

4 Ergebnisse

4.1 Ermittlung der Wiederauffindungsrate von Kreatinin

Die Serum-[Kreatinin_{exo}] der untersuchten Hunde nach Applikation des Markers exogenes Kreatinin erreichten oftmals Werte $> 600 \mu\text{mol/l}$. Daher galt es zu untersuchen, inwieweit die Bestimmung des Kreatinins im Serum mit zwei unterschiedlichen Messmethoden (Jaffé-Methode und enzymatisches Verfahren) möglicherweise abweichende Werte ergibt. Zu diesem Zweck wurde Kreatinin in definierten Mengen dem Hundeserum zugesetzt und anschließend die Wiederauffindungsrate des Markers geprüft.

Auf einer geeichten Waage (MC 1 Analytic AC 210 S, Fa. Sartorius) wurden 100 mg Kreatinin (Artikel-Nr.: 701225-0002, 100 mg Kreatinin zur Kreatininbestimmung im Blut, Hersteller: Fa. Merck, bezogen über Fa. Synopharm) abgewogen und diese in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Die so erhaltene Kreatinin - Gebrauchslösung enthält 0,01 mg Kreatinin / 10 μl und wurde bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

Zunächst wurden von verschiedenen Hunden insgesamt ca. 11 ml Pool-Serum gesammelt. Das gepoolte Serum konnte dann in 11 Röhrchen mit jeweils 1 ml Hundeserum gefüllt werden. Eines dieser Röhrchen diente als 0 - Probe, in der die Serum-[Kreatinin_{endo}] bestimmt werden konnte. Den restlichen 10 Röhrchen wurde die Kreatinin-Gebrauchslösung in aufsteigender Reihenfolge von 10 μl bis 100 μl zugesetzt und anschließend der Gesamt-Kreatiningehalt (endogen + exogen) in jeder Probe sowohl mit der Jaffé - Methode als auch mit dem enzymatischen Verfahren bestimmt.

Da die für das Abmessen der Kreatinin-Gebrauchslösung benutzten Pipetten mit einem Messfehler behaftet sein können, wurde zuerst der Pipettenmessfehler mit destilliertem Wasser ermittelt. Das Verfahren soll anhand der 10 μl Pipette erläutert werden:

- a) Ein Hub der 10 μl - Pipette wird auf einer geeichten Waage (MC 1 Analytic AC 210 S, Fa. Sartorius) abgewogen.
- b) 10 Hübe der 10 μl - Pipette werden auf derselben Waage abgemessen und das Ergebnis durch 10 dividiert. Auf diese Weise erhält man den Durchschnittswert für einen Hub der 10 μl - Pipette.

Die Messfehler der anderen Pipetten (20 μl und 50 μl) wurden auf dieselbe Art ermittelt. Wenn zwei unterschiedliche Pipetten zur Abmessung der Kreatinin-Gebrauchslösung benötigt wurden (z. B. für 30 μl \rightarrow 20 μl plus 10 μl), addierten sich die Mengen der einzelnen Pumphübe.

Im ersten Teil der Untersuchung wurden dem Serum zwischen 10 μl und 100 μl und im zweiten Teil zwischen 100 μl und 1000 μl der Kreatiningebrauchslösung zugesetzt. Damit lagen die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] im ersten Teil der Untersuchung in einem Bereich, der in der

routinemäßigen Bestimmung der Serum-[Kreatinin_{endo}] bei renal erkrankten Tieren tatsächlich erreicht werden kann. Die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] im zweiten Teil überschreiten dagegen diesen Bereich und liegen > 884 µmol/l (10 mg/dl). Einige der renal erkrankten und untersuchten Hunde erreichten während des renalen Funktionstests Serum-[Kreatinin_{gesamt}] von > 1000 µmol/l.

In der Tabelle 15 sind die Pipettenmessfehler für den ersten und zweiten Teil der Untersuchung aufgeführt.

Tab. 15: Ergebnisse des Pipettenmessfehlers

1. Teil		2. Teil	
mit Pipette gemessene Menge (µl)	mit der Waage ermittelte Masse (mg)	mit Pipette gemessene Menge (µl)	mit der Waage ermittelte Masse (mg)
10	0,0099	100	0,0999
20	0,0197	200	0,2018
30	0,0296	300	0,3018
40	0,0393	400	0,4037
50	0,0495	500	0,5002
60	0,0595	600	0,6002
70	0,0692	700	0,7020
80	0,0791	800	0,8011
90	0,0888	900	0,9039
100	0,0990	1000	1,0004

Im zweiten Teil der Untersuchung wog die pipettierte Menge an Serum, zu der die Kreatininlösung zugesetzt wurde, nicht exakt 1 mg, sondern 0,99895 mg. Das musste bei der Berechnung der Soll-[Kreatinin] berücksichtigt werden.

Die steigende Menge an Kreatinin, die den 10 Serumproben im ersten Teil der Untersuchung zugesetzt wurde, betrug zwischen 0,01 mg und 0,10 mg (Tab. 15).

Mit Hilfe des Pipettenmessfehlers kann nun die Kreatininkonzentration berechnet werden, die in jeder Probe tatsächlich enthalten ist und mit beiden Messmethoden detektiert werden sollte. Sie setzt sich zusammen aus der mit dem jeweiligen Messverfahren bestimmten Serum-[Kreatinin_{endo}], dem zugefügten Kreatinin (Tab. 15) sowie dem Gesamt-Probenvolumen (= 1 ml Serum + X µl Zusatz).

Die allgemeine Formel lautet:

$$\frac{m_1}{V_1} = \frac{m_2}{V_2} \quad (9)$$

m= Masse (mg), V= Volumen (ml)

Am Beispiel der Probe 1 soll diese Berechnung dargestellt werden:

0,0206 mg Kreatinin in 1,01 ml Serum

x mg Kreatinin in 100 ml

$$x = \frac{0,0206 \cdot 100}{1,01} = 2,04 \text{ mg/dl} \quad (10)$$

In der Probennummer 1 hätten demnach 2,04 mg/dl Kreatinin mit der Jaffé-Methode detektiert werden müssen. Die Ergebnisse der errechneten Soll-[Kreatinin] für die Jaffé-Methode und das enzymatische Verfahren des ersten Teils (Proben 1 - 10) sind in Tabelle 16 angegeben.

Tab. 16: Werte für berechnete Soll-[Kreatinin] in mg/dl für die Jaffé-Methode und das enzymatische Verfahren (1. Teil)

Probennummer	Jaffé-Methode	enzymatisches Verfahren
1	2,04	1,95
2	2,98	2,89
3	3,91	3,83
4	4,81	4,72
5	5,73	5,65
6	6,62	6,54
7	7,47	7,38
8	8,31	8,23
9	9,13	9,05
10	9,97	9,89

Die 0 - Probe sowie die mit exogenem Kreatinin versetzten Seren 1 - 10 wurden zweifach bestimmt. Zusätzlich wurde 1 ml der Kreatiningebrauchslösung nach zwei Verdünnungen, wie 1:10 und 1:100, untersucht. Die Ergebnisse sind Inhalt der Tabelle 17.

Tab. 17: Ergebnisse der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] in mg/dl, vergleichend mit der Jaffé-Methode und dem enzymatischen Verfahren bestimmt (1. Teil)

Probennummer	Jaffé-Methode	enzymatisches Verfahren
0	1,07	0,98
1	1,99	1,85
2	3,01	2,94
3	3,93	3,85
4	4,81	4,73
5	5,71	5,58
6	6,54	6,48
7	7,48	7,39
8	8,22	8,21
9	8,86	8,89
10	9,79	9,92
1 ml Kreatinin-Gebrauchslösung (1:10 verdünnt)	103,0	105,0
1 ml Kreatinin-Gebrauchslösung (1:100 verdünnt)	103,05	106,70

Die errechneten Werte wurden grafisch den gemessenen Werten gegenüber gestellt. In der Abbildung 5 sind die Werte der beiden Methoden vergleichend dargestellt.

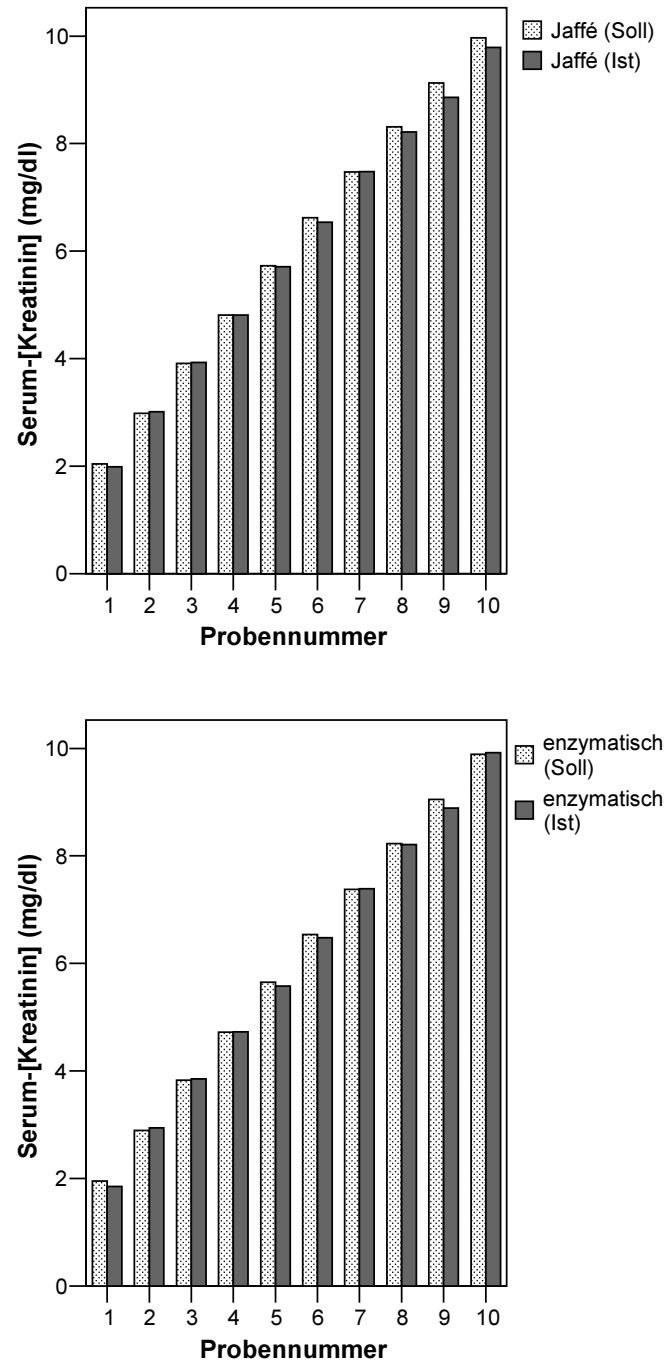


Abb. 5: Vergleich der Werte zwischen berechneter (Soll) und tatsächlich bestimmter (Ist) Kreatininkonzentration, die mit der Jaffé-Methode und dem enzymatischen Verfahren analysiert wurden (1. Teil)

Aus der Abbildung 5 lässt sich erkennen, dass sowohl bei der Jaffé-Methode als auch bei dem enzymatischen Verfahren zwischen dem errechneten (Soll-[Kreatinin]) und gemessenen Wert (Ist-[Kreatinin]) kaum Unterschiede bestanden. Mit beiden Verfahren wurde relativ oft (Proben 1, 5-10) der Soll-Wert von dem gemessenen Wert geringfügig unterschritten.

