra nacheinander graphisch (Abbildung 7–11) unter Angabe der Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse sowie des Tukey- und Sidak-Tests als Folgetest präsentiert. Zusätzlich dient der  $TE_a$  als Beurteilungskriterium. Hierbei soll die prozentuale Abweichung der Messwerte zum Ausgangswert den  $TE_a$  (rot gestrichelte Linien in Abbildung 7–11) nicht überschreiten.

#### PocketChem™

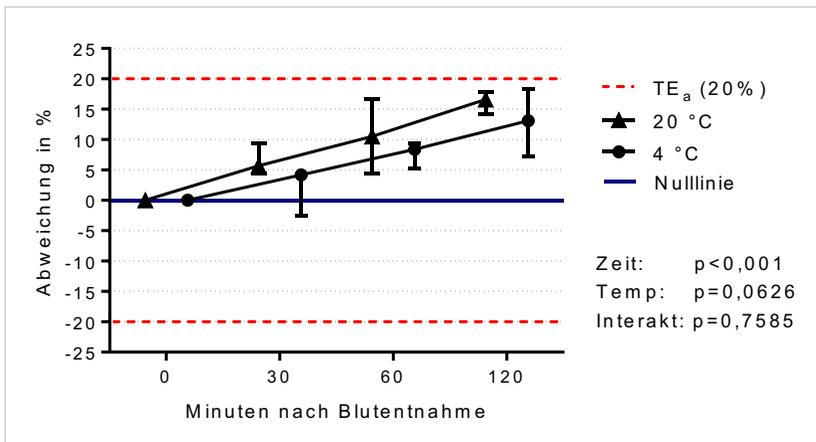


Abbildung 7. Lagerungsstudie PocketChem™. Die %-Abweichung der Ammoniakkonzentration vom Ausgangswert bei der Lagerung von EDTA-Vollblut mit einem hochsignifikanten Anstieg über 120 Minuten bei 20 und 4 °C,  $n = 3$ -fach-Messungen. Angabe von Median und Bereich der %-Abweichung. Abkürzungen: Interakt = Interaktion,  $TE_a$  (20 %) = zulässiger Gesamtfehler Ammoniak 20 %, Temp = Temperatur (ASVCP, 2013a).

Die Ammoniakmessung am PocketChem™ aus EDTA-Vollblut zeigt in Abbildung 7 einen hochsignifikanten Effekt der Lagerungsdauer ( $p < 0,001$ ). Der Einfluss der Lagerungstemperatur ( $p = 0,0626$ ) und der Interaktion ( $p = 0,7585$ ) ist nicht signifikant. Der Tukey-Test errechnet signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Bei 20 °C besteht ab 60 Minuten eine signifikante Differenz mit 10,53 %, bei 4 °C erst nach 120 Minuten mit 12,9 %. Der  $TE_a$  von 20 % für den Parameter Ammoniak wird jedoch nicht überschritten. Von den Signifikanztests abgesehen, beträgt die mittlere Differenz zum Ausgangswert bei 20 °C nach 30, 60 und 120 Minuten jeweils 6,48, 10,53 und 16,19 % und bei 4 °C beträgt sie 1,92, 7,68 und 11,91 %. Hier wird neben dem Einfluss der Zeit auch ein Unterschied zwischen den Lagerungstemperaturen deutlich, auch wenn sich hierfür keine Signifikanz errechnet hat.

## FUJI

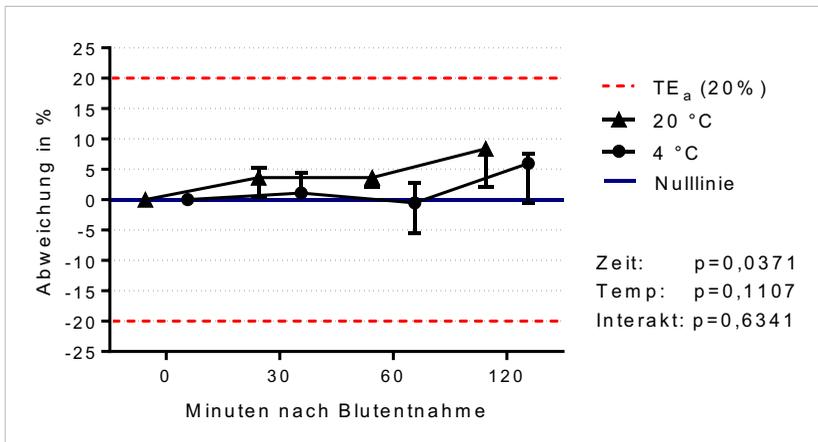


Abbildung 8. Lagerungsstudie FUJI. Die %-Abweichung der Ammoniakkonzentration vom Ausgangswert bei der Lagerung von EDTA-Plasma mit einem signifikanten Anstieg über 120 Minuten bei 20 und 4 °C,  $n = 3$ -fach-Messungen. Angabe von Median und Bereich der %-Abweichung. Abkürzungen: Interakt = Interaktion,  $TE_a$  (20 %) = zulässiger Gesamtfehler Ammoniak 20 %, Temp = Temperatur (ASVCP, 2013a).

Am FUJI zeigt die Ammoniakbestimmung aus EDTA-Plasma in Abbildung 8 einen signifikanten Einfluss der Lagerungsdauer über 120 Minuten ( $p = 0,0371$ ). Der Einfluss der Lagerungstemperatur ( $p = 0,1107$ ) und der Interaktion ( $p = 0,6341$ ) ist nicht signifikant. Der Tukey-Test errechnet keine signifikanten Unterschiede

zwischen den einzelnen Gruppen. Von den Signifikanztests abgesehen, beträgt die mittlere Differenz zum Ausgangswert bei 20 °C nach 30, 60 und 120 Minuten jeweils 3,14, 3,14 und 6,28 %, bei 4 °C beträgt sie 2,17, -1,09, und 4,35 %. Hier ergibt sich neben dem Einfluss der Zeit auch ein geringgradiger Unterschied zwischen den Lagerungstemperaturen. Der  $TE_a$  wird folglich nicht überschritten. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich, ist der Parameter Ammoniak unabhängig von der Lagerungstemperatur bis zu 60 Minuten mit einer Abweichung von unter 5 % stabil.

### solo

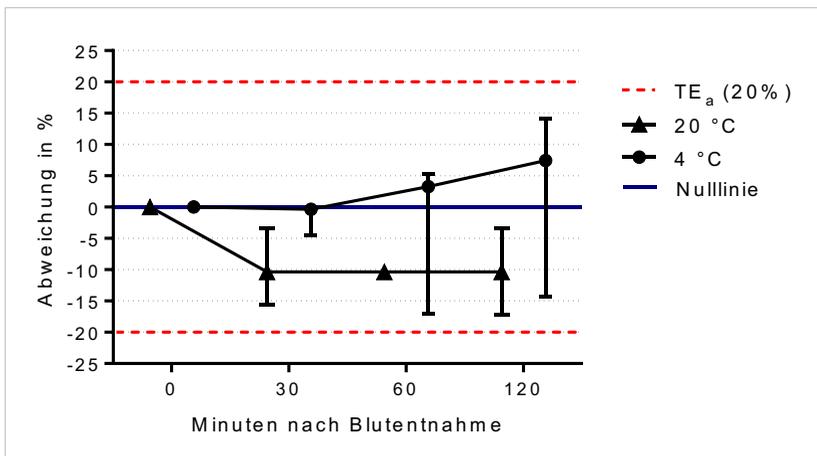


Abbildung 9. Lagerungsstudie solo. Die %-Abweichung der Ammoniakkonzentration vom Ausgangswert bei der Lagerung von EDTA-Plasma über 120 Minuten bei 20 und 4 °C,  $n = 3$ -fach-Messungen. Angabe von Median und Bereich der %-Abweichung. Zwei Ausreißer bei 20 °C zum Zeitpunkt 60 Minuten und einer zum Zeitpunkt 120 Minuten entfernt, sonst würde der  $TE_a$  aufgrund der Ungenauigkeit des solo weit überschritten. Abkürzungen:  $TE_a$  (20 %) = zulässiger Gesamtfehler Ammoniak 20 % (ASVCP, 2013a).

Der solo zeigt in den Mehrfachmessungen pro Zeiteinheit stellenweise erhebliche Ungenauigkeiten, sodass die zweifaktorielle Varianzanalyse nach Entfernen der Ausreißer (Abbildung 9) nicht berechnet werden kann. Aus Abbildung 9 sind bei 20 °C zum Zeitpunkt 60 Minuten zwei Ausreißer mit einem VK von 101,04 % und zum Zeitpunkt 120 Minuten ein Ausreißer mit einem VK von 34,30 % entfernt worden. Zu den besagten Zeitpunkten wäre der  $TE_a$  von 20 % deutlich

überschritten. Die große Abweichung ist allerdings auf den erhöhten zufälligen Fehler des Analysegerätes bei den Mehrfachmessungen zurückzuführen und erlaubt an dieser Stelle am Gerät solo keine adäquate Interpretation des Einflusses der Lagerung auf den Parameter Ammoniak. Ohne Berücksichtigung der Ausreißer beträgt die mittlere Differenz zum Ausgangswert bei 20 °C nach 30, 60 und 120 Minuten jeweils -9,77, -58,62 und -24,71 % und bei 4 °C beträgt sie -1,73, -2,77 und 2,27 %.

### VitroVet

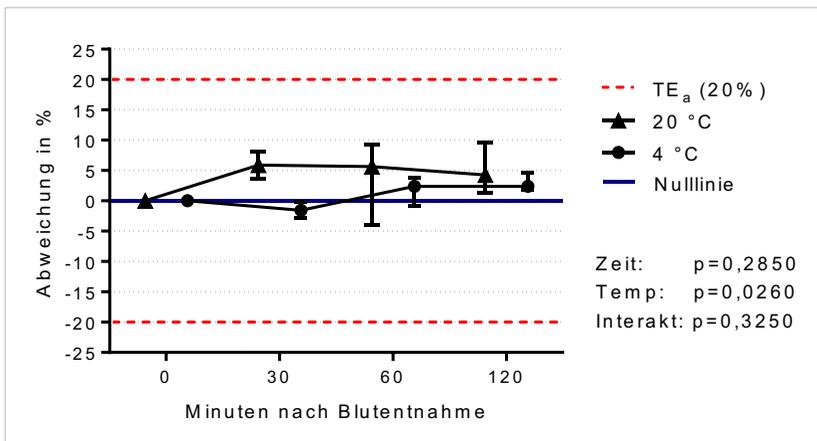


Abbildung 10. Lagerungsstudie VitroVet. Die %-Abweichung der Ammoniakkonzentration vom Ausgangswert bei der Lagerung von EDTA-Plasma mit einem signifikanten Unterschied zwischen 20 und 4 °C,  $n = 3$ -fach-Messungen. Angabe von Median und Bereich der %-Abweichung. Abkürzungen: Interakt = Interaktion,  $TE_a (20 \%)$  = zulässiger Gesamtfehler Ammoniak 20 %, Temp = Temperatur (ASVCP, 2013a).

Die Messung von Ammoniak aus EDTA-Plasma am VitroVet (Abbildung 10) weist, anders als an den Geräten PocketChem<sup>TM</sup> und FUJI, keinen signifikanten Effekt der Lagerungsdauer ( $p=0,2850$ ) nach. Allerdings errechnet sich ein signifikanter Effekt der Lagerungstemperatur ( $p = 0,0260$ ) zum Zeitpunkt 30 Minuten nach Blutentnahme mit einer mittleren Differenz von 7,42 % zwischen den beiden Temperaturen. Die Interaktion ( $p=0,3250$ ) war nicht signifikant. Von den Signifikanztests abgesehen, beträgt die mittlere Differenz zum Ausgangswert bei 20 °C nach 30, 60 und 120 Minuten jeweils 5,90, 3,68 und 5,08 % und bei 4 °C

beträgt sie lediglich -1,52, 1,75 und 2,95 %. Der  $TE_a$  für den Parameter Ammoniak wird nicht überschritten.

### Pentra

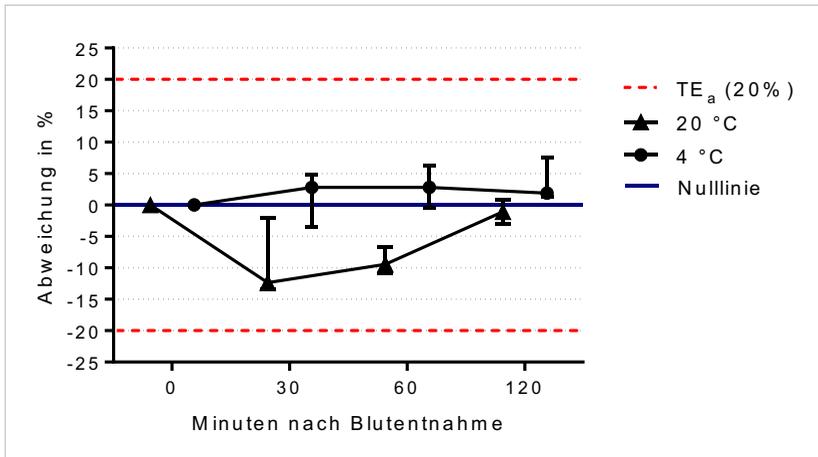


Abbildung 11. Lagerungsstudie Pentra. Die %-Abweichung der Ammoniakkonzentration vom Ausgangswert bei der Lagerung von EDTA-Plasma über 120 bei 20 und 4 °C,  $n = 3$ -fach-Messungen. Angabe von Median und Bereich der %-Abweichung. Ein Ausreißer bei 120 Minuten 20 °C entfernt, sonst würde der  $TE_a$  aufgrund der Ungenauigkeit überschritten. Abkürzungen:  $TE_a$  (20%) = zulässiger Gesamtfehler Ammoniak 20 % (ASVCP, 2013a).

Der Pentra zeigt in den Mehrfachmessungen zum Zeitpunkt 120 Minuten bei 20 °C einen Ausreißer mit einem VK von 42,11 %, sodass die zweifaktorielle Varianzanalyse nach Entfernung des Ausreißers nicht berechnet werden kann. Der entsprechende Messwert ist aus Abbildung 11 entfernt. An der Stelle des entfernten Ausreißers in Abbildung 11 (Lagerungstemperatur 20 °C, 120 Minuten, VK 42,11 %) wäre der  $TE_a$  von 20 % mit einer mittleren prozentualen Abweichung von 20,39 % knapp überschritten. Die Abweichung ist auf einen zufälligen Fehler des Analysegerätes zurückzuführen und entspricht mit großer Wahrscheinlichkeit nicht dem Einfluss der Lagerung auf den Parameter Ammoniak. Ohne Berücksichtigung des Ausreißers beträgt die mittlere Differenz zum Ausgangswert bei 20 °C nach 30, 60 und 120 Minuten jeweils -9,29, -8,96 und -20,39 %, bei 4 °C beträgt sie 1,37, 2,86 und 3,58 %.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Blutammoniak der Tierart Hund in EDTA-Vollblut stärker ansteigt als in EDTA-Plasma und der Anstieg bei 20 °C größer ist als bei 4 °C. Aufgrund zufälliger Fehler (erhöhte Ungenauigkeit) vor allem am solo, aber auch gesehen am Vergleichsgerät Pentra, sind deren Ergebnisse für die Auswertung des Einflusses von Temperatur und Lagerungszeit für den Parameter Ammoniak des Hundes ungeeignet. Der FUJI zeigt in diesem Versuch die geringste Ungenauigkeit (VK der Mehrfachmessungen), dicht gefolgt von PocketChem™ und VitroVet.

### **3.5 Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA**

Das folgende Kapitel zeigt nacheinander von A–D in Abbildung 12 anhand von Box-Whisker-Diagrammen die Ergebnisse des Einflusses der Antikoagulanzen Heparin und EDTA auf die Ammoniakmessung an den Geräten PocketChem™, FUJI, VitroVet und Pentra. Die Daten sind mit einer maximal zulässigen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Die Überprüfung zur Gleichheit einer zentralen Tendenz der beiden Antikoagulanzen erfolgte mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (die Mediane unterscheiden sich signifikant, wenn  $p < 0,05$ ).