Zusätzlich konnte die Wiederauffindungsrate (in %) für Kreatinin für beide Methoden berechnet werden. Die Wiederauffindungsrate für das zugesetzte Kreatinin ist in der Abbildung 6 grafisch dargestellt.

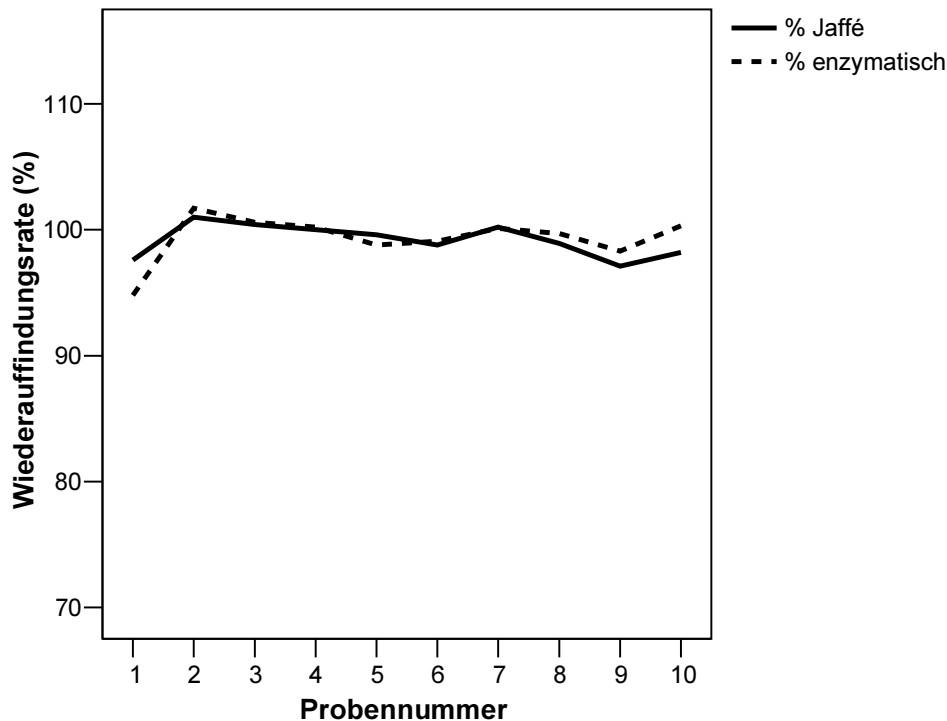


Abb. 6: Wiederauffindungsrate (%) für dem Serum zugesetztes Kreatinin, analysiert mittels der Jaffé-Methode und dem enzymatischen Verfahren (1. Teil)

Die Kurven für die beiden Wiederauffindungsraten verlaufen bei beiden Methoden annähernd gleich.

Beide Methoden besaßen einen annähernd gleichen Mittelwert für die Kreatinin-Wiederauffindungsrate von 99,2 % (Jaffé - Methode) und 99,4 % (enzymatisches Verfahren). Demzufolge kann im Messbereich bis 10 mg/dl (884 $\mu\text{mol/l}$) die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] mit der Jaffé-Methode und dem enzymatischen Verfahren gleichermaßen zuverlässig gemessen werden.

Da bei der Bestimmung der GFR mittels $\text{P-CL}_{\text{terminal}}$ mit exogenem Kreatinin dem Tier eine erhebliche Menge (2 g/m² KOF) an exogenem Kreatinin zugeführt wird, erreichen die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] teilweise Messbereiche > 1000 $\mu\text{mol/l}$. Aus diesem Grund wurde zusätzlich derselbe Test zur Bestimmung der Wiederauffindungsrate von Serum-[Kreatinin] mit der jeweils 10 - fach höheren Serum-Kreatininkonzentration durchgeführt (2. Teil).

Es wurden wiederum 11 Röhrchen mit jeweils 1 ml gepooltem Hundeserum gefüllt und der Pipettenmessfehler der einzelnen Pipetten bestimmt (Tab. 15). Danach erfolgte die Berechnung der Soll-[Kreatinin] entsprechend der Formel (9) wie im ersten Versuch. Die für diesen Teil der Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 18 wiedergegeben.

Tab. 18: Werte für berechnete Soll-[Kreatinin] in mg/dl für die Jaffé-Methode und das enzymatische Verfahren (2. Teil)

Probennummer	Jaffé-Methode	enzymatisches Verfahren
1	10,16	10,06
2	17,8	17,72
3	24,12	24,05
4	29,68	29,61
5	34,13	34,07
6	38,25	38,19
7	42,0	41,93
8	45,16	45,12
9	49,0	48,14
10	50,61	50,56

Die theoretisch zu erwartenden Werte (Soll-[Kreatinin]) wurden ebenfalls mit den tatsächlich gemessenen Befunden (Ist-[Kreatinin]) verglichen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 7 dargestellt.

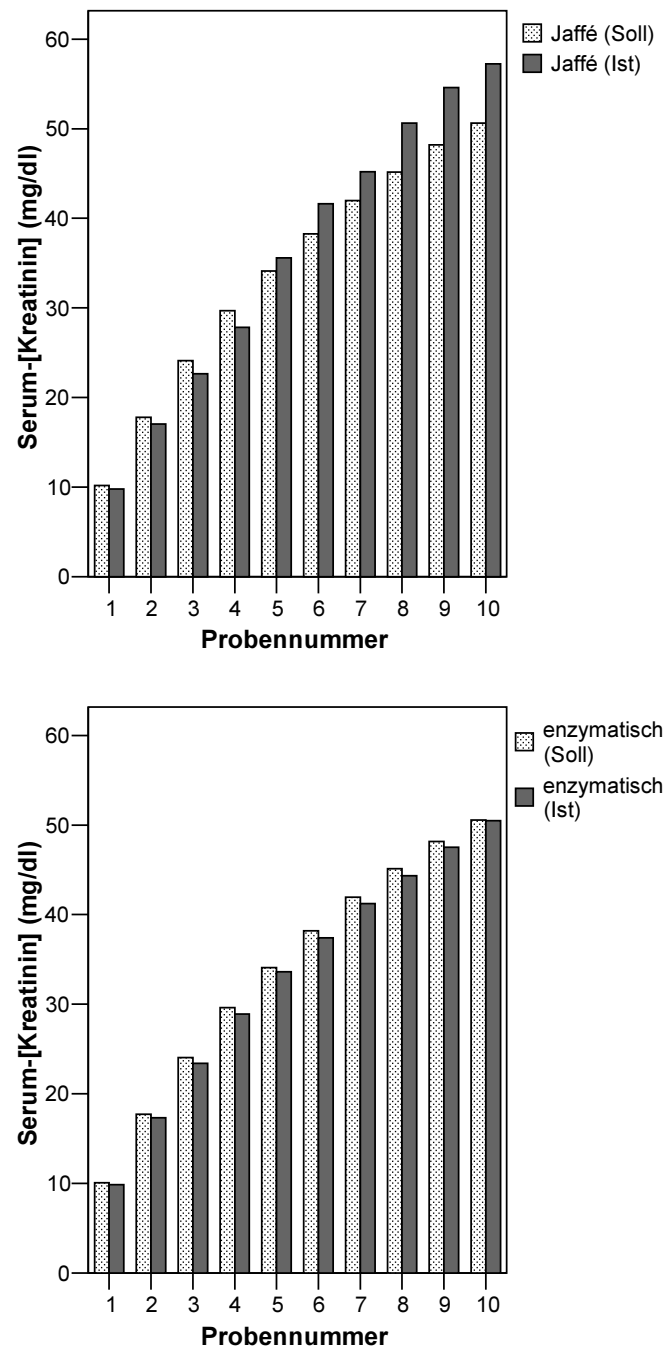


Abb. 7: Vergleich der Werte zwischen berechneter (Soll) und tatsächlich bestimmter (Ist)-Kreatininkonzentration, die mit der Jaffé-Methode und dem enzymatischem Verfahren analysiert wurden (2. Teil)

In der Abbildung 7, oben, ist zu erkennen, dass bei der Jaffé-Methode die Ist-[Kreatinin] ab der 5. Probe zunehmend über der Soll-[Kreatinin] lag. Bei dem enzymatischen Verfahren bestanden zwischen der Soll- und Ist-[Kreatinin] auch in höheren Konzentrationen kaum Unterschiede. Jedoch wurde auch mit der enzymatischen Methode nicht vollständig das zugesetzte Kreatinin detektiert. Die Darstellung der Wiederauffindungsraten für das Kreatinin ist Inhalt der Abbildung 8.

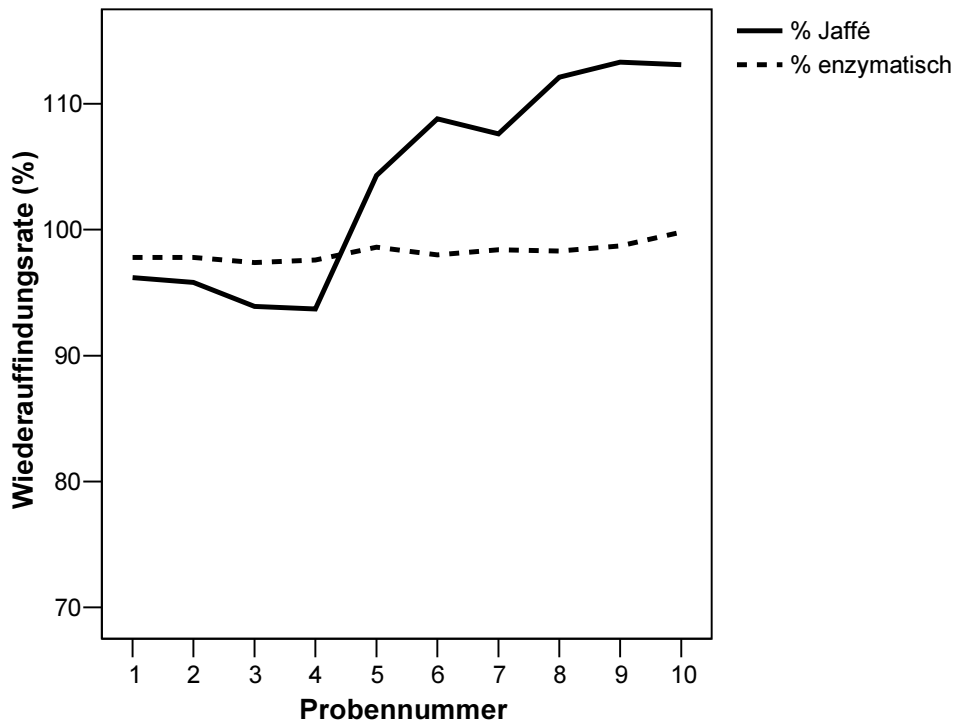


Abb. 8: Wiederauffindungsrate (%) für dem Serum zugesetztes Kreatinin, analysiert mit der Jaffé-Methode und dem enzymatischen Verfahren (2. Teil, unverdünnt)

Der Kurvenverlauf der Wiederauffindungsrate von der enzymatischen Methode lässt insgesamt einen leichten Anstieg von 97,4 % auf 99,8 % erkennen. Der Mittelwert lag für das enzymatische Verfahren bei $98,2 \pm 0,7$ %. Dagegen zeigt die Kurve der Jaffé - Methode nach einem geringen Abfall auf 93,7 % ab der vierten Probe einen starken Anstieg auf über 113 %. Der Mittelwert für die Jaffé - Methode betrug $103,9 \pm 8,2$ %³.