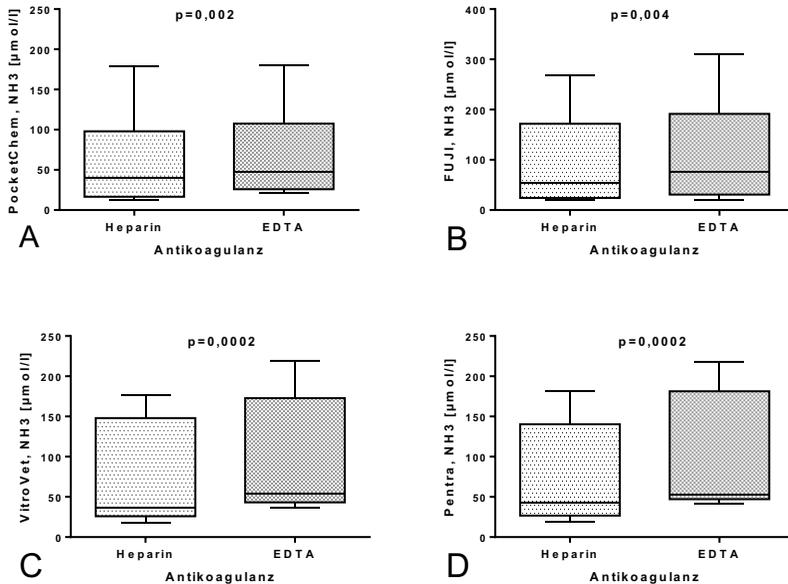


Abbildung 12. Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA auf die Ammoniakmessung. Gerät A = PocketChem<sup>TM</sup>, B = FUJI, C = VitroVet, D = Pentra. Box-Whisker-Diagramm: Die Box ist der Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen, der durchgehende Strich in der Box entspricht dem Median und die Whiskers (Antennen) zeigen den gesamten Datenbereich mit Minimum und Maximum an. Der mediane Unterschied zwischen den Antikoagulanzen ist an allen Geräten signifikant.

An den Geräten in Abbildung 12 zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Ammoniakkonzentration zwischen mit Heparin und mit EDTA antikoagulierten Blutproben. Hierbei fällt auf, dass die mit Heparin versetzten Blutproben (Heparin-Blutproben) eine niedrigere Ammoniakkonzentration als die mit EDTA versetzten Blutproben (EDTA-Blutproben) aufweisen. Der mediane Unterschied zwischen den Antikoagulanzen ist am PocketChem<sup>TM</sup> ( $p < 0,002$ ) und FUJI ( $p < 0,004$ ) signifikant. Die Geräte VitroVet und Pentra zeigen mit einem  $p$ -Wert  $< 0,0002$  einen hochsignifikanten Unterschied.

Darüber hinaus wurden die prozentuale Abweichung innerhalb der Patientenproben an den einzelnen Geräten und der M der prozentualen Abweichung, zu sehen in Tabelle 10, berechnet.

Tabelle 10. Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA auf die Ammoniakmessung der Geräte

Gerät/ Versuch	PocketChem™	FUJI	VitroVet	Pentra
Proben	n=10	n=14	n=13	n=13
Heparin [μmol/l]	58,60	97,50	74,24	75,17
EDTA [μmol/l]	67,80	112,79	95,00	98,92
Differenz [%]	-21,33	-13,13	-21,85	-24,01

*Anmerkung.* Die mittlere Ammoniakkonzentration (aus n) der mit Heparin antikoagulierten Blutproben (Heparin) ist bis zu 24 % niedriger als die der mit EDTA antikoagulierten Blutproben (EDTA). Abkürzungen: Differenz = prozentuale Abweichung von Heparin zu EDTA.

Wie in Tabelle 10 aufgeführt und bereits in Abbildung 12 gezeigt, fällt auf, dass die gemessene Ammoniakkonzentration der Heparin-Blutproben niedriger ausfällt als die der EDTA-Blutproben. Die Mittelwertdifferenz von Heparin zu EDTA beträgt bis zu 24 % (Tabelle 10). Auch in den Einzelmessungen zeigen sich niedrigere Ammoniakkonzentrationen in Heparin-Blutproben. Die größte Abweichung innerhalb der Einzelmessungen, gesehen an allen Geräten, liegt bei knapp über 50 %.

Zusammenfassend fällt auf, dass an allen Geräten die Heparin-Blutproben signifikant niedrigere Ammoniakkonzentrationen als die EDTA-Blutproben aufweisen.

### 3.6 Methodenvergleich

Der Methodenvergleich dient der Überprüfung der Richtigkeit und der Ermittlung des systematischen Fehlers (konstant oder proportional) der Analysegeräte (Westgard und Hunt, 1973). Der Vergleich der Geräte PocketChem™, FUJI, solo und VitroVet für den Parameter Ammoniak der Tierart Hund erfolgt am Vergleichsgerät Pentra. Der Konzentrationsbereich der 43 Doppelmessungen erstreckt sich über niedrige (klinisch nicht relevante), mittlere und hohe Ammoniakkonzentrationen. Der Konzentrationsbereich beträgt, gemessen am Pentra, 22,25–271,05 μmol/l (jeweils M der Doppelmessung) und befindet sich im überprüften (siehe Linearitätsstudie) und angegebenen Messbereich aller Geräte-

beziehungsweise Reagenzienhersteller. Wie in der Replikationsstudie gezeigt, muss bei dem Vergleichsgerät Pentra mit einem gewissen zufälligen Fehler ( $M = 75,49$ ,  $SD = 4,13$ ,  $VK = 5,47$ ;  $M = 151,90$ ,  $SD = 11,44$ ,  $VK = 7,07$ ), der sogar größer ausfällt als bei den Geräten FUJI und VitroVet, gerechnet werden. Der Pentra misst im Methodenvergleich bei acht von 43 Doppelmessungen Differenzen von  $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ . Der zufällige Fehler der zu vergleichenden Geräte ist ähnlich zu der jeweiligen Replikationsstudie. So zeigt der PocketChem™ bei 4/43 Doppelmessungen Differenzen von  $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ , der FUJI bei 0/43, der solo bei 28/43 und der VitroVet bei 0/43 Doppelmessungen.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Korrelation nach Spearman (Spearman's Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$ ) und der Regressionsanalyse nach Passing-Bablok mit 95 % Konfidenzintervallen. Abbildung 14 beinhaltet die Differenzdiagramme nach Bland-Altman mit Bias und, als rote Linie eingezeichnet, den  $TE_a$  von 20 % für den Parameter Ammoniak (ASVCP, 2013a). Die anschließende Zusammenfassung der Ergebnisse des Methodenvergleichs erfolgt in Tabelle 11.

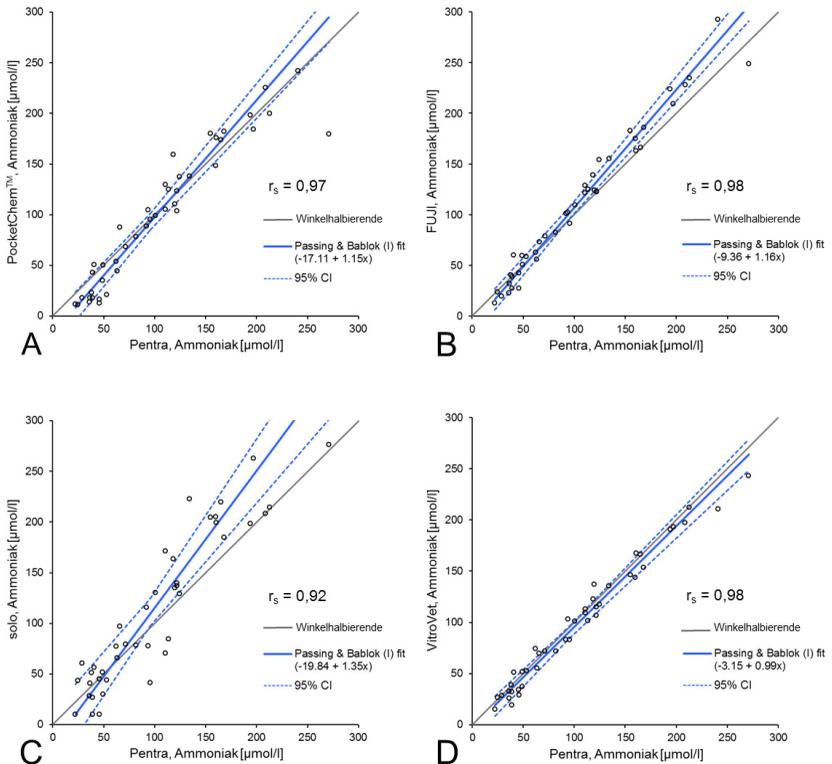


Abbildung 13. Methodenvergleich der Geräte A = PocketChem<sup>TM</sup>, B = FUJI, C = solo, D = VitroVet (y-Achse) mit Vergleichsgerät Pentra (x-Achse) für den Parameter Ammoniak (n = 43 Doppelmessungen) anhand der Passing-Bablok-Reggressionsanalyse mit Konfidenzintervallen (CI) und Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ( $r_s$ ). Je näher  $r_s$  an 1, umso besser decken die ermittelten Daten den Analysebereich ab. Die Passing-Bablok-Regression ist eine parameterfreie Regressionsanalyse, das Konfidenzniveau beträgt 95 %. Sind die 95 % CI des Schnittpunktes a  $\neq$  0 oder der Steigung b  $\neq$  1, besteht ein konstanter beziehungsweise proportionaler Unterschied. A–C: konstanter sowie proportionaler Unterschied, wobei C am stärksten differiert. D: gute Übereinstimmung mit der Vergleichsmethode. A und B befinden sich innerhalb der 95 % CI.

Der Korrelationskoeffizient (r) beziehungsweise der  $r_s$  für nicht normalverteilte Daten gibt eine Aussage darüber, wie gut die ermittelten Daten den analytischen Bereich abdecken (ideal r oder  $r_s = 1$ ), er ist kein Maß für die Übereinstimmung zweier Methoden (Spearman, 1907; Westgard, 2008). Abbildung 13 zeigt, dass die ermittelten Daten (n = 43 Doppelmessungen) zum Methodenvergleich von

Ammoniak aus Hundeblood den analytischen Bereich gut abdecken mit einem  $r_s$  von 0,97 für den PocketChem™ (Abbildung 13, A), 0,98 für den FUJI (Abbildung 13, B), 0,92 für den solo (Abbildung 13, C) und 0,98 für den VitroVet (Abbildung 13, D). Der  $r_s$  wird zur Bestimmung der benötigten statistischen Gleichung verwendet, um den systematischen Fehler (Bias) einer Methode zu ermitteln. Für Parameter, die sich über einen weiten analytischen Bereich erstrecken, ist typischerweise die Regressionsanalyse zur Bestimmung des Bias sinnvoll. Wenn  $r \geq 0,99$  ist, können einfache Standard-Regressionsanalysen angewendet werden. Wenn  $r_s < 0,99$  ist, sind komplexere Regressionsanalysen nach Passing-Bablok oder Deming anzuwenden (Westgard, 2008; ASVCP, 2009). Abbildung 13 zeigt neben dem  $r_s$  die berechnete Passing-Bablok-Regression mit 95 % Konfidenzniveau der Geräte anhand des Pentra als Vergleichsmethode. Die Regressionsanalyse nach Passing-Bablok trifft keine Annahmen über die Verteilung der Messwerte und deren Ausreißer und zählt zu den nichtparametrischen statistischen Verfahren. Wie bei der konventionellen Regressionsanalyse werden die Ergebnisse von zwei Methoden gegeneinander aufgetragen und die Medianwerte, die Steigung und der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate errechnet. Außerdem beinhaltet die Methode die Berechnung der 95 %-Konfidenzintervalle (CI) für die Steigung und den Schnittpunkt. Die perfekte Übereinstimmung der Methoden ist ein Schnittpunkt von  $a = 0$  mit einer Steigung von  $b = 1$  (Passing und Bablok, 1983). Das Konfidenzniveau beträgt 95 %, sodass in diesem Fall 95 % aller auf Grundlage der gemessenen Daten berechneten CI den wahren Wert der zu untersuchenden Population beinhalten. Die Interpretation ist wie folgt: Ein konstanter Bias (konstanter systematischer Fehler, unabhängig vom Konzentrationsbereich) liegt vor, wenn die 95 % CI des Schnittpunktes  $a \neq 0$  sind. Ein proportionaler Bias (proportionaler systematischer Fehler, abhängig vom Konzentrationsbereich) liegt vor, wenn die 95 % CI der Steigung  $b \neq 1$  sind.

Der PocketChem™ (Abbildung 13, A) zeigt mit einem Schnittpunkt von -17,11 und einer Steigung von 1,15 einen negativen konstanten sowie negativen proportionalen Bias zum Vergleichsgerät. Auch die 95 %-Konfidenzintervalle von  $a$  sind  $\neq 0$  und die von  $b$  sind  $\neq 1$ . Der PocketChem™ unterschätzt die Ammoniakkonzentration im Vergleich zum Pentra im Konzentrationsbereich bis circa 60  $\mu\text{mol/l}$ , im Bereich über 100  $\mu\text{mol/l}$  misst der PocketChem teilweise

höhere Werte. Der größte Ausreißer findet sich, gemessen am Pentra, bei 271,05  $\mu\text{mol/l}$ ; hier misst der PocketChem<sup>TM</sup> lediglich 179,5  $\mu\text{mol/l}$ . Allerdings zeigt sich in der Doppelmessung des Pentra eine Differenz von über 30  $\mu\text{mol/l}$  zwischen den Einzelmessungen (erste Messung 254,2  $\mu\text{mol/l}$ , zweite Messung 287,9  $\mu\text{mol/l}$ ). FUJI und VitroVet ermitteln in diesem Bereich mit ähnlichen Doppelmessungen Werte von 249  $\mu\text{mol/l}$  und 243  $\mu\text{mol/l}$ , sodass es sich bei der zweiten Messung des Pentra möglicherweise um einen Ausreißer handelt. Dennoch misst der PocketChem<sup>TM</sup>, der ebenfalls ähnliche Doppelmessungen aufweist, einen deutlich niedrigeren Wert.

Der Vergleich des FUJI (Abbildung 13, B) mit dem Pentra ergibt einen Schnittpunkt von -9,36 mit einer Steigung von 1,16, sodass, allerdings weniger ausgeprägt als im Vergleich zum PocketChem<sup>TM</sup>, auch hier ein konstanter und proportionaler Bias zur Vergleichsmethode besteht. Im Konzentrationsbereich bis 50  $\mu\text{mol/l}$  misst der FUJI geringfügig niedrigere Werte als der Pentra. Bei höheren Ammoniakkonzentrationen ist zu sehen, dass der FUJI höhere Werte als das Vergleichsgerät zeigt, mit Ausnahme des oben erwähnten Ausreißers.

Der solo (Abbildung 13, C) hat den größten Bias sowohl konstant mit einem Schnittpunkt von -19,84 als auch proportional mit einer Steigung von 1,35 und weitem CI. Im Konzentrationsbereich bis 100  $\mu\text{mol/l}$  misst der solo teils höher und teils tiefer als das Vergleichsgerät, im Bereich darüber misst der solo höher als das Vergleichsgerät Pentra.

Der Vergleich des VitroVet (Abbildung 13, D) mit dem Vergleichsgerät Pentra zeigt eine gute Übereinstimmung der Methoden. Der Schnittpunkt ( $a = -3,15$ ) liegt nah bei null und befindet sich innerhalb der 95 % CI ( $a$  95 % CI = -9,55 bis 2,06). Die Steigung ( $b = 0,99$ ) ist nahe eins und befindet sich innerhalb der 95 % CI ( $b$  95 % CI = 0,93 bis 1,04). Im Graph ist zu sehen, dass die Regressionsgerade nah und parallel zur Winkelhalbierenden verläuft. Allerdings befindet sich die Regressionsgerade etwas unterhalb der Winkelhalbierenden, sodass, wie durch den Wert ( $a = -3,15$ ) des Schnittpunkts zu erkennen ist, von einem konstanten Bias des VitroVet mit einer leichten Unterschätzung des Konzentrationsbereiches auszugehen ist.

Das Differenzdiagramm nach Bland-Altman ist ein grafisches Verfahren, mit dessen Hilfe systematische Fehler (konstanter und proportionaler Bias), Ausreißer sowie Abhängigkeiten der Unterschiede von der Größe der Messwerte zwischen zwei Methoden beurteilt werden können (Bland und Altman, 1999). Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Bland-Altman-Analyse der Geräte A = PocketChem™, B = FUJI, C = solo und D = VitroVet am Vergleichsgerät Pentra.