Die bei der GFR-Bestimmung mittels der modifizierten exogenen Kreatinin-Clearance gemessenen Serum-[Kreatinin_{gesamt}] liegen bei einigen Patienten mit teilweise > 1000 µmol/l weit über dem Nombereich (bis 144 µmol/l). Die Serumprobe wird teilweise vor der Bestimmung der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] im Labor verdünnt. Daher wurden beim zweiten Durchlauf des Tests zur Bestimmung der Wiederauffindungsrate von Kreatinin dieselben Proben zusätzlich in einer Verdünnung von 1:10 mit beiden Methoden bestimmt (2. Teil, verdünnt). In der Abbildung 9 sind die Soll- und die Ist-[Kreatinin] für die Jaffé - Methode und das enzymatische Verfahren dargestellt.

³Nach Rücksprache mit dem Medizinisch-Technischen-Assistenten Herrn Böse aus dem Institut für Veterinärmedizinische Diagnostik (IVD) Berlin wurde bei der Kreatininbestimmung anhand der Jaffé-Methode ein sog. Matrix-Effekt angenommen. Demnach reagieren Serum-Proteine bei der Jaffé-Reaktion unspezifisch mit und erhöhen so möglicherweise die Wiederauffindungsrate für Kreatinin.

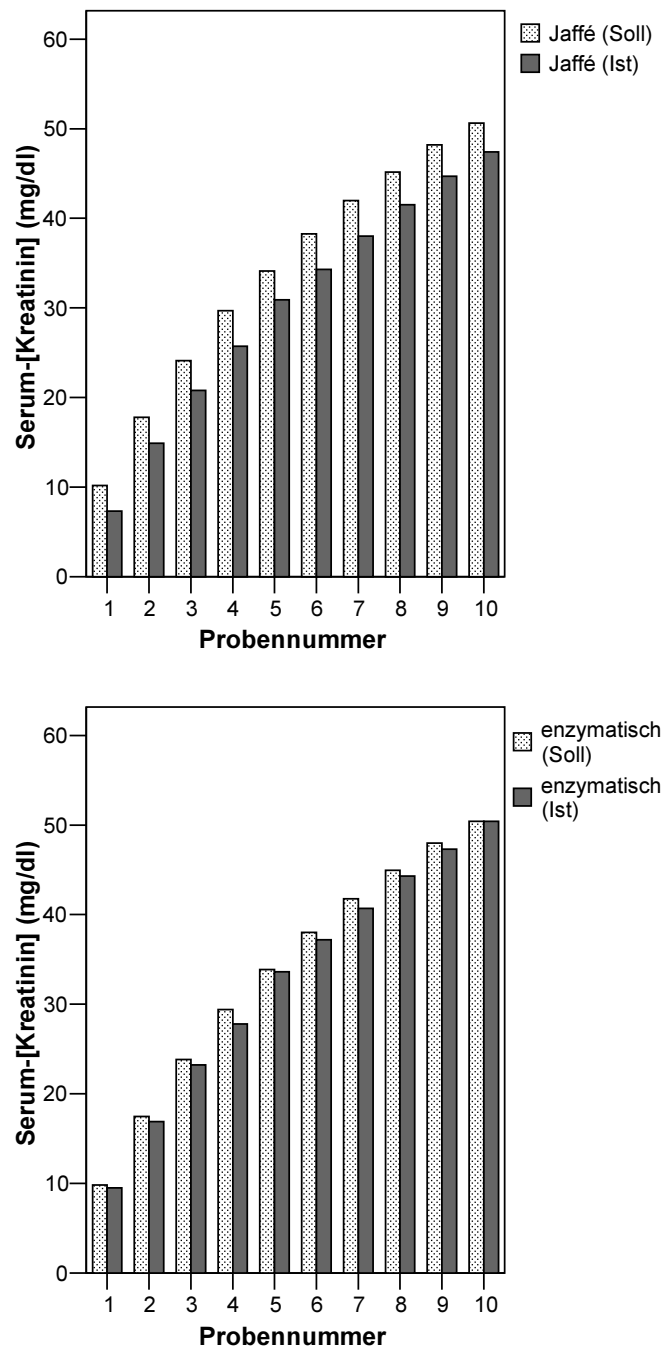


Abb. 9: Vergleich der Werte zwischen berechneter (Soll) und tatsächlich bestimmter (Ist)-Kreatininkonzentration, die mit der Jaffé-Methode und dem enzymatischem Verfahren bei einer Verdünnung von 1:10 analysiert wurden (2. Teil, verdünnt)

Die Säulendiagramme in der Abbildung 9 bringen zum Ausdruck, dass die Diskrepanz zwischen Soll- und Ist-[Kreatinin] bei der Jaffé - Methode (Abb. 9, oben) größer ist als bei dem enzymatischen Verfahren (Abb. 9, unten).

Die Abbildung 10 zeigt eine vergleichende Darstellung der ermittelten Wiederauffindungsraten in % bei unterschiedlicher Konzentration des Serumkreatinins.

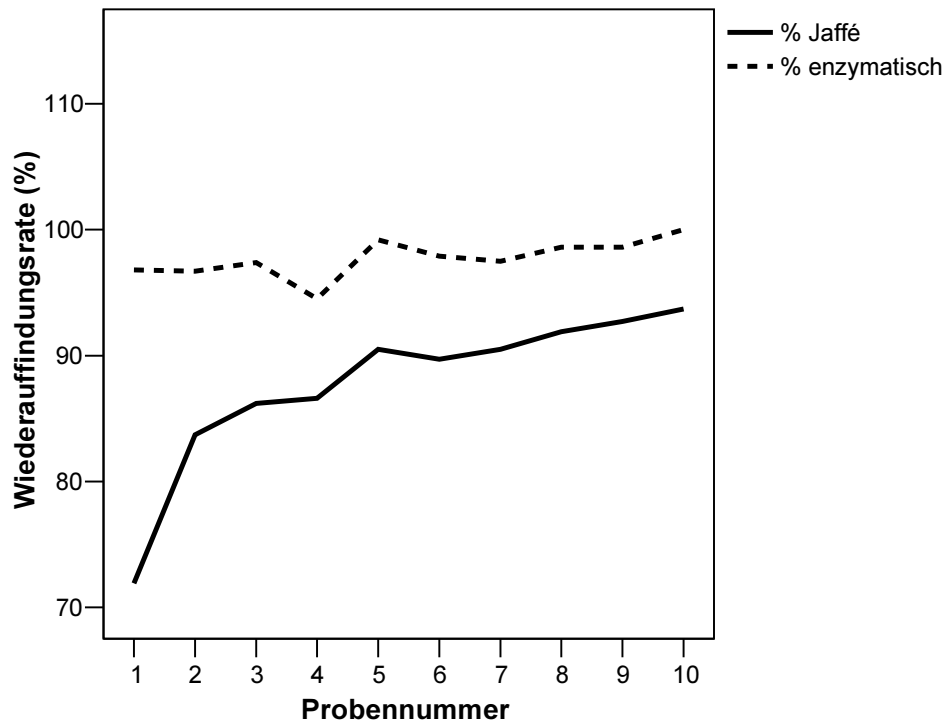


Abb. 10: Wiederauffindungsrate (%) für dem Serum zugesetztes Kreatinin, analysiert mittels der Jaffé-Methode und dem enzymatischen Verfahren (2. Teil, verdünnt)

Es ist zu erkennen, dass das Kreatinin mit dem enzymatischen Verfahren nach der Verdünnung von 1:10 annähernd gleichbleibend zu 90 bis 100 % detektiert wurde. Der Mittelwert liegt bei $97,7 \pm 1,5$ %. Dagegen schwankt die Wiederauffindungsrate bei der Jaffé-Methode nach der Verdünnung von 1:10 zwischen 70 und über 90 % ($87,7 \pm 6,4$ %).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass beide Messmethoden im Bereich bis 10 mg/dl ($884 \mu\text{mol/l}$) annähernd die gleiche Wiederauffindungsrate (Mittelwert: 99,2 % bzw. 99,4 %) für Serum-[Kreatinin_{gesamt}] zeigen. Wenn die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] über 30 mg/dl ($2.652 \mu\text{mol/l}$) liegt, dann fallen deutliche Unterschiede zwischen beiden Messmethoden auf. Bei den unverdünnten Proben liegt das enzymatische Verfahren mit einer Wiederauffindungsrate von $98,2 \pm 0,7$ % ($\bar{x} \pm s$) nahe an derjenigen im niedrigeren Konzentrationsbereich von < 10 mg/dl. Bei der Jaffé - Methode dagegen liegt die Wiederauffindungsrate mit $103,9 \pm 8,2$ % höher. Nach einer Verdünnung der Proben von 1:10 ist das enzymatische Verfahren mit $97,7 \pm 1,5$ % gegenüber der Jaffé - Methode mit $87,7 \pm 6,4$ % in der Wiederauffindung von Kreatinin überlegen. In Messbereichen über 10 mg/dl ($884 \mu\text{mol/l}$) erfolgt insgesamt eine genauere Bestimmung der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] mit dem enzymatischen Verfahren.

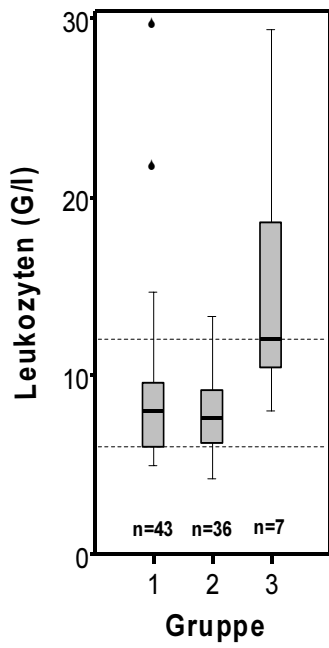
4.2 Einteilung der untersuchten Hunde anhand ihrer GFR und Beurteilung ihres Gesundheitsstatus

Bei den 93 Hunden wurde die GFR mit der P-CL_{terminal} von exogen zugeführtem Kreatinin bestimmt. Da bei vier der ausgewerteten Nierenfunktionstests das Bestimmtheitsmaß $R^2 < 0,98$ lag, wurden diese Tests nicht in die Auswertungen einbezogen. Die Einteilung der Hunde anhand ihrer GFR erfolgte in 3 Gruppen, welche in der Tabelle 19 präsentiert werden. Es sind bei der Serum-[Kreatinin_{endo}] und der GFR jeweils der Median und das 1. - 3. Quartil angegeben.

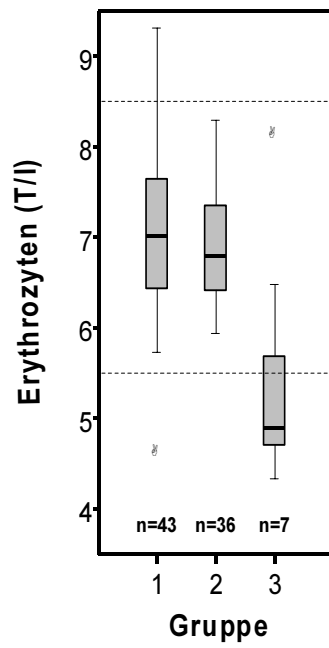
Tab. 19: Einteilung der untersuchten Hunde anhand ihrer GFR in 3 Gruppen

Gruppe	Anzahl (n)	Serum-[Kreatinin _{endo}] ($\mu\text{mol/l}$)	GFR (%)
1 nierengesund	45	73,4 (65,5-82,3)	93,5 (83,5-103,5)
2 gering-/mittelgradig nierenkrank	36	103,1 (96,1-119,9)	60 (54-66)
3 stark nierenkrank	8	239,0 (153,3-737,0)	29 (23,5-33,1)
gesamt	89		

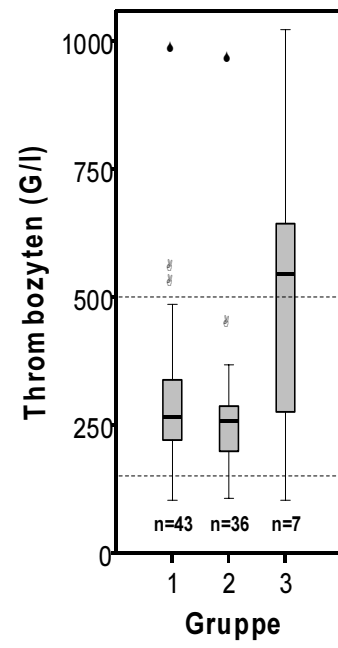
Im Folgenden sind die einzelnen Parameter des Blutbildes vergleichend zwischen den 3 Gruppen dargestellt. Der Referenzbereich liegt jeweils zwischen den eingezeichneten gestrichelten Linien.



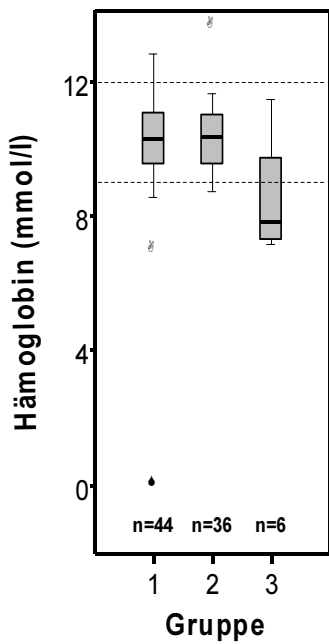
Leukozyten (G/l)



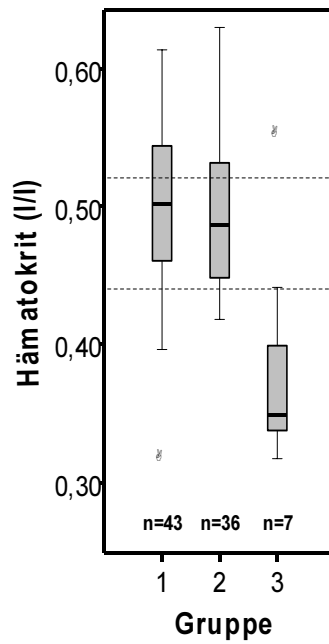
Erythrozyten (T/l)



Thrombozyten (G/l)



Hämoglobin (mmol/l)



Hämatokrit (l/l)

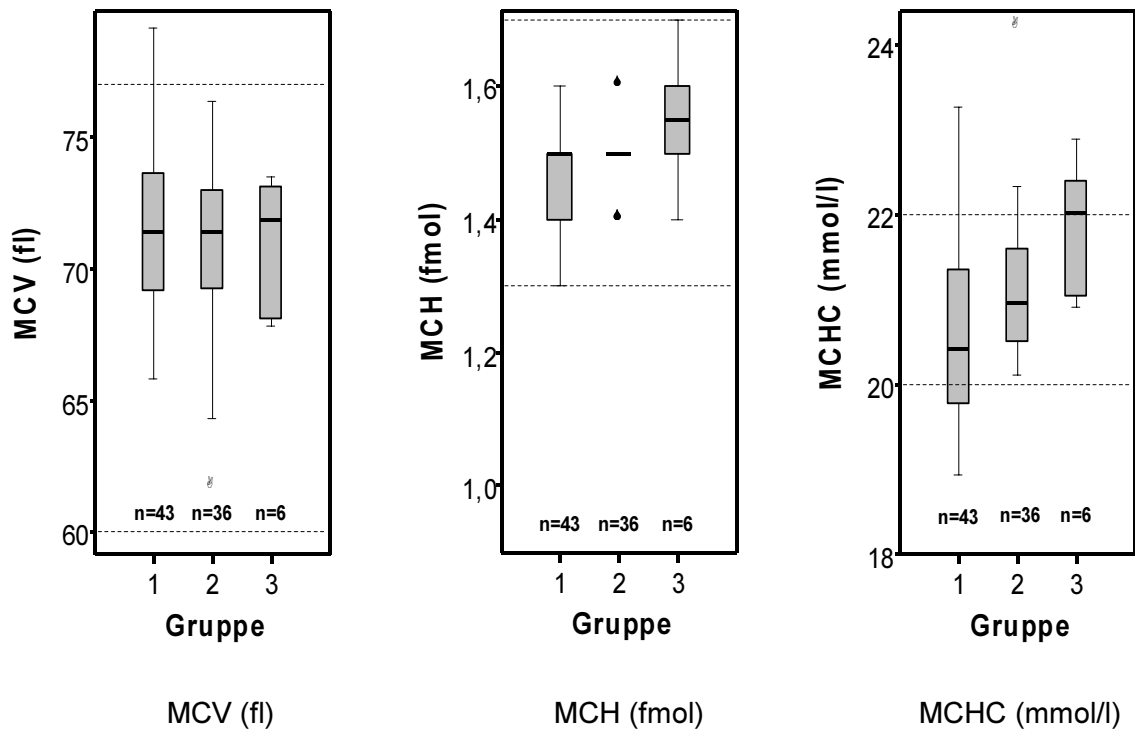


Abb. 11: Vergleichende Ergebnisse ausgewählter Blutparameter zwischen den drei Gruppen (Der aus der Literatur übernommene Normwertbereich befindet sich zwischen den gepunkteten Linien.)

Die Erythrozytenzahl, der Hämoglobingehalt und auch der Hämatokrit liegen bei den Hunden mit stark reduzierter GFR (< 40 %) deutlich unter dem Referenzbereich. Der MCV und der MCH liegen bei allen drei Gruppen im physiologischen Bereich. Der Median des MCHC liegt bei der Gruppe 3 knapp über dem Referenzbereich. Die Thrombozyten- und Leukozytenzahlen liegen bei Patienten der Gruppe 3 deutlich höher als bei Tieren der Gruppen 1 und 2. Der Median der Leukozytenzahl liegt im Gegensatz zum Median der Thrombozytenzahl bei Hunden der Gruppe 3 noch im Referenzbereich.

4.3 Korrelation zwischen der GFR und den erhobenen Blut- und Harnwerten

Die bei den untersuchten Hunden gemessenen Blut- und Harnparameter können nun zur quantitativ detektierten GFR in Beziehung gesetzt werden. Für den Vergleich zwischen der GFR und den Blutparametern Serum-[Kreatinin_{endo}], Serum-[Harnstoff] und Serum-[Phosphat] wurden zusätzlich 31 Hunde aus dem Patientengut der LMU München in die Auswertungen einbezogen. Bei ihnen wurde die GFR mit dem gleichen renalen Funktionstest bestimmt.

Die Beziehung zwischen der GFR und dem am häufigsten in der klinischen Praxis zur Aufklärung einer renalen Malfunktion bestimmten Parameter, der **Serum-[Kreatinin_{endo}]**, ist in der Abbildung 12 dargestellt.

In allen nachfolgenden Abbildungen ist jeweils die obere Referenzgrenze für den betreffenden Parameter als gestrichelte Linie dargestellt.

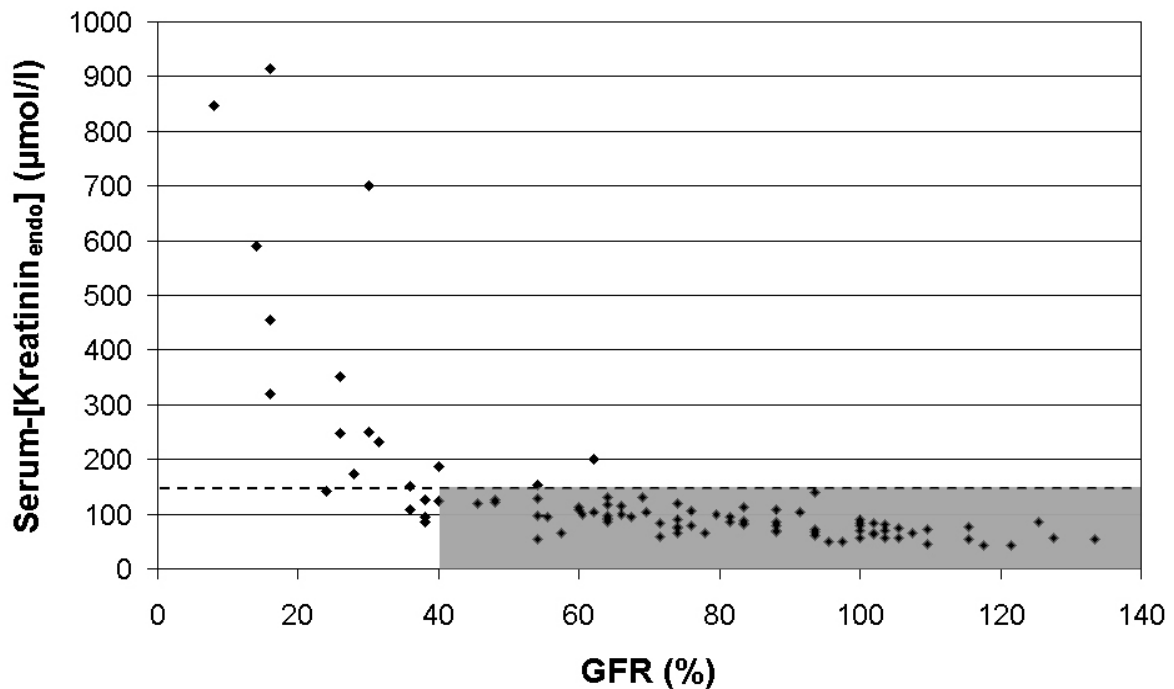


Abb. 12: Vergleich der Werte zwischen der GFR und der Serum-[Kreatinin_{endo}]

Bei nachlassender GFR steigt die Serum-[Kreatinin_{endo}] geringgradig an. Erst ab einer GFR von etwa 40 % und darunter ist ein deutlicher Anstieg der Serum-[Kreatinin_{endo}] zu erkennen. Bis zu einer Reduktion der GFR auf 40 % befindet sich die Serum-[Kreatinin_{endo}] im sogenannten „kreatininblinden Bereich“ (grau unterlegter Bereich in Abb. 12). Eine Nierenfunktionsstörung kann mit dem Parameter Serum-[Kreatinin_{endo}] in diesem „kreatininblinden Bereich“ diagnostisch nicht erfasst werden. Damit stellt die Serum-[Kreatinin_{endo}] einen sehr insensitiven Parameter zur frühzeitigen Diagnostik von Nierenfunktionsstörungen dar. In der Literatur existieren außerdem sehr unterschiedliche Angaben zu den Referenzwerten der Serum-[Kreatinin_{endo}] (vgl. Kap. 2.3.2.1.), wodurch eine Beurteilung der Nierenfunktion eines Patienten zusätzlich erschwert wird.