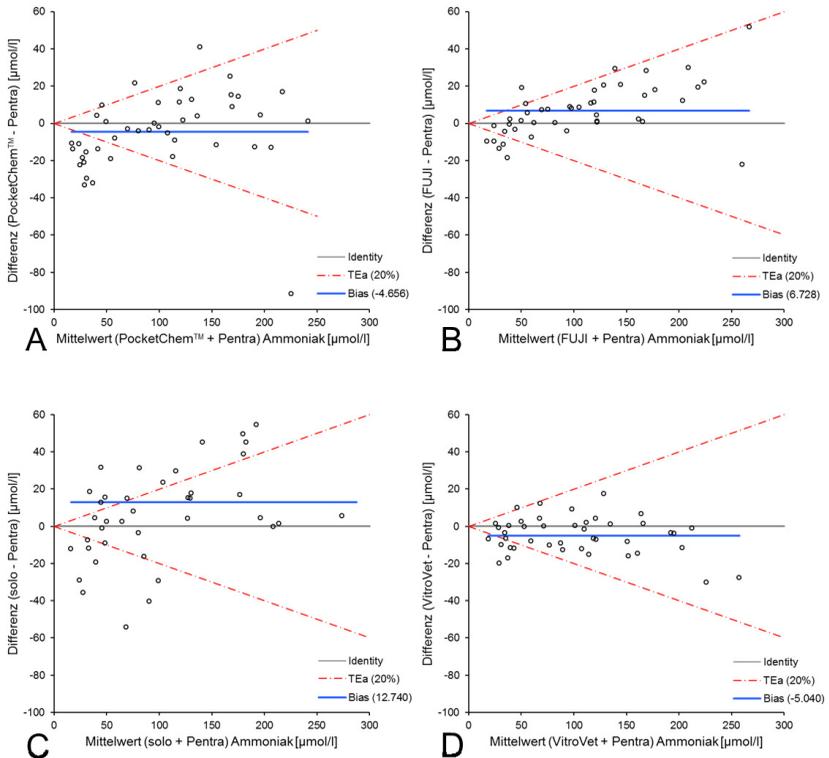


Abbildung 14. Methodenvergleich der Geräte A = PocketChem™, B = FUJI, C = solo, D = VitroVet mit Vergleichsgerät Pentra für den Parameter Ammoniak ( $n = 43$  Doppelmessungen) anhand des Bland-Altman Differenzdiagramms. Differenz zweier Methoden (y-Achse) aufgetragen gegen den Mittelwert beider Methoden (x-Achse). Die Differenzlinie markiert den Bias (systematischer Fehler), ideal ist ein Bias von null mit Messwerten um die Nulllinie (Identity)  $\frac{1}{2}$  über und  $\frac{1}{2}$  unterhalb der Linie. Zulässiger Gesamtfehler ( $TE_a$ ) von Ammoniak 20 %, als rote Linie eingezeichnet. Gerät A geringster Bias (-4,66), aber stärkere Streuung im Vergleich zu D (Bias -5,04), B und C positiver Bias, C größte Streuung und viele Werte außerhalb des  $TE_a$  (ASVCP, 2013a).

Im Bland-Altman-Differenzdiagramm ist der M der Messergebnisse beider Methoden auf die x-Achse aufgetragen, was die bestmögliche Schätzung des unbekanntes, wahren Wertes darstellt. Ein Auftragen der Differenzen von zwei Methoden (y-Achse) gegen eine Methode (x-Achse) sollte nur erfolgen, wenn eine Referenzmethode oder ein sogenannter Goldstandard (ermittelt den wahren Wert) für den zu untersuchenden Parameter vorliegt (Bland und Altman, 1995, 1999; Jensen und Kjelgaard-Hansen, 2006). Für Ammoniak ist, wie bereits erwähnt, aktuell lediglich eine Vergleichsmethode verfügbar, sodass zur Berücksichtigung der auch möglicherweise fehlerbehafteten Vergleichsmethode die in Abbildung 14 gezeigte Vorgehensweise gewählt wurde.

Der PocketChem™ zeigt in Abbildung 14, A insgesamt eine Unterschätzung der Ammoniakkonzentration im Vergleich zum Pentra, unter anderem zu sehen am negativen Bias von  $-4,66 \mu\text{mol/l}$ . Die größte Unterschätzung befindet sich im Konzentrationsbereich bis circa  $50 \mu\text{mol/l}$ , hier sind auch die Grenzen des  $\text{TE}_a$  von 20 % für den Parameter Ammoniak deutlich überschritten. Wie in Abbildung 13, A, zeigt der PocketChem™ auch hier einen konstanten sowie proportionalen systematischen Fehler. Auch der Ausreißer (höchster Messwert) ist trotz M beider Methoden auf der x-Achse nachvollziehbar.

Der FUJI überschätzt insgesamt die Ammoniakkonzentration in Abbildung 14, B mit einem positiven Bias von  $6,73 \mu\text{mol/l}$ . Konzentrationen bis  $50 \mu\text{mol/l}$  werden leicht unterschätzt, die Messwerte befinden sich hier außerhalb des  $\text{TE}_a$ . Wie auch in Abbildung 13, A, zeigt der FUJI hier einen proportionalen und konstanten systematischen Fehler.

Das Analysegerät solo hat in Abbildung 14, C mit einem positiven Bias von  $12,74 \mu\text{mol/l}$  die größte Differenz zum Vergleichsgerät Pentra. Auch zeigt der solo die weiteste Streuung der Daten um die Nulllinie. Über die Hälfte der erhobenen Daten befinden sich außerhalb des  $\text{TE}_a$ . Im unteren Konzentrationsbereich misst der solo teils höher und teils tiefer, im oberen Bereich zeigt er deutlich höhere Werte. Es liegt, wie in Abbildung 13, C gesehen, auch hier ein proportionaler sowie konstanter systematischer Fehler vor.

Der VitroVet zeigt in Abbildung 14, D die größte Übereinstimmung mit der Vergleichsmethode. Die Werte sind am gleichmäßigsten um die Nulllinie und über

den Konzentrationsbereich verteilt. Im unteren Konzentrationsbereich befinden sich wenige Werte außerhalb des  $TE_a$ , hier liegt ein geringgradiger proportionaler systematischer Fehler vor. Dieser ist durch die Passing-Bablok-Analyse (Abbildung 13, D) nicht aufgefallen. Insgesamt hat der VitroVet, wie in Abbildung 13, D, auch hier einen konstanten systematischen Fehler mit einem negativen Bias von  $-5,04 \mu\text{mol/l}$ , was eine Unterschätzung der Werte anzeigt. Die 95 %-Übereinstimmungsgrenzen der Bland-Altman-Analyse wurden nicht zur Beurteilung der Methoden verwendet und sind deshalb nicht in den Graphen (Abbildung 14) dargestellt. Die Standardabweichungen der Differenzen aus der Bland-Altman-Analyse sind größer als die Standardabweichungen der Geräte aus der Replikationsstudie. Das bedeutet, dass probenabhängige Einflüsse vorhanden sind, die die Beurteilung der Übereinstimmungsgrenzen unbrauchbar macht (Hollis, 1996). Zur Vollständigkeit sind sie in der Zusammenfassung der Ergebnisse des Methodenvergleichs aufgeführt (Tabelle 11). Zusammenfassend werden die Ergebnisse des Methodenvergleichs mit  $r_s$  der Passing-Bablok-Regressionsanalyse und des Bland-Altman-Differenzdiagramms in Tabelle 11 gezeigt.

Tabelle 11. Zusammenfassung Methodenvergleich der Geräte am Vergleichsgerät Pentra für den Parameter Ammoniak der Tierart Hund

Gerät/ Leistung	PocketChem™	FUJI	solo	VitroVet
$r_s$	0,97	0,98	0,92	0,98
Schnittpunkt 95 % CI	-17,11 (-25,03– -8,75)	-9,36 (-14,76– -3,27)	-19,84 (-31,79– -4,58)	-3,15 (-9,55–2,06)
Steigung 95 % CI	1,15 (1,06–1,23)	1,16 (1,11–1,23)	1,35 (1,16–1,51)	0,99 (0,93–1,04)
Bias [ $\mu\text{mol/l}$ ] 95 % Übereinstimmungsgrenzen	-4,66 (-45,74–36,43)	6,73 (-21,17–34,63)	12,74 (-49,86–75,34)	-5,04 (-24,38–14,30)

Anmerkung. (n = 43 Doppelmessungen), der VitroVet zeigt die größte Übereinstimmung mit dem Vergleichsgerät Pentra, Abkürzungen: CI = Konfidenzintervall,  $r_s$  = Spearman Rangkorrelationskoeffizient. Schnittpunkt und Steigung aus Passing-Bablok-Regression, Bias aus Bland-Altman-Analyse.

Wie in Tabelle 11 ersichtlich, hat der PocketChem™ die niedrigste Gesamtdifferenz mit einem Bias von  $-4,66 \mu\text{mol/l}$  zum Vergleichsgerät, aber der VitroVet zeigt mit einem nur geringfügig höheren Bias von  $-5,04 \mu\text{mol/l}$  die größere Übereinstimmung mit dem Vergleichsgerät Pentra, da der Schnittpunkt die größte Nähe zu null hat und die Steigung fast eins beträgt. Auch die Grenzen der 95 % CI sind vergleichsweise schmal. Der solo zeigt die größte Differenz zum Pentra, hier beträgt der Bias  $12,74 \mu\text{mol/l}$  und die Steigung mit Schnittpunkt sowie deren 95 % CI weichen am stärksten ab.

### 3.7 Akzeptabilität der Methode

Am Ende der Methodvalidierung kann durch die ermittelten Fehlerarten aus den verschiedenen Studien die abschließende Beurteilung der Akzeptabilität der Geräteleistung erfolgen. Hierzu wird der  $TE_{\text{obs}}$  der einzelnen Geräte berechnet und mit dem  $TE_{\text{a}}$  für den Parameter Ammoniak verglichen. Der  $TE_{\text{obs}}$  errechnet sich aus dem zufälligen Fehler der Geräte in Form des VK aus der Replikationsstudie und dem systematischen Fehler in Form des Bias aus dem Methodenvergleich wie folgt:

$$TE_{\text{obs}} = 2VK [\%] + \text{Bias} [\%]$$

Der ermittelte  $TE_{\text{obs}}$  soll den  $TE_{\text{a}}$  nicht überschreiten ( $TE_{\text{obs}} < TE_{\text{a}}$ ) (ASVCP, 2009, 2013a). Die Beurteilung der Leistung der untersuchten Geräte für die Ammoniakmessung aus Hundeblood ist in Tabelle 12 zusammengefasst und beinhaltet den  $TE_{\text{obs}}$  der einzelnen Geräte, den  $TE_{\text{a}}$  für Ammoniak und den Vergleich des  $TE_{\text{obs}}$  mit dem  $TE_{\text{a}}$ .

Tabelle 12. Akzeptabilität der Geräte für die Ammoniakmessung des Hundes anhand des beobachteten Gesamtfehlers ( $TE_{obs}$ ) im Vergleich zum zulässigen Gesamtfehler ( $TE_a$ )

Gerät/ Einheit [%]	PocketChem™	FUJI	solo	VitroVet
$TE_{obs1}$	19,73	10,71	48,45	19,03
$TE_{obs2}$	20,13	8,93	47,73	11,03
$TE_a$ Ammoniak	20	20	20	20
$TE_{obs1} < TE_a$	Ja	Ja	Nein	Ja
$TE_{obs2} < TE_a$	Nein	Ja	Nein	Ja

*Anmerkung.*  $TE_{obs1}$  =  $2 \times$  Variationskoeffizient, mittlere ( $TE_{obs2}$  = hohe) Ammoniakkonzentration aus Replikationsstudie + Bias in Prozent, Bland-Altman-Analyse. Der PocketChem™ überschreitet mit  $TE_{obs2}$  nur knapp den  $TE_a$ , der FUJI zeigt, gefolgt vom VitroVet, den niedrigsten  $TE_{obs}$  und erfüllt die Anforderung, der solo überschreitet deutlich mit  $TE_{obs1}$  und 2 den  $TE_a$  und erfüllt die geforderte Leistung nicht (ASVCP, 2013a).

Der PocketChem™ liegt mit dem  $TE_{obs1}$  (1 = mittlere Ammoniakkonzentration) kleiner  $TE_a$  innerhalb des Anforderungskriteriums einer akzeptablen Geräteleistung zur Messung des Ammoniaks aus Hundeblood. Zur Veranschaulichung erfolgt die Berechnung des  $TE_{obs2}$  (2 = hohe Ammoniakkonzentration) am PocketChem™. Der VK des Gerätes bei hoher Ammoniakkonzentration beträgt 7,83 % und stammt aus der Kurzzeitreplikationsstudie. Er wird mit zwei multipliziert und mit dem Bias aus dem Methodenvergleich der Bland-Altman-Analyse, der umgerechnet in Prozent - 4,47 % beträgt, addiert ( $2 \times 7,83 \% + (-4,47 \%) = 20,13 \%$ ). Der  $TE_{obs}$  trägt kein negatives Vorzeichen und ist demnach 20,13 %. Hiermit überschreitet das Gerät den  $TE_a$  von Ammoniak um 0,13 %. Der FUJI zeigt mit einem  $TE_{obs}$  von 8,93 % und 10,71 % die niedrigsten beobachteten Gesamtfehler im Vergleich zu den anderen Geräten und liegt weit unter dem Anforderungskriterium ( $TE_{obs} < TE_a$  20 %). Der solo überschreitet den  $TE_a$  mit einem  $TE_{obs1}$  und  $TE_{obs2}$  von jeweils 48,45 % und 47,73 % um mehr als das Doppelte; die Geräteleistung für die Ammoniakmessung ist hier nicht erfüllt. Der VitroVet hat nach dem FUJI das beste Ergebnis mit einem  $TE_{obs1}$  von 19,03 % und einem  $TE_{obs2}$  von 11,03 % und befindet sich ebenfalls innerhalb des geforderten Akzeptabilitätskriteriums für den Parameter Ammoniak.

Aufgrund der eigenen Ungenauigkeit (zufälliger Fehler) des Vergleichsgerätes Pentra mit einem VK von 5,47 % bei mittlerer Ammoniakkonzentration und von 7,07 % bei hoher Konzentration (gesehen in der Replikationsstudie), besteht die Gefahr, dass sich der Bias, also die Differenz der Geräte zum Vergleichsgerät (ermittelt im Methodenvergleich), zum Nachteil für die einzelnen Geräte bei der Berechnung des  $TE_{obs}$  auswirkt. Aus diesem Grund wird der Bias für jedes Gerät einschließlich des Vergleichsgeräts anhand von Kontrollmaterial aus der Langzeitreplikationsstudie berechnet. Für die Berechnung des  $TE_{obs}$  dienen die Variationskoeffizienten mittlerer ( $TE_{obs1}$ ) sowie hoher ( $TE_{obs2}$ ) Ammoniakkonzentrationen aus der Kurzzeitreplikationsstudie, da diese anhand von Patientenproben ermittelt und realistischer als die niedrigeren Variationskoeffizienten aus der Langzeitreplikationsstudie sind. Die abschließende Beurteilung der Geräteleistung mittels geräteeigenem Bias erfolgt so unabhängig von sowie für die Vergleichsmethode und ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13. Akzeptabilität aller Geräte für die Ammoniakmessung des Hundes anhand des beobachteten Gesamtfehlers ( $TE_{obs}$ ) im Vergleich zum zulässigen Gesamtfehler ( $TE_a$ )

Gerät/ Einheit [%]	PocketChem™	FUJI	solo	VitroVet	Pentra
$TE_{obs1}$	16,58	6,68	50,39	18,62	15,58
$TE_{obs2}$	16,98	4,90	49,67	10,62	18,78
$TE_a$ Ammoniak	20	20	20	20	20
$TE_{obs1} < TE_a$	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
$TE_{obs2} < TE_a$	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja

Anmerkung.  $TE_{obs1} = 2 \times$  Variationskoeffizient, mittlere ( $TE_{obs2} =$  hohe) Ammoniakkonzentration aus Kurzzeit-Replikationsstudie + Bias in % der Geräte zum Kontrollmaterial, errechnet aus der Langzeit- Replikationsstudie. Alle Geräte außer dem solo erfüllen das geforderte Akzeptabilitätskriterium ( $TE_{obs} < TE_a$ ), den kleinsten  $TE_{obs}$  zeigt der FUJI (ASVCP, 2013a).

Alle Geräte haben anhand des Bias aus Kontrollmaterial einen etwas niedrigeren beobachteten Gesamtfehler als mit dem Bias aus dem Methodenvergleich. Der PocketChem™ bleibt, anders als in Tabelle 12, in Tabelle 13 mit beiden berechneten Gesamtfehlern von 16,58 % ( $TE_{obs1}$ ) und 16,98 % ( $TE_{obs2}$ ) unter dem  $TE_a$  für den Parameter Ammoniak von 20 %. Hieraus folgt eine akzeptable Geräteleistung des PocketChem™. Der FUJI erreicht wie in Tabelle 12 auch in Tabelle 13 das beste Ergebnis mit berechneten Gesamtfehlern von 6,68 % und

4,90 % bei jeweils  $TE_{obs1}$  und  $TE_{obs2}$ . Der  $TE_{obs}$  ist kleiner als der  $TE_a$ , das Akzeptabilitätskriterium der Geräteleistung ist erfüllt. Das Analysegerät solo hat selbst mit dem berechneten Bias (14,15 %) anhand von herstellereigenem Kontrollmaterial einen hohen  $TE_{obs}$ . Der  $TE_{obs}$  beträgt 50,39 % und 49,67 % bei jeweils  $TE_{obs1}$  und  $TE_{obs2}$ . Der  $TE_a$  für Ammoniak ist um mehr als das Doppelte überschritten, der solo erfüllt das Akzeptabilitätskriterium der Geräteleistung nicht. Der VitroVet erreicht in Tabelle 13 wie schon in Tabelle 12 das Akzeptabilitätskriterium für den Parameter Ammoniak. Der  $TE_{obs1}$  beträgt 18,62 % und der  $TE_{obs2}$  beträgt 10,62 %. Auch das Vergleichsgerät Pentra erreicht die gewünschten Anforderungen und liegt mit einem  $TE_{obs1}$  von 15,58 % und einem  $TE_{obs2}$  von 18,78 % unter dem  $TE_a$  von 20 % für den Parameter Ammoniak.