Die **Serum-[Harnstoff]** wird ebenfalls als Nierenfunktionsparameter in der Praxis herangezogen. Einen Vergleich zwischen der GFR und der Serum-[Harnstoff] zeigt die Abbildung 13.

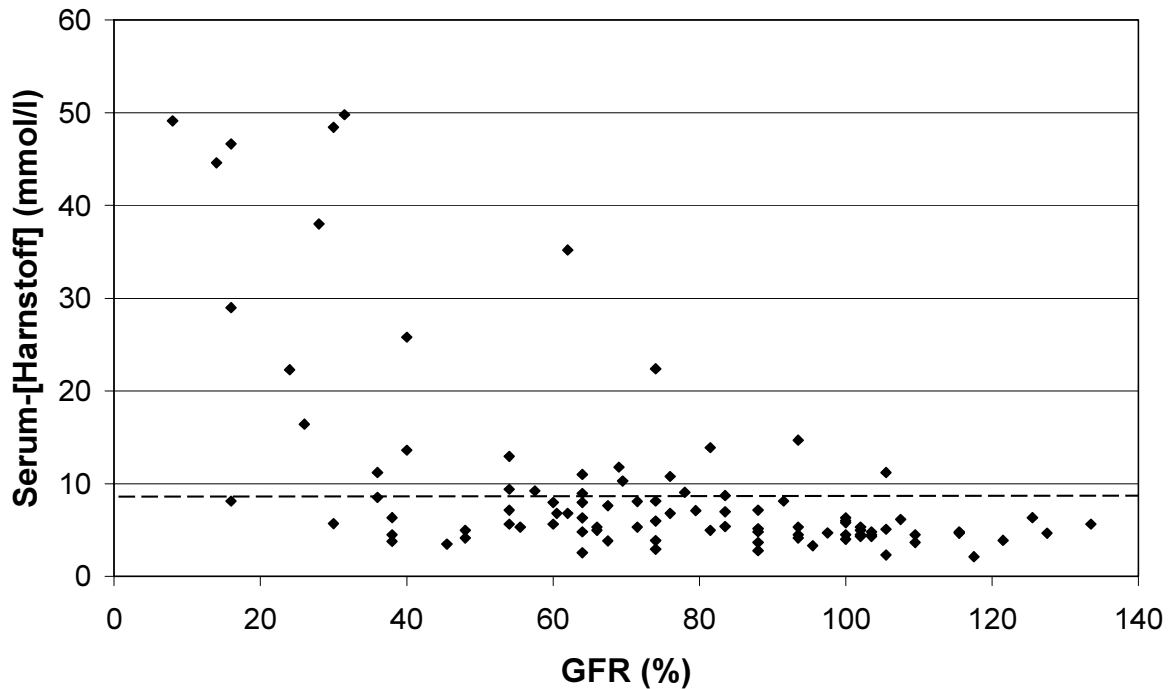


Abb. 13: Vergleich der Werte zwischen der GFR und der Serum-[Harnstoff]

Die Serum-[Harnstoff] zeigt ein ähnliches Verhalten wie die Serum-[Kreatinin_{endo}]. Es ist jedoch eine breitere Verteilung der Werte zu erkennen. Einige Hunde besaßen stark erhöhte Werte, obwohl die GFR nicht deutlich reduziert war. Dagegen wiesen andere Tiere mit einer GFR von < 40 % eine Serum-[Harnstoff] im Referenzbereich von < 8,3 mmol/l auf.

Das Fortschreiten einer Niereninsuffizienz kann durch eine erhöhte Serum-[Phosphat] beschleunigt werden. Ob die **Serum-[Phosphat]** als frühzeitiger Marker zur Diagnostik einer Niereninsuffizienz herangezogen werden kann, ist in der folgenden Abbildung 14 dargestellt. Sie zeigt die Beziehung zwischen Serum-[Phosphat] und der GFR.

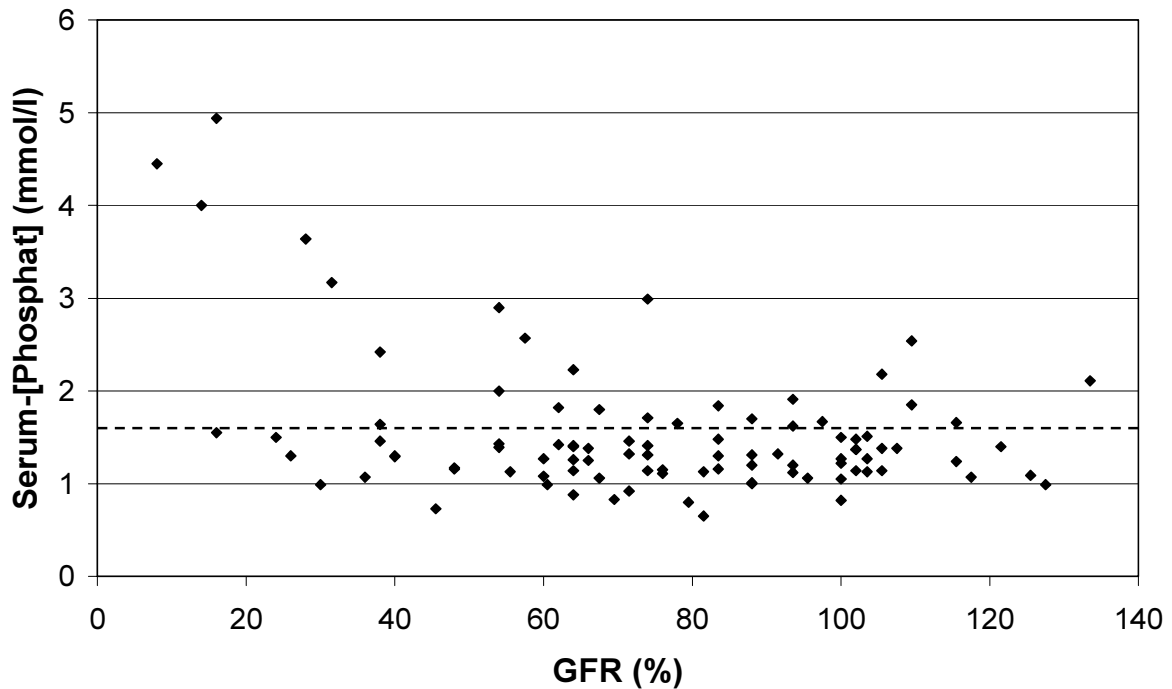


Abb. 14: Vergleich der Werte zwischen der GFR und der Serum-[Phosphat]

Die Serum-[Phosphat] befindet sich bei vielen Hunden trotz zum Teil stark verminderter GFR im Referenzbereich. Erst bei einer GFR von $< 30\%$ ist bei einigen Tieren eine deutliche Hyperphosphatämie > 3 mmol/l erkennbar. Allerdings gibt es auch Patienten, die bei einer vergleichbar erniedrigten GFR eine Serum-[Phosphat] im Normbereich aufwiesen. Im Gegensatz dazu stehen die Tiere, deren Serum-[Phosphat] bei physiologischer GFR erhöht war.

In der folgenden Abbildung 15 ist die GFR im Vergleich zum **Na/K-Quotienten** im Serum dargestellt. Der Referenzwert für diesen Quotienten liegt beim Hund bei ≥ 27 und ist in der Abbildung 15 durch die gestrichelte Linie dargestellt.

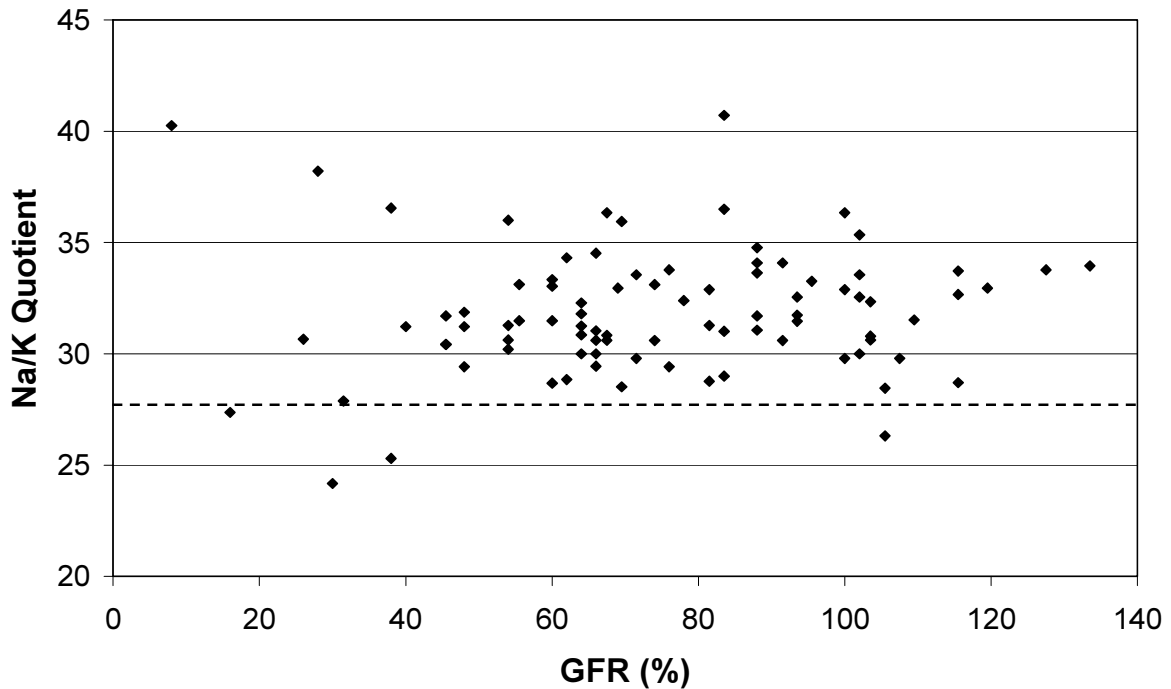


Abb. 15: Vergleich der Werte zwischen der GFR und dem Na/K-Quotienten im Serum

Zwischen der GFR und dem Na/K-Quotienten bestand kein nachweisbarer Zusammenhang. Bis auf eine Ausnahme können anhand dieser Ergebnisse Patienten mit einem Na/K-Quotient < 27 als nierenfunktionsgestört detektiert werden. Dieses gilt jedoch erst bei einer GFR < 40 %.

Die weiterhin untersuchten Parameter, wie **Serum-[Kalzium_{gesamt}]**, **-[Chlorid]** und **-[Magnesium]** standen in keiner Beziehung zur gemessenen GFR.

Bei den hämatologischen Parametern kann zwischen der **Erythrozytenzahl** und der GFR ein Zusammenhang festgestellt werden. Wenn die Erythrozytenzahl < 5 T/l sinkt, dann ist die GFR in den meisten Fällen auf < 40 % gesunken. Die folgende Abbildung 16 stellt den Zusammenhang zwischen der GFR und der Erythrozytenzahl dar.

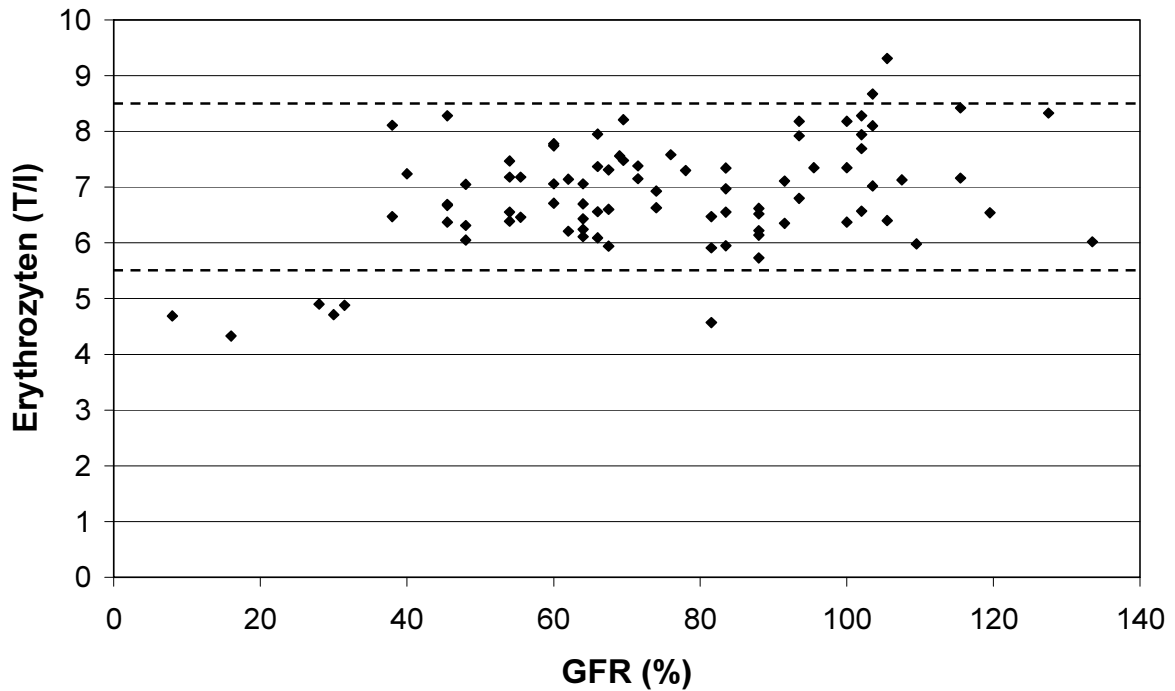


Abb. 16: Vergleich der Werte zwischen der GFR und der Erythrozytenzahl

Im Folgenden werden ausgewählte Parameter im Harn mit der GFR in Beziehung gesetzt. Die Abbildung 17 zeigt die Beziehung zwischen der GFR und dem Ausmaß der Proteinurie, dargestellt anhand des **Urin-Protein/Kreatinin-Quotienten (UPC)**.

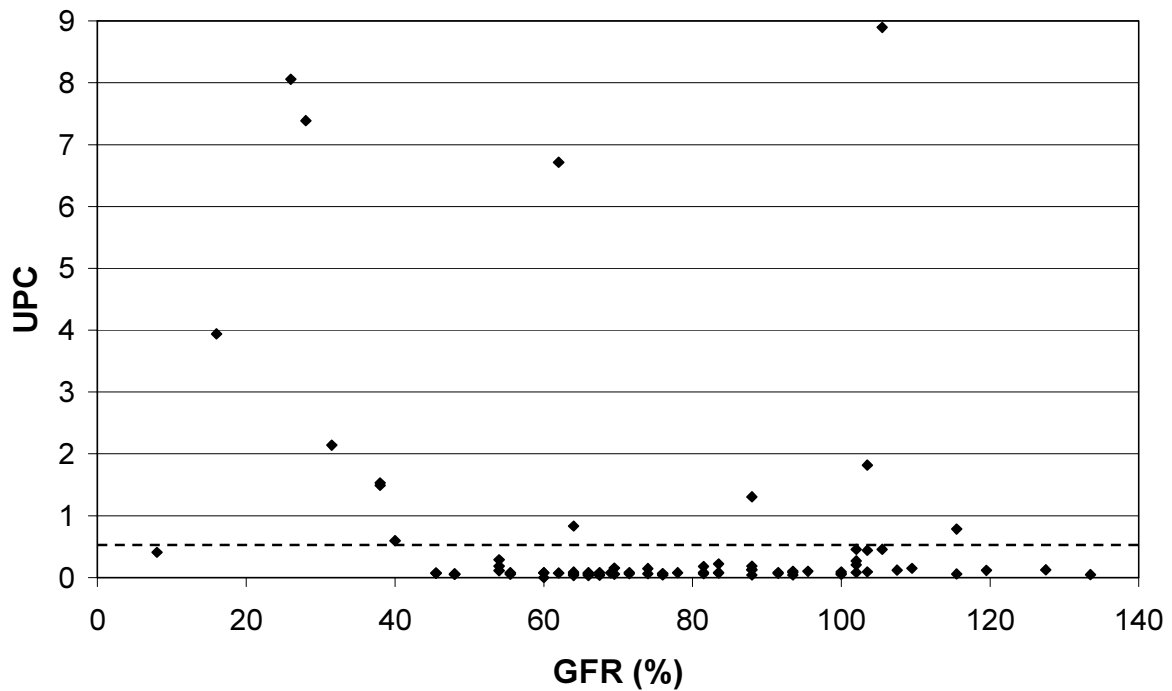


Abb. 17: Vergleich der Werte zwischen der GFR und dem Urin-Protein-Kreatinin-Quotienten (UPC)

Eine Beziehung zwischen dem UPC-Quotienten und der GFR ist mit diesen Ergebnissen nicht nachweisbar. Es scheint, dass die UPC-Ratio nicht zur Diagnostik von Einschränkungen der GFR herangezogen werden kann.

Die Parameter Harndichte, Harnosmolalität, Harn-[Natrium], -[Kalium], -[Phosphat] und -[Harnstoff] stehen zur gemessenen GFR in keiner nachweisbaren Beziehung. Desweiteren wurden die FE_{Natrium} , FE_{Kalium} und FE_{Phosphat} mit der GFR verglichen. Die Abbildung 18 stellt die Beziehung der FE_{Natrium} zur GFR dar.

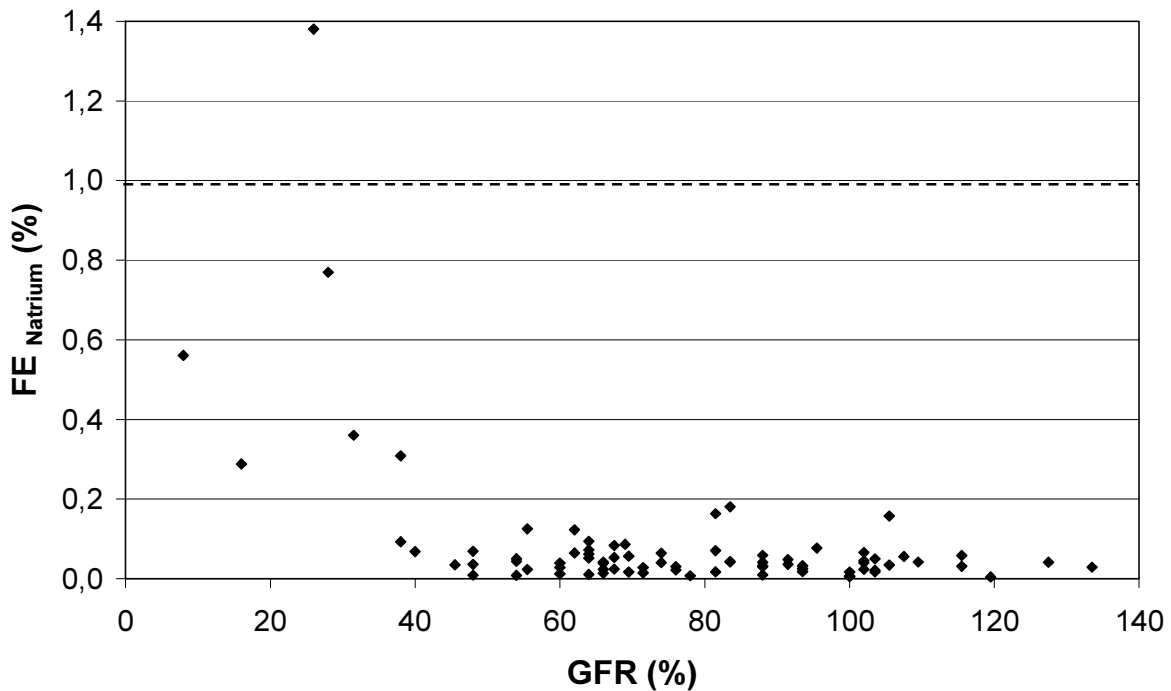


Abb. 18: Vergleich der Werte zwischen GFR und FE_{Natrium}

Der obere Grenzwert für die FE_{Natrium} liegt bei 1 % (gestrichelte Linie). Demnach liegen die Werte fast aller Patienten im Normbereich. Es ist jedoch ein Anstieg der FE_{Natrium} auf $> 0,2$ % zu erkennen, wenn die GFR auf < 40 % der Norm sinkt. Obwohl die fraktionelle Elektrolytausscheidung eher Rückschlüsse auf die tubulären Funktionen zulässt, besteht bei der FE_{Natrium} auch ein Zusammenhang mit der GFR (tubuloglomerulärer Feedback). Die Verteilung der Werte erinnert an die der Serum-[Kreatinin_{endo}] (Abb.12).

Die folgenden beiden Abbildungen 19 und 20 zeigen, dass zwischen der FE_{Kalium} und der GFR sowie zwischen der FE_{Phosphat} und der GFR kein Zusammenhang nachgewiesen werden konnte.