Zusammengefasst liegt der kleinste  $TE_{obs}$  bei mittlerer Ammoniakkonzentration der Reihe nach geordnet beim FUJI, gefolgt von Pentra, PocketChem<sup>TM</sup> und VitroVet. Bei hoher Ammoniakkonzentration hat der FUJI, gefolgt von VitroVet, PocketChem<sup>TM</sup> und Pentra, den niedrigsten  $TE_{obs}$ . Der solo erreicht weder bei mittlerer noch bei hoher Ammoniakkonzentration die gewünschte Leistung.

## 4 Diskussion

### 4.1 Linearitätsstudie

Wichtiger Bestandteil einer Methodenvalidierung ist die Ermittlung des Messbereichs sowie der unteren und oberen Nachweisgrenze einer Methode (ASVCP, 2009; Westgard, 2013).

Der PocketChem<sup>TM</sup> zeigt ab Konzentrationslevel 2 etwa doppelt so hohe Werte wie berechnet und überschreitet den  $TE_a$  für Ammoniak (ASVCP, 2013a). Ein positiver Bias des PocketChem<sup>TM</sup> in einer Linearitätsstudie wird bereits von Goggs et al. (2008) beschrieben. Die wässrige Ammoniaklösung diffundiert hierbei schneller als Vollblut durch die Reagenzienmembran und führt zu einem deutlichen Anstieg der Ammoniakkonzentration (Goggs et al., 2008). Die Verwendung wässriger Ammoniaklösung beschränkt die Beurteilung der Linearität am PocketChem<sup>TM</sup>, da die Methode für die Ammoniakmessung aus Vollblut konzipiert ist. Unter Berücksichtigung des positiven Bias, bedingt durch den Matrixeffekt der Ammoniaklösung, misst PocketChem<sup>TM</sup> akzeptabel linear. Die gemessene obere und untere Nachweisgrenze stimmt mit den Herstellerangaben überein (ARKRAY Inc., 2009). Der FUJI überschätzt teilweise um 8–13 % die tatsächliche Ammoniakkonzentration, überschreitet aber den  $TE_a$  für Ammoniak nicht und misst nach den ASVCP-Richtlinien akzeptabel linear (ASVCP, 2009, 2013a). Der positive Bias könnte, ähnlich wie beim PocketChem<sup>TM</sup>, durch die Methodik der Mikrodifffusion bedingt sein. Die untere Nachweisgrenze stimmt mit den Herstellerangaben überein, die obere ist durch die verwendete Ammoniakstandardlösung (294  $\mu\text{mol/l}$  Ammoniumsulfat, LT-AM 0025, Labor + Technik) niedriger, als die Herstellerangaben behaupten (FUJIFILM Corporation, 2010). Der solo überschreitet den  $TE_a$ , was auf eine hohe Messabweichung innerhalb der drei Wiederholungsmessungen bei Level 2 zurückzuführen ist. Hieraus ergibt sich eine erhöhte Ungenauigkeit (zufälliger Fehler des Analysegerätes). Die untere Nachweisgrenze stimmt mit den Herstellerangaben überein, die obere wird auch hier durch die verwendete Standardlösung nicht erreicht (Eurolyser Diagnostica GmbH). Der VitroVet zeigt eine exzellente Linearität, alle gemessenen Werte stimmen nahezu exakt mit den

berechneten Werten überein. Die untere Nachweisgrenze entspricht dem berechneten Wert und ist niedriger als jene in den Angaben des Reagenzienherstellers (Labor + Technik LT-SYS®). Die obere Nachweisgrenze liegt auch hier aufgrund der verwendeten Ammoniakstandardlösung unterhalb der Herstellerangaben. Das Vergleichsgerät Pentra hat einen negativen Bias von 7–13 %, befindet sich aber innerhalb des  $TE_a$ . Die untere Nachweisgrenze ist wie beim VitroVet tiefer als jene in den Herstellerangaben und die obere ist, wie bei den Geräten FUJI, solo und VitroVet, durch die verwendete Ammoniaklösung limitiert.

Zusammengefasst zeigt der VitroVet eine exzellente Linearität, Pentra und FUJI befinden sich innerhalb des  $TE_a$ , der solo befindet sich aufgrund seines zufälligen Fehlers außerhalb des  $TE_a$  und der PocketChem™ befindet sich wahrscheinlich aufgrund seiner Methodik und der verwendeten wässrigen Ammoniaklösung außerhalb des  $TE_a$ . Die untere Nachweisgrenze aller Geräte befindet sich innerhalb der Herstellerangaben, VitroVet und Pentra schneiden besser ab. Die obere Nachweisgrenze des Herstellers wird nur beim PocketChem™ erreicht, die anderen Geräte können den durch den Hersteller angegebenen, deutlich höheren Messbereich nicht detektieren, da die verwendete Ammoniaklösung auf 294  $\mu\text{mol/l}$  beschränkt ist. Auch wenn 294  $\mu\text{mol/l}$ , gemessen an einem Hund, eine hochgradige Erhöhung darstellt, wäre es wichtig, zur Kontrolle des Therapieerfolges (beispielsweise einer hepatischen Enzephalopathie) auch die extrem hohen Messbereiche der Geräte sicher zu kennen. Somit wäre eine Überprüfung der hohen Messbereiche der Geräte in Zukunft wünschenswert; in dieser Studie ist sie ein limitierender Faktor. Durch die Verwendung von Patientenproben wäre der beobachtete Matrixeffekt im Sinne einer schnelleren Diffusion wässriger Lösung durch die Membranen der Trockenchemiereagenzien mit der Folge eines positiven Bias zu vermeiden. Allerdings wäre dann aufgrund der hohen präanalytischen Empfindlichkeit des Parameters vor allem bezüglich Temperatur und Zeit mit einem erhöhten systematischen Fehler zu rechnen.

## 4.2 Replikationsstudie

### 4.2.1 Kurzzeitreplikationsstudie

Die Replikationsstudie dient der Ermittlung der Ungenauigkeit (Impräzision) beziehungsweise des zufälligen Fehlers einer Methode (Westgard et al., 1974). Die Ergebnisse werden zum einen am Vergleichsgerät Pentra und zum anderen mit den Herstellerangaben der Geräte beziehungsweise den verwendeten Reagenzien verglichen. Hierbei ist zu beachten, dass sich die Herstellerangaben, außer beim solo, auf humane Patientenproben mit teilweise zugefügtem Ammoniumsalz oder hergestellte Ammoniumlösungen beziehen. Auch sind die Ergebnisse der Geräte nicht exakt miteinander zu vergleichen. Zwar wurden ähnliche Konzentrationsbereiche für mittlere und hohe Proben gewählt, jedoch hat jedes Gerät unterschiedliche Patientenproben und hierdurch individuelle Ammoniumkonzentrationen erhalten. Letztlich erfolgt die abschließende Beurteilung der individuellen Geräteleistung anhand des Akzeptabilitätskriteriums  $TE_a$  für den Parameter Ammonium (ASVCP, 2009, 2013a).

In der Kurzzeitreplikationsstudie zeigt der FUJI bei mittlerer und hoher Ammoniumkonzentration die geringste Ungenauigkeit ( $M = 63,40$ ,  $SD = 1,35$ ,  $VK = 2,13$ ;  $M = 149,10$ ,  $SD = 1,85$ ,  $VK = 1,24$ ). Das Gerät befindet sich innerhalb der Herstellerangaben ( $VK \leq 6$ ) und misst präziser als das Vergleichsgerät Pentra ( $M = 75,49$ ,  $SD = 4,13$ ,  $VK = 5,47$ ;  $M = 151,90$ ,  $SD = 11,44$ ,  $VK = 7,07$ ) (FUJIFILM Corporation, 2010). Der VitroVet hat bei hoher Ammoniumkonzentration ( $M = 120,86$ ,  $SD = 3,74$ ,  $VK = 3,10$ ) ebenfalls einen niedrigeren zufälligen Fehler als das Vergleichsgerät und befindet sich innerhalb der Angaben des Reagenzienherstellers ( $M = 154,40$ ,  $SD = 6,22$ ,  $VK = 4,04$ ) (Labor + Technik LT-SYS®). VitroVet und Pentra überschreiten im mittleren Konzentrationsbereich die Herstellerangaben der verwendeten Reagenzien ( $M = 36,57$ ,  $SD = 1,81$ ,  $VK = 4,95$ ) (Labor + Technik LT-SYS®). Der PocketChem<sup>TM</sup> schneidet bei mittlerer und hoher Ammoniumkonzentration ( $M = 55,10$ ,  $SD = 4,20$ ,  $VK = 7,63$ ;  $M = 107,40$ ,  $SD = 8,42$ ,  $VK = 7,83$ ) etwas schlechter ab als das Vergleichsgerät Pentra. Die ermittelte Ungenauigkeit der überprüften Konzentrationsbereiche fällt höher aus als die Herstellerangaben ( $M = 41,5$ ,  $SD = 1,51$ ,  $VK = 3,6$ ;  $M = 83$ ,  $SD = 3,45$ ,  $VK = 4,1$ ), allerdings beziehen sich diese, wie oben erwähnt, auf humanes Vollblut

(ARKRAY Inc., 2009). Der PocketChem™ wurde bereits für die Ammoniakmessung des Hundes von Sterczer et al. (1999) validiert, hier ist der VK mit 4–7 % ähnlich zu den hier detektierten Werten, wobei der VK lediglich im Rahmen des Methodenvergleichs anhand von Doppelmessungen errechnet ist. Angaben über eine Replikationsstudie finden sich nicht (Sterczer et al., 1999). Goggs et al. validierten 2008 unter anderem den PocketChem™ für die Ammoniakmessung beim Hund. Sie ermitteln für das Gerät in einer Kurzzeitreplikationsstudie anhand einer Kontrolllösung im niedrigen Konzentrationsbereich ( $M = 28,7$ ,  $SD = 3,05$ ,  $VK = 10,6$ ) einen höheren, und im hohen Bereich ( $M = 122,9$ ,  $SD = 5,91$ ,  $VK = 4,8$ ) einen niedrigeren zufälligen Fehler als in der eigenen Studie. Aufgrund der Verwendung einer Kontrolllösung und der in der vorliegenden Studie verwendeten Patientenproben ist kein eindeutiger Vergleich möglich (Goggs et al., 2008).

FUJI, VitroVet, Pentra und PocketChem™ überschreiten den  $TE_a$  nicht. Die Geräte mit den verwendeten Reagenzien sind für die Ammoniakmessung beim Hund akzeptabel (ASVCP, 2009, 2013a). Der solo zeigt einen vergleichsweise hohen zufälligen Fehler ( $M = 60,10$ ,  $SD = 10,89$ ,  $VK = 18,12$ ;  $M = 210$ ,  $SD = 37,29$ ,  $VK = 17,76$  %) mit deutlicher Überschreitung der Herstellerangaben ( $M = 246$ ,  $VK = 4,9$ ). Eine mögliche Ursache könnte die lange Messdauer (acht Minuten pro Einzelmessung) mit einer Veränderung des Parameters sein, wobei sich keine konstante Erhöhung oder Erniedrigung, sondern eine willkürliche Streuung der einzelnen Messwerte zeigt. Der solo erfüllt im Bereich der mittleren Ammoniakkonzentration den Laborstandard nicht und überschreitet den  $TE_a$ . An dieser Stelle sollte der Test nicht akzeptiert werden und es müssen weitere Anstrengungen zur Identifizierung und Korrektur der Ungenauigkeit erfolgen (ASVCP, 2009, 2013a).

#### 4.2.2 Langzeitreplikationsstudie

Die Langzeitreplikationsstudie (20 Einzelmessungen an 20 verschiedenen Tagen) erfolgte an mehreren Tagen und wurde auf Grund der Instabilität des Parameters nicht an Patientenproben, sondern an Kontrollmaterial durchgeführt. Eine Erhöhung der Ammoniakkonzentration mit der Zeit wurde durch Hitt und Jones (1986) bereits für den Hund beschrieben. Der erste Kontrollzeitpunkt war 24

Stunden nach Blutentnahme und es zeigte sich bei den überprüften Lagerungstemperaturen von 21, 4, -15 und -40 °C eine hochgradige Erhöhung der Ammoniakkonzentration um das jeweils 31-, 3,2-, 79- und 70-fache (Hitt und Jones, 1986).

Der PocketChem™ erzielt mit einem VK von 1,83 % das beste Ergebnis im Vergleich zu den anderen Geräten und misst deutlich genauer als in der Kurzzeitreplikationsstudie. Allerdings ist anzumerken, dass die Qualitätskontrolle des Herstellers nicht, wie bei den anderen Geräten, aus einem Reagenz mit einer bestimmten Ammoniakkonzentration, sondern aus einem Plastikstreifen mit einer Graustufe (diese spiegelt eine bestimmte Ammoniakkonzentration wider) besteht. Aus diesem Grund ist die Genauigkeit des PocketChem™ in diesem Versuch kritisch zu beurteilen und entspricht nicht den realen Routinebedingungen. Den nächsten geringsten zufälligen Fehler zeigt der Pentra, gefolgt von FUJI und VitroVet; alle Geräte haben einen VK von unter 5 %. Der solo hat, wie auch in der Kurzzeitreplikationsstudie, den höchsten zufälligen Fehler mit einem VK von 11,37 %. Die oben aufgeführte Überlegung, dass der solo in der Kurzzeitreplikationsstudie aufgrund des Zeitfaktors und der damit möglichen Veränderung des Parameters eine erhöhte Ungenauigkeit zeigt, ist somit unwahrscheinlich.

Die Leistung aller Geräte außer der des solo befindet sich innerhalb der Herstellerangaben. Der solo befindet sich hier aber mit den anderen Geräten innerhalb des geforderten Kriteriums für die Ammoniakmessung des Hundes, der  $TE_a$  wird nicht überschritten. Allerdings muss bei den folgenden Untersuchungen auf die erhöhte Ungenauigkeit des solo geachtet werden.

### **4.3 Interferenzstudie Ikterus, Hämolyse, Lipämie**

Ikterus, Hämolyse und Lipämie sind vielfach vorkommende Interferenzen der zu analysierenden Blutproben und ein häufiges Problem verschiedener Analysemethoden (Bellamy und Olexson, 2000). Die Interferenzstudie dient der Abschätzung des systematischen Fehlers, der durch Störsubstanzen in den zu analysierenden Proben auftritt. Der systematische Fehler ist konstant und verhält

sich proportional zur Konzentration der Störsubstanz (Westgard, 2008; ASVCP, 2009).

### **Hämolyse**

In der durchgeführten Interferenzstudie an den Geräten PocketChem™, FUJI, VitroVet und Pentra (der solo wurde, wie bereits erwähnt, aufgrund seiner erhöhten Ungenauigkeit bei diesem Versuch nicht berücksichtigt) verursacht Hämoglobin an allen Geräten eine hochgradige und auch die stärkste Interferenz. Der positive Bias der Trockenchemiegeräte/Mikrodiffusion (FUJI, PocketChem™) ist niedriger als der der Nasschemiegeräte/Enzymmethode (Pentra, VitroVet). Die Ammoniakkonzentration steigt bei allen Geräten um mehr als das Doppelte gegenüber der Ausgangskonzentration an. Eine Ursache für die Enzymmethode ist eine die photometrische Messung beeinflussende, trübungsbedingte Extinktionsänderung (Da Fonseca-Wollheim, 1973). Die Trockenchemiegeräte schneiden in dieser Studie schlechter ab als vom Hersteller angegeben (ARKRAY Inc., 2009; FUJIFILM Corporation, 2010). Eine mögliche Ursache des positiven Bias der Trockenchemiegeräte könnte die starke Dunkelfärbung des Reagenzstreifens (PocketChem™) beziehungsweise des Reagenzplättchens (FUJI) darstellen, da die Intensität des Farbumschlags hierbei proportional zur Ammoniakkonzentration ist. Für das verwendete Reagenz an den Nasschemiegeräten gibt der Hersteller lediglich an, dass Hämolyse stört (Labor + Technik LT-SYS®). Auch der  $TE_a$  für Ammoniak wird deutlich überschritten.

Es wäre sinnvoll, in zukünftigen Studien die untere Konzentration (keine Interferenz vorhanden) der interferierenden Substanz zu ermitteln, sodass der genaue Einfluss bei der Auswertung hyperammonämischer Proben bekannt ist. Durch die hier vorliegende Studie kann gesagt werden, dass auch Proben mit einer Hämoglobinkonzentration von 300 mg/dl bei der Ammoniakmessung an den überprüften Geräten mit den verwendeten Reagenzien stark interferieren und einen positiven Bias verursachen. Das heißt, in hämolytischen Proben wird der Ammoniak bei den hier evaluierten Geräten falsch hoch gemessen.

### **Ikterus**

Das einzige Gerät ohne Interferenz durch Bilirubin ist der FUJI. Dieser hat den  $TE_a$  nicht überschritten und übertrifft sogar die Herstellerangaben. Die Geräte VitroVet, PocketChem™ und Pentra zeigen einen positiven Bias gegenüber der Störsubstanz und interferieren mit der Ammoniakmessung. Die Abweichung ist zwar deutlich geringer als durch Hämoglobin, überschreitet aber dennoch den  $TE_a$  je nach Gerät um 10 % (VitroVet), 31 % (PocketChem™) und 37 % (Pentra). VitroVet und Pentra stimmen mit den Angaben des Reagenzienherstellers überein, der PocketChem™ schneidet schlechter ab als vom Hersteller angegeben.

Auch bei diesem Versuch bedarf es einer zukünftigen Studie, welche die genaue Grenze der interferierenden Bilirubinkonzentration für eine bessere Interpretation hyperammonämischer Proben ermittelt. Durch den hier vorliegenden Versuch kann gesagt werden, dass der FUJI Bilirubin bis zu einer Konzentration von 80 mg/dl toleriert (Herstellerangaben bis 20 mg/dl), der PocketChem™ Bilirubin mit einer Konzentration von 20 mg/dl nicht toleriert (Herstellerangaben bis 40 mg/dl) und VitroVet und Pentra 20 mg/dl Bilirubin nicht tolerieren, was den Angaben des Reagenzienherstellers entspricht.

### **Lipämie**

Die beiden Mikrodiffusionsgeräte (PocketChem™ und FUJI) zeigen bei 400 mg/dl keine Interferenz mit Intralipid®, Herstellerangaben hierzu liegen nicht vor. Der  $TE_a$  wird nicht überschritten. Die beobachtete Abweichung bei höherer Konzentration ergibt, wie auch bei den anderen Störsubstanzen Hämoglobin und Bilirubin beobachtet, einen zu hohen positiven Bias mit erhöhter Ammoniakkonzentration. Die beiden Nasschemiegeräte (VitroVet und Pentra) sind selbst von der niedrigen Konzentration Intralipid® (400 mg/dl) gestört, der Bias ist ähnlich hoch wie bereits durch Bilirubin gesehen. Die Herstellerangaben des verwendeten Reagenzes und der  $TE_a$  für Ammoniak werden überschritten. Stark lipämische Proben führen, ähnlich wie hämolytische Proben, zu trübungsbedingten Extinktionsänderungen und sind für die enzymatische Ammoniakmessung ungeeignet (Da Fonseca-Wollheim, 1973).

Auch an dieser Stelle sind weiterführende Studien zur Ermittlung der Interferenzgrenzen sinnvoll. Eine mögliche Idee wäre die Untersuchung lipämischer Proben nach Zugabe eines fettklärenden Argens, beispielsweise LipoClear®.

#### 4.4 Lagerungsstudie

Ammoniak ist ein sehr instabiler Parameter, der spezieller Aufmerksamkeit bei Probengewinnung, Transport und Lagerung bedarf. Für den Versuch wurden praxisnahe Umstände (Kühlschrank- und Raumtemperatur) gewählt. Der Parameter Ammoniak wird bei Kühlschrank- (4 °C) und Raumtemperatur (20 °C) zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 120 Minuten mittels Dreifachmessung an EDTA-Blutproben der Tierart Hund überprüft. Die Diskussion der Ergebnisse bezieht sich für EDTA-Vollblut auf den PocketChem™, da dieses Gerät als einziges und ausschließlich für Vollblut konzipiert ist. Für EDTA-Plasma bezieht sich die Diskussion auf den FUJI, da dieser die geringste Ungenauigkeit im Vergleich zu den anderen für Plasma konzipierten Geräten gezeigt hat.

Die Untersuchungsergebnisse belegen, dass das Ammoniak in EDTA-Vollblut stärker ansteigt als in EDTA-Plasma und dass der Anstieg bei 20 °C höher ausfällt als bei 4 °C, unabhängig von Vollblut oder Plasma. Für Ammoniak aus EDTA-Vollblut (PocketChem™) ergeben sich folgende mittlere prozentuale Abweichungen zum Ausgangswert: Bei 20 °C steigt das Ammoniak nach 30, 60 und 120 Minuten um jeweils 6,48 %, 10,53 % und 16,19 % an, bei 4 °C sind es 1,92 %, 7,68 % und 11,91 %. Für Ammoniak aus EDTA-Plasma (FUJI) ergeben sich folgende mittlere prozentuale Abweichungen zum Ausgangswert: Bei 20 °C steigt das Ammoniak nach 30, 60 und 120 Minuten um jeweils 3,14 %, 3,14 % und 6,28 % an, bei 4 °C sind es 2,17 %, -1,09 % und 4,35 %. Hitt und Jones (1986) untersuchten in ihrer Lagerungsstudie für Ammoniak heparinisierendes Hundeplasma. Der erste Kontrollzeitpunkt war 24 Stunden nach Blutentnahme. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Ammoniaks gegenüber der Ausgangskonzentration, wobei der Anstieg bei 21 °C in der Summe mit 237,87 % (ohne Ausreißer) höher als bei 4 °C mit 125,65 % ausfiel (Hitt und Jones, 1986). Auch Prytz et al. (1970) wählten den ersten Kontrollzeitpunkt nach 24 Stunden, allerdings untersuchten sie heparinisierendes Vollblut von Hunden. Der Anstieg der

Ammoniakkonzentration bei 4 °C betrug 92 % (Prytz et al., 1970). Diese Beobachtungen, dass das Ammoniak mit der Zeit und auch bei Raumtemperatur stärker ansteigt als bei Kühlschranktemperatur, obwohl der erste Kontrollzeitpunkt mit 24 Stunden deutlich länger ist als der selbst überprüfte, stimmen mit den eigenen Ergebnissen überein. Die Lagerungsstudie von Simundic und Dukic (2015) untersuchte heparinisiertes humanes Plasma. Es zeigte sich ein Unterschied zur Ausgangskonzentration von 18 % nach einer Stunde, 20 % nach zwei und 25 % nach drei Stunden, gelagert bei 4 °C (Dukic und Simundic, 2015). Die prozentuale Abweichung zum Ausgangswert nach einer und zwei Stunden (18 und 20 %) ist deutlich höher als in der eigenen Untersuchung (3,14 % und 6,28 %). Eine mögliche Ursache wäre, dass Simundic und Dukic Blutproben nicht gesunder Probanden verwendet haben, sodass der Einfluss einer eventuell erhöhten Aktivität der  $\gamma$ -Glutamyltransferase, die einen schnelleren Anstieg der Ammoniakkonzentration bewirkt, nicht ausgeschlossen werden kann (Da Fonseca-Wollheim, 1990a). Darüber hinaus ist die Zeit bis zur Abzentrifugation des Plasmas nicht bekannt. Dennoch stimmt die Beobachtung, dass die Ammoniakkonzentration mit der Zeit ansteigt, mit den eigenen Ergebnissen überein. Untersuchungen humaner EDTA-Plasmaproben mit einer normalen Aktivität der  $\gamma$ -Glutamyltransferase zeigen bei Raumtemperatur eine Stunde und drei Stunden nach Blutentnahme jeweils eine Differenz von ungefähr 5 %, nach fünf Stunden beträgt der Ammoniakanstieg weit über 20 % (Schuff-Werner und Steiner, 2015). Die eigenen Werte von 3,14 % nach einer Stunde und 6,28 % nach zwei Stunden stimmen mit dieser Beobachtung überein.

Die Ammoniakkonzentration in EDTA-Vollblut ist in der eigenen Studie bei 20 °C zu den überprüften Zeitpunkten (30, 60 und 120 Minuten) jeweils um 3,34 %, 7,39 % und 9,01 % höher als die Ammoniakkonzentration in EDTA-Plasma. Der Unterschied ist bei 4 °C mit jeweils -0,2 %, 6,59 % und 7,56 % geringer als bei 20 °C. Prellwitz et al. (1976) beschreiben einen signifikanten Unterschied zwischen humanem EDTA-Plasma und EDTA-Vollblut sowie der Lagerungstemperatur. So steigt die Ammoniakkonzentration in EDTA-Vollblut bei 20 °C nach 20 Minuten um ca. 11-17 %, in EDTA-Plasma bei 20 °C nach 20 Minuten nur noch um ca. 3–6 % und bei 4 °C nach 20 Minuten nur noch um ca. 1–4 % (Prellwitz et al., 1976). Die prozentualen Abweichungen stimmen zwar nicht

exakt mit den eigenen Ergebnissen überein, aber dass der Ammoniakanstieg bei 20 °C höher als bei 4 °C und in EDTA-Vollblut höher als in EDTA-Plasma ausfällt, kann bestätigt werden. Da Fonseca-Wollheim (1990b) beobachtete ebenfalls einen höheren Anstieg in EDTA-Vollblut als in EDTA-Plasma. Bei 20 und 37 °C errechnet sich eine positive Korrelation der Erythrozyten sowie der Anstieg der Ammoniakkonzentration, bei 0 °C ergibt sich keine Korrelation (Da Fonseca-Wollheim, 1990b). Diesen Unterschied zeigten auch Lindner und Bauer für die Tierart Pferd durch mit EDTA versetzte Proben (Lindner und Bauer, 1993). Da Fonseca-Wollheim (1990b) berechnete einen medianen Anstieg der Ammoniakkonzentration pro Stunde für humanes EDTA-Plasma bei 0 °C, 20 °C und 37 °C von jeweils 3,9 µmol/l, 5,2 µmol/l und 25,2 µmol/l (Da Fonseca-Wollheim, 1990b). Die Ergebnisse der eigenen Studie zeigen eine stündliche Differenz der mittleren Ammoniakkonzentration in EDTA-Plasma bei 4 °C von 0,67 µmol/l (nach einer Stunde), von 2,67 µmol/l (nach zwei Stunden), bei 20 °C von 2 µmol/l (nach einer Stunde) und von 4 µmol/l (nach 2 Stunden) und stimmen mit den Beobachtungen von Da Fonseca-Wollheim (1990b) weitestgehend überein. Die Ammoniakkonzentration in humanem EDTA-Vollblut bleibt bis 30 Minuten bei einer Lagerungstemperatur von 0 °C konstant, nach 30 Minuten steigt die mittlere Ammoniakkonzentration um 2 µmol/l an (Da Fonseca-Wollheim, 1990b). Die Werte der eigenen Studie sind mit 3,67 µmol/l bei 4 °C etwas höher, aber vergleichbar. Die wenigen in der Literatur beschriebenen Lagerungsstudien bezüglich Ammoniak für die Tierart Hund zeigen vielfach höhere prozentuale Abweichungen als die eigenen Untersuchungen. Allerdings beruhen diese Studien auf deutlich älteren Messmethoden, längeren Zeitabständen bis zur Zentrifugation und deutlich größeren Zeitabständen bis zur Kontrollmessung (Prytz et al., 1970; Hitt und Jones, 1986).

Der zulässige Gesamtfehler von 20 % für Ammoniak wird in der durchgeführten Studie zwar nicht überschritten, sodass die Ammoniakmessung aus caninem EDTA-Vollblut und EDTA-Plasma bei 4 °C und 20 °C über einen Zeitraum von zwei Stunden erfolgen könnte, allerdings wäre eine strengere Empfehlung beziehungsweise die genaue Angabe der zu erwartenden prozentualen Abweichung (siehe oben) pro Zeiteinheit bei der jeweiligen Lagerungstemperatur sinnvoll. Soll die Abweichung für die Ammoniakmessung aus EDTA-Vollblut unter

5 % liegen, empfiehlt sich die Lagerung bei 4 °C und die Messung der Probe innerhalb von 30 Minuten. Soll die Abweichung für die Ammoniakkonzentration aus EDTA-Plasma ebenfalls unter 5 % betragen, wäre die entsprechende Empfehlung bei 4 °C zwei Stunden und bei 20 °C eine Stunde bis zur Messung. Bei dieser Empfehlung ist darauf zu achten, das Plasma unmittelbar nach der Blutentnahme abzutrennen, um eine unerwünschte Interaktion mit den Erythrozyten zu vermeiden.

#### **4.5 Einfluss der Antikoagulanzen Heparin und EDTA**

Die Ergebnisse des Antikoagulanzenvergleichs zeigen sowohl an den Trockenchemiegeräten/Mikrodiffusionsmethode (PocketChem™, FUJI) als auch an den Nasschemiegeräten/Enzymmethode (VitroVet, Pentra) einen signifikanten Unterschied zwischen Heparin und EDTA zur Bestimmung der Ammoniakkonzentration aus Hundeblut. Die Ammoniakkonzentration der Heparin-Blutproben fällt hierbei niedriger aus als die der EDTA-Blutproben. Dieser Unterschied ist an den Nasschemiegeräten mittels Enzymmethode größer ( $p=0,0002$ ) als an den Trockenchemiegeräten mittels Mikrodiffusion ( $p=0,002$ ,  $p=0,004$ ). Dorwart und Saner beschrieben erstmals 1992 für den Menschen einen Unterschied des Einflusses der Antikoagulanzen bezüglich der Ammoniakbestimmung mittels Enzymmethode. Jede zehnte bis zwanzigste Messung aus heparinisiertem humanem Plasma führte zu falsch niedrigen Werten im Vergleich zu den Messungen aus EDTA-Proben. Abnormale Blutwerte oder probandenspezifische Ursachen wurden von den Autoren ausgeschlossen. Sie beobachteten bei der Messung von Heparin-Proben eine initiale un stabile Absorption mit Aufwärtsdrift; dieser Effekt trat nicht bei EDTA-Proben auf (Dorwart und Saner, 1992). Da Fonseca-Wollheim beschrieb trübungsabhängige Extinktionsänderungen durch heparinisierte humane Plasmaproben, je nach verwendetem Testansatz (Da Fonseca-Wollheim, 1973). Die Optimierung der Reagenzien des Testansatzes versprach unbeeinflusste Ammoniakbestimmung heparinisierter Proben (Da Fonseca-Wollheim und van Dam, 1992). Wannaslip et al. (2006) merkte an, dass der Reagenzpuffer von Trispuffer zu Triethanolaminpuffer im Testansatz der Ammoniak-Produktinformation von Roche Diagnostics 1998 geändert wurde und Heparin sowie EDTA für die

Probensammlung empfohlen wurden. Im Jahr 2000 zeigte sich allerdings, dass auch mit verbessertem Testansatz in den Produktinformationen die Ammoniakbestimmung ausschließlich aus EDTA-Plasma empfohlen wurde, allerdings ohne Begründung (Wannasilp et al., 2006). Wannasilp et al. berichteten 2005 und 2006 von teilweise falsch niedrigen Ammoniakkonzentrationen heparinierter humaner Plasmaproben im Vergleich zu EDTA-Proben. Die größte Differenz auffälliger Proben betrug -88,9 %, die mittlere Differenz zufälliger Proben lag bei -11,59 % gegenüber EDTA. Sie empfahlen für die Ammoniakmessung mittels Enzymmethode die ausschließliche Verwendung von EDTA als Antikoagulanzen (Wannasilp et al., 2005; Wannasilp et al., 2006). Diese Empfehlung deckt sich mit den Herstellerangaben des für den VitroVet und Pentra verwendeten Reagenz für die Ammoniakmessung humaner Blutproben (Labor + Technik LT-SYS®) und wird durch die hier durchgeführte Antikoagulanzenstudie auch für die Tierart Hund bestätigt. Der größte Unterschied einer Einzelmessung beträgt am Pentra -58,56 % und die mittlere Differenz aus 13 Messungen liegt bei -24,01 % (VitroVet -55,49 und -21,85 %) gegenüber EDTA-Proben. Für die Ammoniakbestimmung mittels Mikrodifusion werden Heparin und EDTA als Antikoagulanzen humaner Blutproben von den Herstellern des PocketChem™ und des FUJI angegeben (ARKRAY Inc., 2008; FUJIFILM Corporation, 2012). Sterczer et al. (1999) konnten für die Mikrodifusionsmethode VetTest 8008 keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Antikoagulanzen, getestet an 15 Hundebloodproben, feststellen (Sterczer et al., 1999). Die in der eigenen Studie an Hundebloodproben ermittelten Ergebnisse an PocketChem™ (n = 10) und FUJI (n = 14) zeigen einen deutlichen Unterschied, widersprechen den Herstellerangaben und decken sich nicht mit der Beobachtung von Sterczer et al. (1990) (Sterczer et al., 1999). Der größte Unterschied heparinierter Proben einer Einzelmessung beträgt am PocketChem™ -53,85 % und die mittlere Differenz liegt bei -21,33 % (FUJI -51,61 % und -13,15 %) im Vergleich zu EDTA-Proben.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Antikoagulanzenstudie, dass heparinisierte Hundebloodproben sowohl bei der Enzymmethode (VitroVet, Pentra) als auch bei der Mikrodifusionsmethode (PocketChem™, FUJI) eine signifikant niedrigere Ammoniakkonzentration aufweisen. Die Autorin empfiehlt aus diesem Grund für die Ammoniakmessung aus Blut für die Tierart Hund die Verwendung

von EDTA als Antikoagulant an den überprüften Geräten und Reagenzien. Zukünftige Untersuchungen werden benötigt, um die Ursache der Ammoniakerniedrigung heparinierter Blutproben vollständig zu klären.