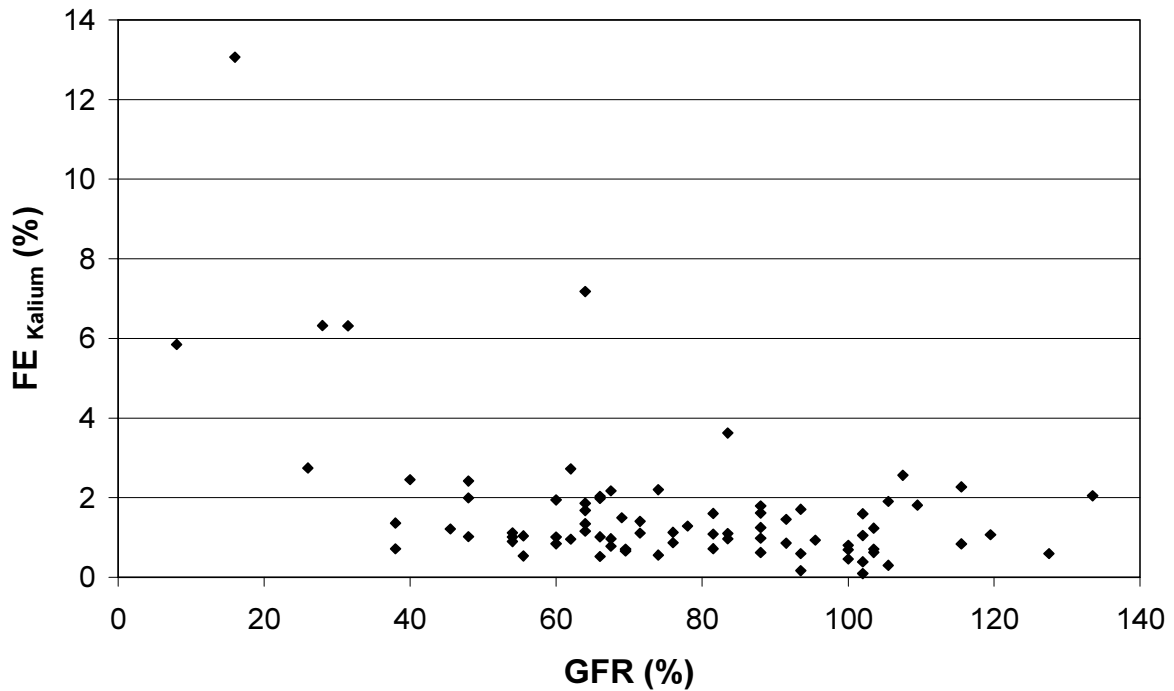


Abb. 19: Vergleich der Werte zwischen der GFR und der FE_{Kalium}

Der obere Grenzwert für die FE_{Kalium} liegt bei 20 %, so dass die FE_{Kalium} aller untersuchten Hunde im Normbereich lag. Abschließend ist ein Vergleich der FE_{Phosphat} und der GFR in der Abbildung 20 dargestellt.

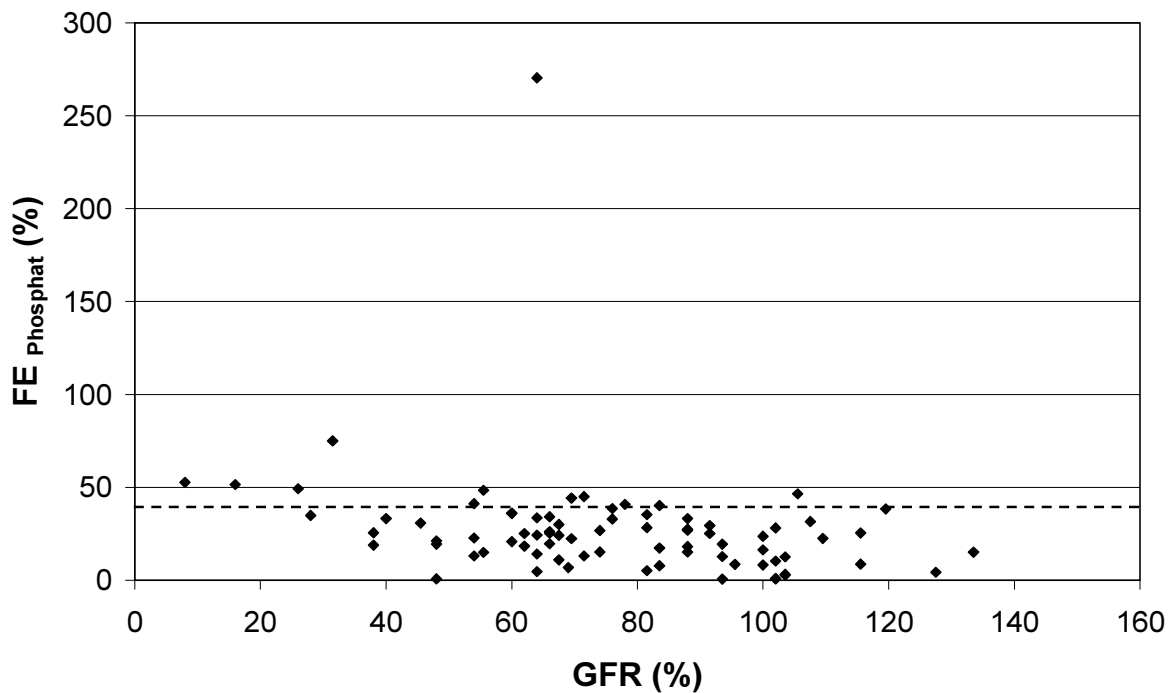


Abb. 20: Vergleich der Werte zwischen der GFR und der FE_{Phosphat}

Auch hier liegen nahezu alle untersuchten Hunde im Normbereich. Sowohl Tiere mit erniedrigter GFR als auch Tiere mit einer GFR $\geq 70\%$ besitzen erhöhte FE_{Phosphat} -Werte.

4.4 Grenzwert-Bestimmung der Serum-[Kreatinin_{endo}]

Die Serum-[Kreatinin_{endo}] korreliert von allen untersuchten Parametern am besten mit der GFR (vgl. Kap. 4.3). Die Angaben für den oberen Grenzwert der physiologischen Serum-[Kreatinin_{endo}] bei Hunden unterscheiden sich in der Literatur stark voneinander (Anonym, 2003). Aufgrund der durchgeführten quantitativen GFR - Bestimmung ist es möglich, den oberen Grenzwert für physiologische Serum-[Kreatinin_{endo}] beim Hund diagnostisch valide festzulegen. Dabei sollte eine reduzierte GFR möglichst frühzeitig über diesen Parameter erfasst werden. Insgesamt standen 300 Hunde zur Ermittlung des Referenzwertes für die Serum-[Kreatinin_{endo}] zur Verfügung. Mit der ROC - Analyse wurden für eine GFR von $\leq 30\%$, $\leq 40\%$, $\leq 50\%$ und $\leq 70\%$ der Norm jeweils die diagnostische Sensitivität und diagnostische Spezifität berechnet. Für die vier genannten GFR - Werte wurde diejenige Serum-[Kreatinin_{endo}] (Testvariable) gewählt, bei der sowohl Sensitivität als auch Spezifität diagnostisch optimale Werte besaßen. Die AUC konnte ebenfalls für den jeweiligen GFR-Wert berechnet werden. Die Tabelle 20 gibt die Serum-[Kreatinin_{endo}], die Sensitivität, Spezifität und die AUC bei den verschiedenen GFR - Werten an.

Tab. 20: Angabe der Werte für Serum-[Kreatinin_{endo}], Sensitivität, Spezifität und AUC bei unterschiedlicher GFR (n = 300 Hunde)

Zustandsvariable: GFR (in % der Norm)	Testvariable: Serum- [Kreatinin _{endo}] ($\mu\text{mol/l}$)	Sensitivität (%) (MW, 95% KI ¹)	Spezifität (%) (MW, 95% KI ¹)	AUC ² (MW, 95% KI ¹)
$\leq 30\%$	171	100 (87,1-100)	98,5 (96,3-99,6)	0,999 (0,986-1,000)
$\leq 40\%$	144	88,9 (73,9-96,8)	97,0 (94,1-98,7)	0,960 (0,932-0,979)
$\leq 50\%$	116	88,7 (77,0-95,7)	89,1 (84,5-92,7)	0,952 (0,921-0,973)
$\leq 70\%$	93	85,8 (78,5-91,4)	72,8 (65,6-79,3)	0,868 (0,824-0,904)

1 Mittelwert und 95 %iges Konfidenzintervall

2 Area Under Curve: Fläche unter der ROC-Kurve

Die Sensitivität, Spezifität und die AUC sind bei einer GFR von $\leq 30\%$ am größten. Im Durchschnitt werden 100 % der kranken Tiere als krank detektiert, während nur 1,5 % der

gesunden Tiere als falsch krank diagnostiziert werden. Der obere Grenzwert für die Serum-[Kreatinin_{endo}] liegt dann bei 171 µmol/l. Greiner et al. (2000) haben eine Bewertung für die AUC vorgenommen. Sie ist Inhalt der folgenden Tabelle.

Tab. 21: Bewertung der Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) nach Greiner et al. (2000)

Wert für die AUC (%)	Bewertung
0,91 - 1,0	sehr exakt
0,71 - 0,9	exakt
0,51 - 0,7	mäßig exakt
≤ 0,5	nicht informativ

Nach dieser Bewertung sind die Werte für die AUC bei einer GFR von ≤ 30 %, ≤ 40 % und ≤ 50 % als sehr exakt zu beurteilen (Tab. 20).

Um rechtzeitig mit einer geeigneten Therapie bei Nierenfunktionsstörungen beginnen zu können, ist das frühzeitige Erkennen einer reduzierten GFR von größter Wichtigkeit. Wenn diese aber bereits auf ≤ 30 % der Norm gesunken ist, kann nicht mehr von einer Frühdiagnostik gesprochen werden. Bei einer GFR ≤ 50 % oder ≤ 70 % der Norm besitzen dagegen die Sensitivität, Spezifität und AUC so niedrige Werte, dass eine ausreichende diagnostische Sicherheit kaum gegeben ist. Als Kompromiss zwischen einer relativ frühen Erkennung der renalen Malfunktion und sicheren diagnostischen Werten empfiehlt sich ein Cut-off-Wert für die Serum-[Kreatinin_{endo}] von 144 µmol/l und eine GFR von ≤ 40 %. In Abbildung 21 sind die vier ROC-Kurven der untersuchten GFR-Werte aufgetragen. Je höher die Grenze für die Zustandsvariable GFR gesetzt wird, desto flacher wird die ROC-Kurve und desto geringer die AUC. Damit sinkt die diagnostische Aussagekraft der Serum-[Kreatinin_{endo}].

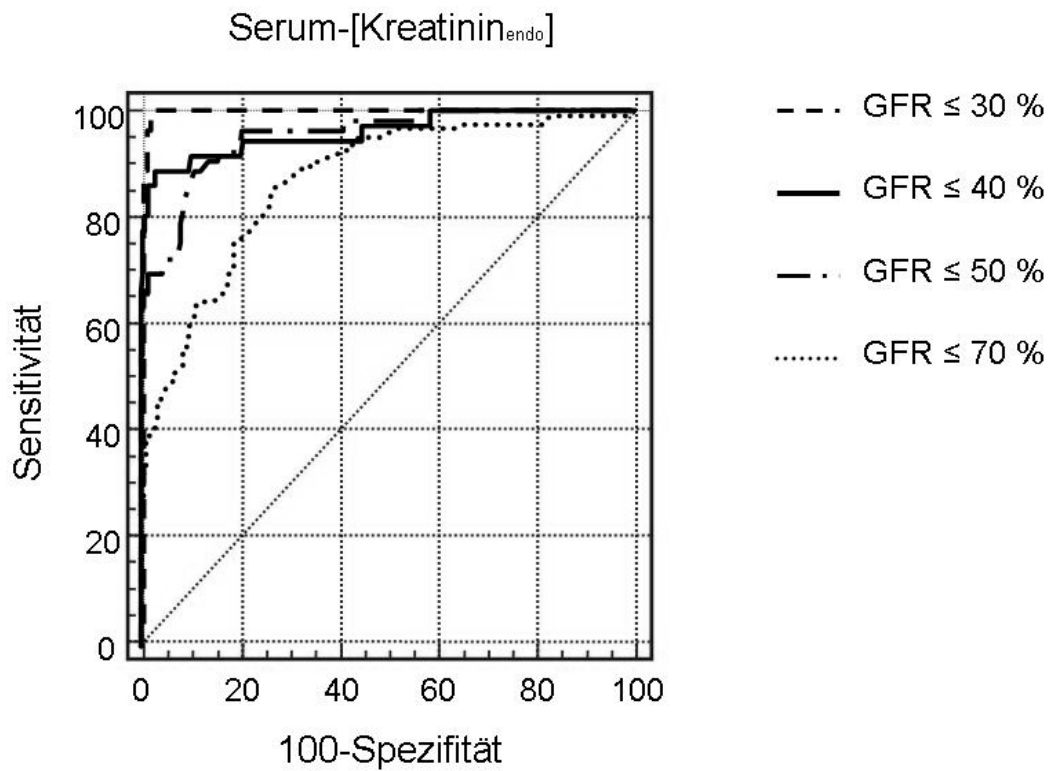


Abb. 21: ROC-Kurven bei unterschiedlichen GFR-Werten

Die Abbildung 22 zeigt das Streudiagramm, in dem die Werte für die Serum-[Kreatinin_{endo}] und die GFR aller 300 Hunde gegeneinander aufgetragen sind. Die GFR von 40 % und der dafür diagnostisch vorteilhaft ermittelte Grenzwert der Serum-[Kreatinin_{endo}] von 144 $\mu\text{mol/l}$ sind eingezeichnet.