#### **4.6 Methodenvergleich**

Als Teil der Methodenvalidierung dient der Methodenvergleich zur Überprüfung der Richtigkeit und der Ermittlung des systematischen Fehlers Bias (konstant oder proportional) neuer Analysegeräte (Westgard und Hunt, 1973; Westgard, 2008). Ideal ist der Vergleich der neuen Geräte mit einer Referenzmethode, einer hoch qualifizierten Methode, deren Ergebnis mit einer „maßgeblichen Methode“, die den wahren Wert ermittelt, übereinstimmt. Für die Ammoniakmessung aus Blut ist weder in der Human-, noch in der Veterinärmedizin eine Referenzmethode verfügbar. In solchen Fällen muss auf eine Vergleichsmethode, also eine gebräuchliche Methode aus der Routinediagnostik, zurückgegriffen werden (Tietz, 1979; Haweke, 2012). Für Ammoniak ist die gebräuchlichste Methode die enzymatische Methode (Haweke, 2012). Aus diesem Grund dient die enzymatische Methode an dem etablierten Großlaborinstrument Pentra in dieser Studie als Vergleichsmethode.

##### **Vergleichsmethode Pentra**

Wird im Methodenvergleich eine neue Methode mit einer Vergleichsmethode und nicht mit einer Referenzmethode verglichen, ist es wichtig zu berücksichtigen, dass lediglich Aussagen über die Vergleichbarkeit, nicht aber über die Richtigkeit der neuen Methode getroffen werden können, da davon auszugehen ist, dass auch die Vergleichsmethode fehlerbehaftet ist. Wie in der Replikationsstudie gesehen, muss bei dem Vergleichsgerät Pentra mit einem gewissen zufälligen Fehler ( $M = 75,49$ ,  $SD = 4,13$ ,  $VK = 5,47$ ;  $M = 151,90$ ,  $SD = 11,44$ ,  $VK = 7,07$ ), der sogar größer ausfällt als bei den Geräten FUJI und VitroVet, gerechnet werden. Auch sind im Methodenvergleich Differenzen innerhalb der Doppelmessungen aufgetreten (Pentra: 8/43 Doppelmessungen, Differenz  $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ , 2/ 8  $> 30 \mu\text{mol/l}$ ). Die zwei Werte mit einer Differenz von über  $30 \mu\text{mol/l}$  innerhalb der jeweiligen Wiederholungsmessung befinden sich zwar im sehr hohen Konzentrationsbereich, sodass kein Unterschied in der klinischen Entscheidung

entsteht, dennoch ist ein erhöhter zufälliger Fehler bei einer Vergleichsmethode problematisch. Gemittelt unterscheidet sich einer der beiden Werte mit einer Differenz von über 30  $\mu\text{mol/l}$  zwischen den jeweiligen Einzelmessungen nur gering vom M der anderen Geräte mit ähnlichen Doppelmessungen, sodass dieser in der statistischen Auswertung nicht ins Gewicht fällt. Der andere Wert ( $M = 271,05 \mu\text{mol/l}$ ) hingegen fällt in der Statistik (gesehen in der Passing-Bablok und Bland-Altman-Analyse) als Ausreißer auf und die eigentliche Ammoniakkonzentration der Probe wurde vom Vergleichsgerät Pentra möglicherweise überschätzt. Präanalytische Faktoren wie Ikterus, Hämolyse, Lipämie, erhöhte  $\gamma$ -Glutamyltransferase oder ein langer Zeitraum zwischen Probennahme und Messung wurden im Vorhinein vom Versuch ausgeschlossen. Das bedeutet, die Ursache des Ausreißers ist nicht bekannt. Ein zeitlicher Zusammenhang ist unwahrscheinlich, da zwischen den Doppelmessungen nur wenige Sekunden liegen. Eine im Nachhinein nicht auszuschließende Möglichkeit wäre die Aufnahme von Luftblasen einer nicht gut in das Probengefäß pipettierten Probe mit anschließender Fehlmessung. Sterczer et al. (1999) wählten in ihrer Methodenvergleichsstudie zur Ammoniakmessung beim Hund ebenfalls die enzymatische Methode an einem Großlaborinstrument (Multistat centrifugal analyser, Instrumentation Laboratories; Reagenz Monotest, Boehringer) als Vergleichsmethode. Angaben über Replikationsstudien zur Ermittlung des zufälligen Fehlers der Vergleichsmethode liegen nicht vor, aber der angegebene VK von 2-8 %, errechnet aus den Doppelmessungen des Methodenvergleichs, ist ähnlich zu den in der eigenen Studie berechneten Variationskoeffizienten (Sterczer et al., 1999). Eine andere Methodenvergleichsstudie für die Ammoniakmessung bei der Tierart Hund hat ebenfalls die enzymatische Methode an einem Großlaborinstrument (Gilford Stasar III, Nova Biotech; Reagenz Ammonia Enzymatic UV Method, Randox) als Vergleichsmethode verwendet, wobei Angaben zur Überprüfung des zufälligen Fehlers dieser Methode fehlen (Goggs et al., 2008).

### **PocketChem™**

Im Methodenvergleich der eigenen Studie zeigt der PocketChem™ im Vergleich zum Pentra einen negativen proportionalen Bias im Konzentrationsbereich bis

circa 60  $\mu\text{mol/l}$  mit Überschreitung des  $\text{TE}_a$  sowie insgesamt einen negativen konstanten Bias über den gesamten Konzentrationsbereich von 4,66  $\mu\text{mol/l}$ . Sterczer et al. (1999) berechneten in ihrer Methodenvergleichsstudie zur Ammoniakmessung beim Hund für den Vergleich des Blood Ammonia Checker II (Gerätetyp und Methodik entsprechen PocketChem<sup>TM</sup>) mit der Enzymmethode mittels Bland-Altman-Analyse eine Differenz von  $2\text{SD} = 34 \mu\text{mol/l}$ . Ein negativer proportionaler Bias im unteren Konzentrationsbereich wie in der eigenen Studie zeigt sich nicht (Sterczer et al., 1999). Goggs et al. (2008) ermittelten für die Ammoniakmessung des Hundes am PocketChem BA analyzer im Vergleich zur Enzymmethode zwar auch einen negativen proportionalen Bias im unteren, aber einen deutlich größeren im oberen Konzentrationsbereich sowie einen deutlich größeren negativen konstanten Bias von 38,1  $\mu\text{mol/l}$ . Auf Grund der Einzelmessungen sind Ausreißer weder am PocketChem BA analyzer noch am Vergleichsgerät zu identifizieren. Eine verdächtige Probe konnte im Vergleich zur Klinik des Patienten als falsch tiefe Messung des PocketChem BA analyzer identifiziert werden (Goggs et al., 2008). Als Ursache des hohen proportionalen und konstanten Bias kommt möglicherweise die Verwendung von Proben in Frage, die zwar am PocketChem BA analyzer im oberen noch messbaren Bereich von 286  $\mu\text{mol/l}$  liegen, sich aber am Vergleichsgerät in einem Bereich von circa 300 bis über 450  $\mu\text{mol/l}$  (neun von 41 Proben) befinden. Die eigenen Daten stimmen mit dem hohen negativen und proportionalen Bias nicht überein, lediglich der negative Bias im unteren Konzentrationsbereich ist vergleichbar. In der eigenen Studie ist im unteren Konzentrationsbereich der  $\text{TE}_a$  überschritten, sodass an dieser Stelle eine andere Kalibrierung des PocketChem<sup>TM</sup> oder eine Anhebung der klinischen Entscheidungsgrenzen auf 100  $\mu\text{mol/l}$  erfolgen sollte.

Referenzwerte für die Ammoniakmessung des Hundes in der Literatur sind rar (Clarke et al., 1959; Reif, 1960; Meyer et al., 1978; Rothuizen und van den Ingh, 1982a, 1982b; Hitt und Jones, 1986; Guilford et al., 1996; Kaneko et al., 2008; Moritz, 2013; Neumann, 2013). Deshalb ist das Fehlen von geräteeigenen Referenzintervallen aufgrund der ausschließlichen Verwendung von Restblutmengen ein großer Mangel der eigenen Studie, sodass zukünftig diesbezüglich weitere Studien notwendig sind.

## FUJI

Für den FUJI existieren zum Zeitpunkt der Anfertigung der Arbeit nach Wissen der Autorin keine Literaturangaben bezüglich einer Methodenvalidierung für den Parameter Ammoniak für die Tierart Hund. Im Methodenvergleich der eigenen Studie zeigt der FUJI im Vergleich zum Pentra einen negativen proportionalen Bias im Konzentrationsbereich bis circa 50  $\mu\text{mol/l}$  mit einer knappen Überschreitung des  $\text{TE}_a$ , einen positiven proportionalen Fehler im oberen Konzentrationsbereich ohne Überschreitung des  $\text{TE}_a$  und insgesamt einen positiven konstanten Bias über den gesamten Konzentrationsbereich von 6,73  $\mu\text{mol/l}$ . Insgesamt zeigt der FUJI, wie in den Replikationsstudien ( $M = 63,40$ ,  $SD = 1,35$ ,  $VK = 2,13$ ;  $M = 149,10$ ,  $SD = 1,85$ ,  $VK = 1,24$ ) bereits gesehen, auch im Methodenvergleich einen sehr niedrigen zufälligen Fehler, keine der 43 Doppelmessungen differiert um mehr als 9  $\mu\text{mol/l}$ , und im Konzentrationsbereich bis 60  $\mu\text{mol/l}$  unterscheidet sich keine Doppelmessung um mehr als 3  $\mu\text{mol/l}$ . Bei genauer Betrachtung der Daten im Bereich des negativen proportionalen Bias mit Überschreitung des  $\text{TE}_a$  fällt auf, dass das Vergleichsgerät Pentra an diesen Stellen entweder einen erhöhten zufälligen Fehler innerhalb der Doppelmessungen oder höhere Ammoniakkonzentrationen als die anderen Geräte (ausgenommen solo aufgrund seines hohen zufälligen Fehlers) aufweist. Die Frage, welches Gerät den wahren Wert misst, kann nicht beantwortet werden.

## solo

Der vom Hersteller des solo entwickelte Ammoniaktest für Hunde und Katzen wird mit einer Korrelation von  $y(\text{solo}) = 0,972$  (Referenz-Methode) + 0,233 mit dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,985$  angegeben, genauere Angaben finden sich nicht (Eurolyser Diagnostica GmbH). Allerdings erteilt der Korrelationskoeffizient lediglich eine Aussage darüber, wie gut die ermittelten Daten den Analysebereich abdecken, er ist kein Maß für die Übereinstimmung der Methoden (Westgard und Hunt, 1973). In der eigenen Studie errechnet sich eine gute Korrelation ( $r_s = 0,92$ ) zwischen solo und der Vergleichsmethode, doch in den weiterführenden Berechnungen (Passing-Bablok und Bland-Altman-Analyse) wird eine große Diskrepanz zwischen den beiden Methoden ersichtlich. Der solo ist im Methodenvergleich außerdem aufgrund seines bereits bekannten hohen zufälligen

Fehlers aus den Replikationsversuchen ( $M = 60,10$ ,  $SD = 10,89$ ,  $VK = 18,12$ ;  $M = 210$ ,  $SD = 37,29$ ,  $VK = 17,76$ ) und des ebenfalls erhöhten zufälligen Fehlers innerhalb der Doppelmessungen (28/43 Doppelmessungen  $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ , 13/28  $\geq 30 \mu\text{mol/l}$ ) schwierig mit dem Pentra zu vergleichen. Der solo misst im Vergleich zum Pentra im Konzentrationsbereich bis  $100 \mu\text{mol/l}$  teils höhere und teils tiefere Ammoniakkonzentrationen und im Bereich über  $100 \mu\text{mol/l}$  höhere Konzentrationen mit jeweils deutlicher Überschreitung des zulässigen Gesamtfehlers. Der positive konstante Bias über den gesamten Konzentrationsbereich beträgt  $12,74 \mu\text{mol/l}$ . Aufgrund der hohen Ungenauigkeit des Analysegerätes ist die richtige Interpretation klinischer Proben schwierig. Zur Verbesserung könnten anstelle von Doppelmessungen Dreifachmessungen bei der Identifizierung von Ausreißern helfen. Allerdings können beim solo keine Mehrfachmessungen aus einem Testansatz erfolgen, sodass mit einem erhöhten Zeit- und Kostenaufwand (Dauer der Einzelmessung circa 8 Minuten) gerechnet werden muss. Weitere Studien zur Ursachensuche des hohen zufälligen Fehlers des solo sind notwendig. Erst mit einer höheren Genauigkeit des Gerätes lässt sich sein systematischer Fehler im Methodenvergleich zuverlässig ermitteln.

### **VitroVet**

Der VitroVet hat im Methodenvergleich eine gute Übereinstimmung mit der Vergleichsmethode Pentra (Steigung =  $0,99$ , Schnittpunkt =  $-3,15$ ) mit einem geringen negativen konstanten Bias von  $5,04 \mu\text{mol/l}$ . Die wenigen in der Bland-Altman-Analyse aufgefallenen Messungen außerhalb des  $TE_a$  befinden sich im Konzentrationsbereich bis  $50 \mu\text{mol/l}$  und verhalten sich ähnlich wie bereits am FUJI beschrieben. Welches Gerät den wahren Wert misst, kann nur vermutet werden. Da der Pentra ein sehr gut etabliertes und in der Routinediagnostik eingesetztes Großlaborinstrument mit vielen für die Veterinärmedizin validierten Parametern ist, diente es in diesem Versuch mit dem entsprechenden Reagenz als Vergleichsgerät. Der VitroVet hingegen ist noch nicht validiert, aber in Anbetracht der Ergebnisse der Methodenvalidierung des Parameters Ammoniak für den Hund zeigt er einen geringeren zufälligen Fehler als das Vergleichsgerät. Am VitroVet wurden die gleichen Kontrolllösungen und das gleiche Reagenz wie am Pentra überprüft, sodass an dieser Stelle der VitroVet den Pentra nicht nur gut

ersetzen, sondern auch möglicherweise in zukünftigen Studien bezüglich der Ammoniakmessung als Vergleichsmethode dienen könnte.

#### 4.7 Akzeptabilität der Methode

Die in der Methodvalidierung für die Ammoniakmessung beim Hund durchgeführten Studien haben unterschiedliche Fehlerarten ermittelt. Letztendlich kann der  $TE_{obs}$  berechnet und mit dem  $TE_a$  für den Parameter Ammoniak verglichen werden. Der  $TE_{obs}$  beinhaltet den zufälligen Fehler in Form des VK aus den Replikationsstudien und den systematischen Fehler in Form des Bias aus dem Methodenvergleich ( $TE_{obs} = 2VK [\%] + Bias [\%]$ ). Die Leistung der Geräte ist akzeptabel, wenn der  $TE_{obs}$  kleiner als der  $TE_a$  ist ( $TE_{obs} < TE_a$ ) (Westgard et al., 1974; ASVCP, 2009, 2013a).

##### **PocketChem™**

Der PocketChem™ erfüllt mit einem  $TE_{obs}$  von 19,73 % bei mittlerer Ammoniakkonzentration das Anforderungskriterium für eine akzeptable Geräteleistung ( $TE_{obs} < TE_a$  von 20 % für Ammoniak) und kann für die Ammoniakmessung bei der Tierart Hund gut verwendet werden. Der  $TE_{obs}$  von 20,13 % bei hoher Ammoniakkonzentration verfehlt den  $TE_a$  knapp. Goggs et al. (2008) berechneten für die Ammoniakmessung des Hundes am PocketChem™ anhand der Ausgleichsgeraden bei einer Ammoniakkonzentration von 100 µmol/l einen  $TE_{obs}$  von 18,9 % (Goggs et al., 2008). Der eigene, zum Vergleich berechnete  $TE_{obs}$  anhand der Geradengleichung bei 100 µmol/l, beträgt 17,77 %. Dieser  $TE_{obs}$  sowie die oben berechneten stimmen mit der Beobachtung von Goggs et al. (2008) überein. Um den Einfluss des zufälligen Fehlers der Vergleichsmethode Pentra auf den in der Berechnung verwendeten Bias und somit auf den  $TE_{obs}$  auszuschließen, wurde außerdem die Berechnung des geräteeigenen Bias anhand von herstellereigenem Kontrollmaterial durchgeführt. Diese Vorgehensweise basiert wie die oben gezeigte Vorgehensweise auf der seit März 2013 verfügbaren Richtlinie ASVCP für den  $TE_a$  (ASVCP, 2013a). So erzielte der PocketChem™ mit 16,58 % und 16,98 % bei mittlerer und hoher Ammoniakkonzentration einen niedrigeren  $TE_{obs}$ . Allerdings basiert das Ergebnis auf einem wahrscheinlich zu gut eingeschätzten Bias, da, wie in der

Langzeitreplikation bereits erwähnt, die Qualitätskontrolle des Herstellers nicht wie für die anderen Geräte aus einem Reagenz mit einer bestimmten Ammoniakkonzentration, sondern aus einem Plastikstreifen mit einer Graustufe (diese spiegelt eine bestimmte Ammoniakkonzentration wider) besteht. Aus diesem Grund ist die Richtigkeit in Form des Bias aus diesem Versuch kritisch zu beurteilen und entspricht nicht den realen Routinebedingungen. Der so berechnete  $TE_{obs}$  ist zur Beurteilung der Geräteleistung ( $TE_{obs} < TE_a$ ) ungeeignet. Insgesamt kann das handliche Analysegerät PocketChem™, welches ausschließlich für die Ammoniakmessung konzipiert ist, bei Beachtung des grenzwertigen  $TE_{obs}$  für die Ammoniakmessung beim Hund verwendet werden.

### **FUJI**

Der FUJI erzielt mit 10,71 % und 8,93 % bei jeweils mittlerer und hoher Ammoniakkonzentration den kleinsten  $TE_a$  im Vergleich zu den anderen Geräten. Ursächlich hierfür ist vor allem der aus den Replikationsversuchen in Form des VK ermittelte, sehr niedrige zufällige Fehler. Anhand des geräteeigenen Bias, der niedriger ausfällt als im Methodenvergleich, erzielt der FUJI auch hier im Vergleich zu den anderen Geräten inklusive der Vergleichsmethode den kleinsten  $TE_{obs}$  mit 6,68 % und 4,90 % bei jeweils mittlerer und hoher Ammoniakkonzentration. Der FUJI erreicht das Akzeptabilitätskriterium ( $TE_{obs} < TE_a$ ) leicht und ist für die Ammoniakmessung der Tierart Hund sehr gut geeignet. Der FUJI stellt so als Trockenchemiegerät mit der Mikrodiffusionsmethode eine sehr gute sowie kostengünstige Alternative zur gebräuchlichen Enzymmethode dar. Anders als mit dem PocketChem™, der ein alleiniges Ammoniakmessgerät ist, können mit dem FUJI außerdem weitere klinisch-chemische Parameter gemessen werden, was für die tierärztliche Praxis sicherlich von Interesse ist.

### **solo**

Der solo übersteigt mit allen beobachteten Gesamtfehlern den  $TE_a$  für Ammoniak um mehr als das Doppelte. Die Ursache liegt in den hohen zufälligen und hohen systematischen Fehlern, die selbst bei der Verwendung von herstellereigenem Kontrollmaterial bestehen. Weitere Unternehmungen zur Ursachensuche für den hohen zufälligen Fehler des solo sind notwendig; erst mit einer höheren

Genauigkeit des Gerätes lässt sich der systematische Fehler zuverlässig ermitteln. In der eigenen Studie wurden die Herstellerangaben zur Probenanalyse penibel eingehalten. Auch die Vermutung von Pipettierfehlern, da eine kleine Probenmenge von 20 µl per Hand in das Reagenz pipettiert werden muss, sowie Verunreinigungen am Gerät oder an den Probenröhrchen wurden mehrfach überprüft. Eine erneute Überprüfung des Gerätes und die Kalibrierung durch den Hersteller erscheinen unumgänglich. Zum Zeitpunkt der eigenen Versuche kann das Analysegerät solo für die Ammoniakmessung aus Hundeblood nicht empfohlen werden.

### **VitroVet und Vergleichsgerät Pentra**

Der VitroVet befindet sich mit all seinen beobachteten Gesamtfehlern innerhalb des Akzeptabilitätskriteriums ( $TE_{obs} < TE_a$ ) für die Ammoniakmessung. Bei der Berechnung des  $TE_{obs}$  anhand des geräteeigenen Bias verhält sich der VitroVet im mittleren Konzentrationsbereich ähnlich zum Vergleichsgerät Pentra und im hohen Konzentrationsbereich etwas besser. An dieser Stelle ist der VitroVet, wie auch der Pentra, mit den jeweils gleichen Kontrollmaterialien und Reagenzien für die Ammoniakmessung der Tierart Hund gut geeignet. Auf Grund des niedrigeren zufälligen Fehlers könnte der VitroVet den Pentra zukünftig als Vergleichsgerät für die Ammoniakmessung bei der Tierart Hund ablösen und stellt außerdem eine kostengünstigere Alternative dar.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der Studie war die Evaluation von fünf verschiedenen Analysegeräten hinsichtlich der Ammoniakbestimmung aus Blut für die Tierart Hund unter Einbeziehung wichtiger präanalytischer Faktoren.

Über einen Zeitraum von drei Jahren wurden frische K3-EDTA- und Lithium-Heparin-antikoagulierte Blutproben von gesunden Hunden und von Hunden mit portosystemischem Shunt im Rahmen von Routineuntersuchungen im Zentrallabor der Abteilung für Innere Medizin der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen untersucht. Neben Linearität und Genauigkeit wurde für jedes Instrument die Übereinstimmung mit der Vergleichsmethode (ABX Pentra 400, Enzymmethode) verifiziert. Aufgrund der hohen präanalytischen Fehleranfälligkeit des Parameters fand außerdem eine Überprüfung des Einflusses von Lagerungsdauer und -temperatur, Hämolyse, Lipämie, Ikterus und Antikoagulanzen auf die Richtigkeit der Ammoniakmessung statt. Zur Beurteilung der Geräteleistung erfolgte für jedes Instrument die Berechnung des beobachteten Gesamtfehlers ( $TE_{\text{obs}}$ ) und dessen Vergleich mit dem zulässigen Gesamtfehler ( $TE_a$ ) für den Parameter Ammoniak nach den Richtlinien der American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP).

Für das Analysegerät VitroVet (Enzymmethode) wird eine exzellente Linearität ermittelt und es befindet sich wie das Vergleichsgerät Pentra (Enzymmethode) und der FUJI (Mikrodiffusionsmethode) innerhalb des geforderten Akzeptabilitätskriteriums ( $TE_a$ ). Am PocketChem<sup>TM</sup> (Mikrodiffusionsmethode) zeigt sich ein positiver Bias, sodass sich dieser mit dem Analysegerät solo (Enzymmethode), der einen erhöhten zufälligen Fehler aufweist, außerhalb des zulässigen Gesamtfehlers befindet. Die untere Nachweisgrenze aller Geräte befindet sich innerhalb der Herstellerangaben, die obere ist durch die verwendete Ammoniakstandardlösung auf 294  $\mu\text{mol/l}$  beschränkt. In der Kurzzeitreplikationsstudie anhand von Patientenproben zeigt der FUJI bei mittlerer und hoher Ammoniakkonzentration die größte Genauigkeit ( $M = 63,40$ ,  $SD = 1,35$ ,  $VK = 2,13$ ;  $M = 149,10$ ,  $SD = 1,85$ ,  $VK = 1,24$ ), gefolgt von VitroVet ( $M = 38,53$ ,  $SD = 2,74$ ,  $VK = 7,10$ ;  $M = 120,86$ ,  $SD = 3,74$ ,  $VK = 3,10$ ), dem Vergleichsgerät Pentra ( $M = 75,49$ ,  $SD = 4,13$ ,  $VK = 5,47$ ;  $M = 151,90$ ,  $SD = 11,44$ ,  $VK = 7,07$ ) und

PocketChem™ (M = 55,10, SD = 4,20, VK 7,63; M = 107,40, SD = 8,42, VK = 7,83). Die Genauigkeit der Geräte befindet sich innerhalb des geforderten zulässigen Gesamtfehlers und ist für die Ammoniakmessung der Tierart Hund geeignet. Für den solo wird ein vergleichsweise hoher zufälliger Fehler (M = 60,10, SD = 10,89, VK 18,12; M = 210, SD = 37,29, VK = 17,76) ermittelt. Dieser überschreitet bei mittlerer Ammoniakkonzentration den  $TE_a$ . In der Langzeitreplikationsstudie anhand von Kontrollmaterial befinden sich alle Geräte innerhalb des geforderten Akzeptabilitätskriteriums. In der Interferenzstudie verursacht Hämoglobin an den überprüften Geräten den größten positiven Bias (falsch hohe Ammoniakkonzentration) mit über 200 % im Vergleich zur Ausgangsprobe. Auch Bilirubin und Lipid erzeugen an allen Geräten einen positiven Bias, welcher an den Instrumenten VitroVet und Pentra den  $TE_a$  übersteigt. Der am FUJI beobachtete Bias für Bilirubin und Lipid übersteigt den  $TE_a$  nicht und die überprüften Konzentrationen der interferierenden Substanzen sind für die Ammoniakmessung akzeptabel. Die Ammoniakbestimmung am PocketChem™ bleibt nur durch die überprüfte Lipidkonzentration ungestört. Die Ergebnisse der Lagerungsstudie ergeben einen deutlichen Einfluss von Temperatur und Zeit auf die Ammoniakmessung im Sinne eines falsch hohen Bias. Um eine Abweichung der Ammoniakkonzentration aus EDTA-Vollblut von 5 % nicht zu überschreiten, empfehlen sich die Lagerung bei 4 °C und die Analyse der Probe innerhalb von 30 Minuten nach Blutentnahme. Für EDTA-Plasma (Abweichung < 5 %) sollte die Probe, gelagert bei 4 °C, innerhalb von zwei Stunden und gelagert bei 20 °C, innerhalb von einer Stunde verarbeitet werden. In der Antikoagulanztstudie kann gezeigt werden, dass Heparin als verwendetes Antikoagulanzt, wie bereits beim Menschen bekannt, auch bei der Tierart Hund falsch niedrige Ammoniakkonzentrationen verursacht. Die Mittelwertdifferenz von heparinisierten Blutproben, verglichen mit EDTA-antikoagulierten Blutproben, beträgt bis zu 24 %. Die größte Abweichung innerhalb der Einzelmessungen, gesehen an allen Geräten, liegt bei über 50 %, sodass die ausschließliche Verwendung von EDTA als Antikoagulanzt für die Ammoniakmessung der Tierart Hund an den überprüften Geräten und Reagenzien von der Autorin empfohlen wird. Im Methodenvergleich am Vergleichsgerät Pentra erzielt der PocketChem™ mit 4,66  $\mu\text{mol/l}$  die niedrigste Abweichung vom Mittelwert (Bias, ermittelt aus der Bland-Altman-Analyse). Allerdings hat der VitroVet mit einem nur geringfügig

größeren Bias von  $-5,04 \mu\text{mol/l}$  die größere Übereinstimmung mit der Vergleichsmethode, da der Schnittpunkt die größte Nähe zu null und die Steigung nahezu eins aufweist (ermittelt aus der Passing-Bablok-Regression). Auch die Grenzen der 95 % Konfidenzintervalle sind, verglichen mit den anderen Instrumenten, schmal. Der ermittelte Bias des FUJI liegt bei  $6,73 \mu\text{mol/l}$ . Der solo hat mit einem Bias von  $12,74 \mu\text{mol/l}$  die größte Differenz, auch die Steigung und der Schnittpunkt sowie deren 95 %-Übereinstimmungsgrenzen weichen stark ab. Die Berechnung der beobachteten Gesamfehler zeigt, dass die veterinärmedizinischen Anforderungen der ASVCP für die Ammoniakmessung des Hundes von den Analysegeräten FUJI und VitroVet erfüllt sind. Der PocketChem™ erfüllt die Anforderungen im mittleren, aber nicht im hohen Konzentrationsbereich. Der solo übersteigt sowohl im mittleren als auch im hohen Ammoniakkonzentrationsbereich den  $TE_a$  und somit die ASVCP-Anforderungen. Zur Beurteilung der Leistung aller Geräte, unabhängig von der eigenen Ungenauigkeit des Vergleichsgerätes, wurde für jedes Analysegerät (einschließlich Vergleichsgerät) der  $TE_{\text{obs}}$  anhand des Bias (ermittelt aus der Langzeitreplikationsstudie) berechnet. Die so berechneten beobachteten Gesamfehler fallen geringfügig niedriger als im Methodenvergleich aus und alle Geräte, ausgenommen solo, erfüllen die ASVCP-Anforderungen für die Ammoniakmessung aus Blut für die Tierart Hund.

## 6 Summary

The aim of the study was to evaluate five different analysers with regard to the measurement of ammonia levels in canine blood, taking major preanalytical factors into consideration.

Over a period of 3 years, investigations were carried out on fresh blood samples taken from healthy dogs and dogs with portosystemic shunts, using the anticoagulants K3-EDTA and lithium heparin, as part of routine tests at the Small Animal Clinic (Internal Medicine) within the central laboratory of the Justus Liebig University Gießen. As well as checking each instrument's linearity and accuracy, tests were conducted to verify its conformity with the comparative method (ABX Pentra 400, enzymatic method). On account of the parameter's high susceptibility to preanalytical error, a further check was implemented to test the influence of storage duration and temperature, haemolysis, lipemia, jaundice (icterus) and anticoagulants on the validity of the ammonia measurement. In order to evaluate the performance of the equipment used, the observed total error ( $TE_{obs}$ ) was computed for each instrument and compared with the allowable total error ( $TE_a$ ) for the ammonia parameter as laid down by the standards of the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP).

The VitroVet (enzymatic method) analyser exhibits excellent linearity and, like the comparable Pentra (enzymatic method) equipment and the FUJI (microdiffusion method), places itself within the required acceptability criteria ( $TE_a$ ). The PocketChem<sup>TM</sup> (microdiffusion method) shows evidence of a positive bias and falls outside the bounds of allowable total error, as does the solo analyser (enzymatic method), which displays increased random error. The lower detection limit of all the equipment lies within the manufacturers' specifications, while the upper limit is restricted to 294  $\mu\text{mol/l}$  by virtue of the standard solution of ammonia used. In the short-term replication study based on patient samples, the FUJI demonstrates the greatest degree of accuracy in the case of medium and high concentrations of ammonia ( $M = 63.40$ ,  $SD = 1.35$ ,  $CV = 2.13$ ;  $M = 149.10$ ,  $SD = 1.85$ ,  $CV = 1.24$ ), followed by VitroVet ( $M = 38.53$ ,  $SD = 2.74$ ,  $CV = 7.10$ ;  $M = 120.86$ ,  $SD = 3.74$ ,  $CV = 3.10$ ), the comparative analyser Pentra ( $M = 75.49$ ,  $SD = 4.13$ ,  $CV = 5.47$ ;  $M = 151.90$ ,  $SD = 11.44$ ,  $CV = 7.07$ ), and finally PocketChem<sup>TM</sup> ( $M = 55.10$ ,  $SD = 4.20$ ,

CV 7.63; M = 107.40, SD = 8.42, CV = 7.83). The equipment's accuracy lies within the required allowable total error figure and is acceptable for the measurement of ammonia in dogs. Detection by the solo method exhibits comparatively high random error (M = 60.10, SD = 10.89, CV 18.12; M = 210. SD = 37.29, CV = 17.76) and exceeds the  $TE_a$  in the case of the medium concentration of ammonia. In the long-term replication study based on control material, all the equipment falls within the required acceptability criteria. In the interference study, haemoglobin causes the greatest positive bias (a falsely high concentration of ammonia) in the equipment tested, over 200% as compared with the starting sample. Bilirubin und Lipid also generate a positive bias in all the equipment, one which exceeds the  $TE_a$  when using the VitroVet and Pentra instruments. In the case of FUJI, the bias observed when using Bilirubin and Lipid does not exceed the  $TE_a$ , and the tested concentrations of interfering substances are acceptable in terms of the measured levels of ammonia shown. With PocketChem<sup>TM</sup>, the ammonia detection only remains unaffected by the tested concentration of Lipid. The results of the storage study clearly demonstrate that temperature and time influence the ammonia measurement, giving it a falsely high bias. So as not to exceed a 5% deviation in the ammonia concentration measured in EDTA whole blood, it is recommended that at a storage temperature of 4°C, the test be executed within 30 minutes of the blood sample having been taken. Where EDTA plasma (deviation < 5%) has been stored at 4°C, the sample should be processed for a period of less than 2 hours, and if stored at 20°C, for less than 1 hour. In the anticoagulation study, it can be demonstrated that heparin used as an anticoagulant, as has already been the case in respect of humans, can also cause falsely low concentrations of ammonia in dogs. The mean difference between heparinized blood samples as compared with EDTA anticoagulated blood samples reaches as much as 24%. The greatest deviation observed within the individual measurements, taking all the range of equipment into consideration, is over 50%, leading the author to recommend the exclusive use of EDTA as the anticoagulant for ammonia measurement in dogs using the equipment and reagents examined in this study. In the method comparison, with the Pentra as the comparative instrument, the PocketChem<sup>TM</sup>, with -4.66 µmol/l, shows the lowest deviation from the mean value (bias determined by the Bland-Altman analysis). In any case, the VitroVet, with only a slightly greater bias of -5,04 µmol/l, is more closely convergent with the

comparative method, as the point of intersection shows the closest proximity to zero and shows the slope to be close to one (calculated by Passing-Bablok regression). Moreover, the limits of the 95% confidence intervals are narrow in comparison with the other instruments. The bias shown in the case of the FUJI is 6.73  $\mu\text{mol/l}$ . With a bias of 12.74  $\mu\text{mol/l}$ , the solo analyser exhibits the widest discrepancy, and in addition, the slope and the point of intersection, as well as their 95% confidence limits, deviate sharply. The computation of the observed total errors shows that the ASVCP requirements for veterinary medicine with regard to ammonia measurement in dogs are met by the FUJI analysers, followed by the VitroVet. The PocketChem<sup>TM</sup> meets the requirements in the medium but not the high concentration range. The solo exceeds the  $TE_a$ , and thereby also the ASVCP requirements, in both the medium and high ranges of ammonia concentration. In judging the performance of all the instruments, independently of the comparative instrument's own inaccuracy, the  $TE_{\text{obs}}$  was calculated for each analyser (including the comparative analyser), based on the bias identified by the long-term replication study. Computed in this way, the observed total errors come out slightly lower than in the method comparison, and all the analysers, with the exception of the solo, meet the ASVCP requirements for ammonia measurement in canine blood.

## Literaturverzeichnis

- ARKRAY Inc. (2008):** PocketChem™ BA PA-4140. Bedienungsanleitung.
- ARKRAY Inc. (2009):** AMMONIA TEST KIT II™ Test für den Ammoniak-Spiegel im Blut. Testanleitung.
- ASVCP (2009):** Quality Control Guidelines, Principles of Quality Assurance and Standards for Veterinary Clinical Pathology. American Society for Veterinary Clinical Pathology.
- ASVCP (2013a):** Allowable Total Error Guidelines (Biochemistry), Approved Version 1.0. American Society for Veterinary Clinical Pathology.
- ASVCP (2013b):** Quality Assurance for Point-of Care Testing in Veterinary Medicine. American Society for Veterinary Clinical Pathology, Version 1.0.
- Battersby IA, Giger U, Hall EJ (2005):** Hyperammonaemic encephalopathy secondary to selective cobalamin deficiency in a juvenile Border Collie. *J Small Anim Pract* 46: 339–344.
- Bellamy JEC, Olexson DW (2000):** Quality Assurance Handbook for Veterinary Laboratories. Iowa State University Press, 1. Aufl., Ames.
- Bland JM, Altman DG (1986):** Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 327: 307–310.
- Bland JM, Altman DG (1995):** Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet* 346: 1085–1087.
- Bland JM, Altman DG (1999):** Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 8: 135–160.
- Brunnemann KD, Hoffmann D (1975):** Chemical Studies on Tobacco Smoke XXXIV. Gas Chromatographic Determination of Ammonia In Cigarette and Cigar Smoke. *J Chromatogr Sci* 13: 159–163.
- Brusilow SW, Gordes EH (1968):** Ammonia secretion in sweat. *Am J Physiol* 214: 513–517.

**CAP:** Laboratory Accreditation Checklist. College of American Pathologists. <http://www.cap.org>.

**Center SA (1996):** Diagnostic Procedures for Evaluation of Hepatic Disease. In: Guilford WG, Center SA, Strombeck DR, Williams DA, Meyer DJ (Hrsg.), Strombeck's Small Animal Gastroenterology. W.B. Saunders Company 3. Aufl., Philadelphia, 130–189.

**Clarke JS, Cruze K, McKissock PK, Ozeran RS (1959):** Diphasic Blood Ammonia Curves After Feeding Protein to Normal Dogs and Men. Arch Surg 78: 836-843.

**CLIA (1992):** U.S. Department of Health and Human Services. Medicare, Medicaid, and CLIA programs: Regulations implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988. Final rule. Fed Regist, 57:7002-186.

**CLSI document EP05-A3 (2014):** Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

**CLSI document EP06-A (2003):** Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

**CLSI document C56-A (2012):** Hemolysis, Icterus, and Lipemia/Turbidity Indices as Indicators of Interference in Clinical Laboratory Analysis; Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

**CLSI document EP07-A2 (2005):** Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

**CLSI document EP09-A2-IR (2010):** Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Second Edition (Interim Revision). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

**CLSI document EP15-A3 (2014):** User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline—Third Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

**COLA:** Accreditation Manual. Commission of Office Laboratory Accreditation. <http://www.cola.org>.

**Cowley DM, Nagle BA, Chalmers AH, Sinton TJ (1985):** Effects of Platelets on Collection of Specimens for Assay of Ammonia in Plasma. *Clin Chem* 31: 332–333.

**Da Fonseca-Wollheim F (1973):** Direkte Plasmaammoniakbestimmung ohne Enteiweißung. Verbessertes enzymatisches Ammoniaktest, II. Mitteilung. *Z Klin Chem Klin Biochem* 11: 426–431.

**Da Fonseca-Wollheim F (1990a):** Deamidation of Glutamine by Increased Plasma  $\gamma$ -Glutamyltransferase is a Source of Rapid Ammonia Formation in Blood and Plasma Specimens. *Clin Chem* 36: 1479–1482.

**Da Fonseca-Wollheim F (1990b):** Preanalytical Increase of Ammonia in Blood Specimens from Healthy Subjects. *Clin Chem* 36: 1483–1487.

**Da Fonseca-Wollheim F, van Dam M (1992):** Interference by Heparin in Enzymatic Determination of Plasma Ammonia Depends on Reagent Composition. *Clin Chem* 38: 1921–1922.

**Davidson JSD, Jennings DB (1980):** Measurement of total ammonia levels in plasma, whole blood, and cerebrospinal fluid of dogs using an ion-specific electrode. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58: 550–556.

**Diaz J, Tornel PL, Martinez P (1995):** Reference Intervals for Blood Ammonia in Healthy Subjects, Determined by Microdiffusion. *Clin Chem* 41: 1048.

**Dorwart WV, Saner M (1992):** Heparinized Plasma is an Unacceptable Specimen for Ammonia Determination. *Clin Chem* 38: 161.

**Dukic L, Simundic A-M (2015):** Short-term and long-term storage stability of heparin plasma ammonia. *J Clin Pathol: jclinpath-2014-202693*.

**Eurolyser Diagnostica GmbH:** solo NH<sub>3</sub> Ammoniak Test. Testanleitung.

**FUJIFILM Corporation (2010):** Plasma test for ammonia, FUJI DRI-CHEM SLIDE NH<sub>3</sub>-PII. Testanleitung.

**FUJIFILM Corporation (2012):** FUJI DRI-CHEM NX500i. Bedienungsanleitung.

**Fyfe JC, Hemker SL, Venta PJ, Stebbing B, Giger U (2014):** Selective intestinal cobalamin malabsorption with proteinuria (Imerslund-Grasbeck syndrome) in juvenile Beagles. *J Vet Intern Med* 28: 356–362.

**Gerron GG, Ansley JD, Isaacs JW, Kutner MH, Rudman D (1976):** Technical Pitfalls in Measurement of Venous Plasma NH<sub>3</sub> Concentration. *Clin Chem* 22: 663–666.

**Goggs R, Serrano S, Szladovits B, Keir I, Ong R, Hughes D (2008):** Clinical investigation of a point-of-care blood ammonia analyzer. *Vet Clin Pathol* 37: 198–206.

**Hall JA, Allen TA, Fettman MJ (1987):** Hyperammonemia associated with urethral obstruction in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 191: 1116–1118.

**Harris RC, Harris DB, Dunnett M, Harris PA, Fallowfield J, Naylor JRJ (1999):** Plasma ammonia and lactate responses using incremental and constant speed exercise tests. *Equine Vet J Suppl* 31: 546–551.

**Haweke L (2012):** Ammonia (plasma, blood). Association for Clinical Biochemistry. <http://www.acb.org.uk>.

**Hitt ME, Jones BD (1986):** Effects of storage temperature and time on canine plasma ammonia concentrations. *Am J Vet Res* 47: 363–364.

**Hollis S (1996):** Analysis of method comparison studies. *Ann Clin Biochem* 33: 1–4.

**Howanitz JH, Howanitz PJ, Skrodzki CA, Iwanski JA (1984):** Influences of Specimen Processing and Storage Conditions on Results for Plasma Ammonia. *Clin Chem* 30: 906–908.

**Huizenga JR, Gips CH (1983):** Determination of blood ammonia using the Ammonia Checker. *Ann Clin Biochem*: 187–189.

**JC:** Accreditation Manual for Pathology and Clinical Laboratory Services. Joint Commission. <http://www.jointcommission.org>.

**Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M (2006):** Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol* 35: 276–286.

**Johnson SE (1987):** Portal Hypertension. Part I. Pathophysiology and Clinical Consequences. *Compend Contin Educ Vet*: 741–750.

**Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (Hrsg.) (2008):** Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Appendix IX Blood analyte reference values in small and some laboratory animals. Elsevier Academic Press 6. Aufl., Amsterdam, Boston.

**Labor + Technik LT-SYS®:** Reagenz für die quantitative in vitro - Bestimmung von Ammoniak in Humanplasma an photometrischen Systemen. Testanleitung.

**Lindner A, Bauer S (1993):** Effect of Temperature, Duration of Storage and Sampling Procedure on Ammonia Concentration in Equine Blood Plasma. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 31: 473–476.

**Lyles SE, Kow K, Milner RJ, Buckley GJ, Bandt C, Baxter KJ (2011):** Acute hyperammonemia after L-asparaginase administration in a dog. *J Vet Emerg Crit Care* 21: 673–678.

**Meyer DJ, Strombeck DR, Stone EA, Zenoble RD, Buss DD (1978):** Ammonia Tolerance Test in Clinically Normal Dogs and in Dogs with Portosystemic Shunts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 377–379.

**Mutch BJC, Banister EW (1983):** Ammonia metabolism in exercise and fatigue: a review. *Med Sci Sports Exerc* 15: 41–50.

**Neumann S (2013):** Leber. In: Moritz A (Hrsg.), *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer 7. Aufl., Stuttgart, 250–275.

**Ogilvie GK, Engelking LR, Anwer MS (1985):** Effects of plasma sample storage on blood ammonia, bilirubin, and urea nitrogen concentrations: Cats and horses. *Am J Vet Res* 46: 2619–2621.

**Passing H, Bablok W (1983):** A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 21: 709–720.

**Prellwitz W, Knapp S, Dennebaum R (1976):** Methodische Untersuchung und klinische Bedeutung des Blutammoniaks. *Med. Welt* 27: 1277–1280.

**Prytz B, Grossi CE, Rousselot LM (1970):** In Vitro Formation of Ammonia in Blood of Dog and Man. *Clin Chem* 16: 277–279.

**Reif AE (1960):** The Ammonia Content of Blood and Plasma. *Anal Biochem* 1: 351–370.

**Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, Minchinela J, Perich C, Simón M (1999):** Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 59: 491–500.

**Rothuizen J, van den Ingh TSGAM (1982a):** Arterial and venous ammonia concentrations in the diagnosis of canine hepato-encephalopathy. *Res Vet Sci* 33: 17–21.

**Rothuizen J, van den Ingh TSGAM (1982b):** Rectal ammonia tolerance test in the evaluation of portal circulation in dogs with liver disease. *Res Vet Sci* 33: 22–25.

**Schuff-Werner P, Steiner M (2015):** Preanalytical ammonia generation: a race with time but not with temperature. *J Clin Pathol*: jclinpath-2015-203080.

**Seligsson D, Hirahara K (1957):** The measurement of ammonia in whole blood, erythrocytes, and plasma. *J Lab Clin Med* 49: 962–974.

**Snow DH, Harris RC, Stuttard E (1988):** Changes in haematology and plasma biochemistry during maximal exercise in greyhounds. *Vet Rec* 123: 487–489.

**Spearman C (1907):** Demonstration of formulae for true measurement of correlation. *Am J Psychol* 18: 161–169.

**Sterczar A, Meyer HP, Boswijk HC, Rothuizen J (1999):** Evaluation of ammonia measurements in dogs with two analysers for use in veterinary practice. *Vet Rec* 144: 523–526.

**Stöckl D, Dewitte K, Thienpont LM (1998):** Validity of linear regression in method comparison studies: is it limited by the statistical model or the quality of the analytical input data? *Clin. Chem.* 44: 2340–2346.

**Strombeck DR, Meyer DJ, Freedland RA (1975a):** Hyperammonemia Due to Urea Cycle Enzyme Deficiency in Two Dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1975: 1109–1111.

**Strombeck DR, Weiser MG, Kaneko JJ (1975b):** Hyperammonemia and Hepatic Encephalopathy in the Dog. *J Am Vet Med Assoc* 166: 1105–1108.

**Thomas L (2012):** Ammoniak. In: Thomas L (Hrsg.), *Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik.* TH-Books Verlagsgesellschaft 8. Aufl., Frankfurt am Main, 282–292.

**Tietz NW (1979):** A Model for a Comprehensive Measurement System in Clinical Chemistry. *Clinical Chemistry* 25: 833–839.

**Tivers MS, Handel I, Gow AG, Lipscomb VJ, Jalan R, Mellanby RJ (2014):** Hyperammonemia and Systemic Inflammatory Response Syndrome Predicts Presence of Hepatic Encephalopathy in Dogs with Congenital Portosystemic Shunts. *PLoS One* 9: e82303.

**van den Ingh TSGAM, Rothuizen J, Meyer HP (1995):** Circulatory disorders of the liver in dogs and cats. *Vet Q* 17: 70–76.

**Vitums A (1959):** Portosystemic communications in the dog. *Acta Anat* 39: 271–299.

**Walker MC, Hill RC, Guilford WG, Scott KC, Jones GL, Buergelt CD (2001):** Postprandial Venous Ammonia Concentrations in the Diagnosis of Hepatobiliary Disease in Dogs. *J Vet Intern Med* 15: 463–466.

**Wannasilp N, Sribhen K, Pussara N, Hwanpuch T, Wangchaijaroenkit S, Opartkiattikul N (2006):** Heparin is an unsuitable anticoagulant for the detection of plasma ammonia. *Clin Chim Acta* 371: 196–197.

**Wannasilp N, Sribhen K, Pussara N, Opartkiattikul N (2005):** EDTA should be the anticoagulant of choice for the measurement of plasma ammonia: report of a problem sample. *Clin Chim Acta* 357: 84–85.

**Webster CRL (2010):** History, clinical signs, and physical findings in hepatobiliary disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC (Hrsg.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Elsevier Saunders 7. Aufl., St. Louis, 1140–1161.

**Wenzel E, Christ G (1969):** Untersuchungen über die Entstehung von Ammoniak im Zitratplasma nach Rekalzifizierung. *Thromb Diath Haemorrh* 22: 575–576.

**Westgard JO (2008):** Basic method validation. *Westgard QC*, 3. Aufl., Madison.

**Westgard JO (2013):** Statistical quality control procedures. *Clin. Lab. Med.* 33: 111–124.

**Westgard JO, Carey RN, Wold S (1974):** Criteria for Judging Precision and Accuracy in Method Development and Evaluation. *Clinical Chemistry* 20: 825–833.

**Westgard JO, Hunt MR (1973):** Use and Interpretation of Common Statistical Tests in Method-Comparison Studies. *Clinical Chemistry* 19: 49–57.

**Zandvliet MMMJM, Rothuizen J (2007):** Transient Hyperammonemia Due to Urea Cycle Enzyme Deficiency in Irish Wolfhounds. *J Vet Intern Med* 21: 215–218.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Sabine Thalmeier



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
**STAUFENBERGRING 15**  
**D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6569-0



9 783835 196569 0