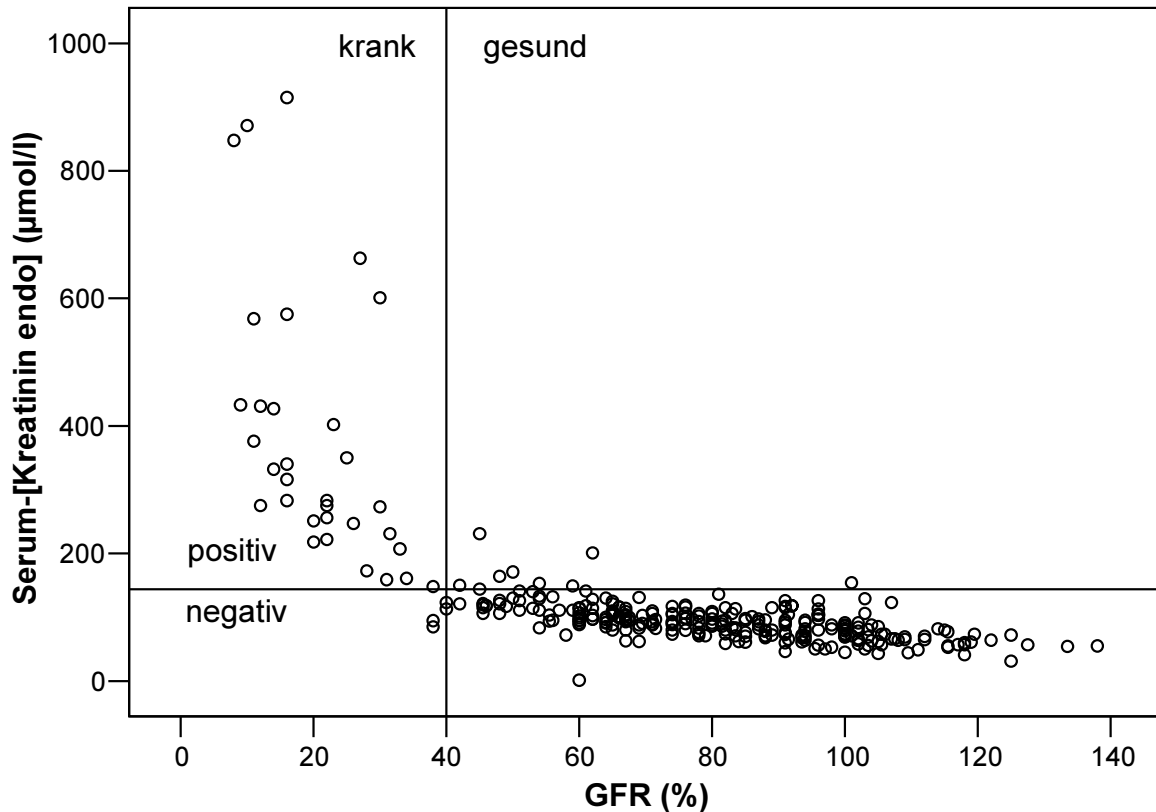


Abb. 22: Streudiagramm der Serum-[Kreatinin_{endo}] und GFR von 300 Hunden (eingezeichneter Cut-off-Wert für GFR = 40 % und Serum-[Kreatinin_{endo}] = 144 µmol/l)

Es ist zu erkennen, dass bei einem Cut-off-Wert der Serum-[Kreatinin_{endo}] von 144 µmol/l und einer Grenze der GFR von 40 % relativ wenig Tiere als falsch-negativ oder falsch-positiv bewertet werden.

4.5 Verteilung von exogen zugeführtem Kreatinin im Organismus

Bei der Durchführung des renalen Funktionstests darf die erste Blutprobe zur Berechnung der Geraden frühestens drei Stunden nach der Kreatininapplikation entnommen werden. Grund hierfür ist die möglichst abgeschlossene Verteilung des Kreatinins (steady state) in den Kompartimenten des Körpers. Da in der klinischen Praxis möglichst schnell ein Testergebnis benötigt wird, wurde die diagnostische Aussage einer frühest möglichen Blutprobenentnahme nach der Markerapplikation untersucht. Hierfür war es zunächst erforderlich, den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die Verteilung des exogen zugeführten Kreatinins im Organismus vollständig abgeschlossen ist. Für diese Untersuchungen standen Daten von 31 Hunden der LMU München zur Verfügung. Bei diesen Tieren wurde die

P-CL_{gesamt} mit exogen zugeführtem Kreatinin durchgeführt. Zu den Zeitpunkten 2, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 360, 480 und 600 min nach der Kreatininapplikation erfolgten Blutprobenentnahmen für eine Bestimmung der Serum-[Kreatinin_{exo}]. Über die abnehmende Serum-[Kreatinin_{exo}] zu den einzelnen Zeitpunkten konnte die Verteilung des Markers im Organismus berechnet werden. Es wurde zunächst der Exponent β zwischen jeweils zwei Serum-[Kreatinin_{exo}] erfasst. Der Exponent β gibt die Steigung (negative Steigung = Abfall) der Kreatinin-Konzentrations-Zeitkurve an. Da die Markerkonzentration aufgrund von Verteilungsvorgängen zunächst rasch abfällt, ist der Exponent β kurz nach der Kreatininapplikation am größten. Wenn sich der Zahlenwert nicht mehr ändert, dann hat sich das Kreatinin im Körper vollständig verteilt. Es wird von diesem Zeitpunkt an nur noch über die glomeruläre Filtration ausgeschieden. Um diesen Zusammenhang besser darstellen zu können, wurden die Differenzen zweier Exponenten herangezogen. Wenn diese Differenz null beträgt, dann gleichen sich die Steigungen zwischen beiden Zeiträumen. Damit ist die Verteilung des Markers abgeschlossen. Abbildung 23 stellt die Differenzen der Exponenten von 17 Hunden dar. Es wurden zunächst nur „nierengesunde“ Hunde mit einer GFR > 70 % der Norm einbezogen.

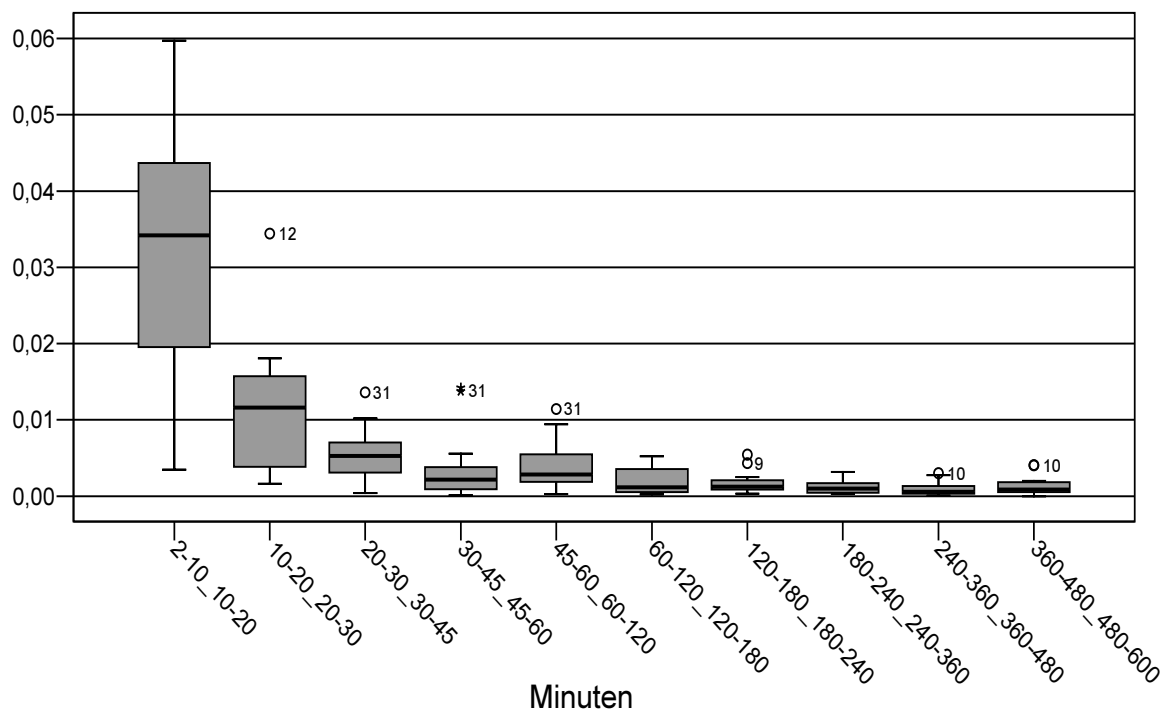


Abb. 23: Differenzen der Exponenten β bei nierengesunden Hunden mit einer GFR > 70 % nach unterschiedlichen Zeiträumen der Kreatininzufuhr

Der Median und auch die Streuung der Differenzen zwischen zwei β - Werten benachbarter Zeiträume sind zu Beginn der Verteilungsphase relativ hoch. Sie nehmen dann kontinuierlich

ab und nähern sich dem Wert Null. Die Verteilungsphase gilt als abgeschlossen, wenn der Median $< 0,0015$ liegt. Diese Grenze wurde im Zeitraum von 60 - 120 bis 120 - 180 min nach Kreatininzufuhr mit dem Median von 0,0012 unterschritten. Zu diesem Zeitpunkt ist allerdings die Streuung zwischen dem 1. und 3. Quartil noch relativ groß im Vergleich zum darauf folgenden Zeitraum (Abb. 23: graue Boxen). Ein Abschluss der Kreatininverteilung ist daher bei gesunden Hunden spätestens 120 Minuten nach der Kreatininzufuhr erreicht.

Da nierenfunktionsgestörte Patienten möglicherweise eine veränderte Verteilungsgeschwindigkeit des zugeführten Kreatinins besitzen, wurden für sie ebenfalls die Differenzen der Exponenten berechnet. Die Auswertung erfolgte an 12 Hunden mit unterschiedlich stark reduzierter GFR (Abb. 24).

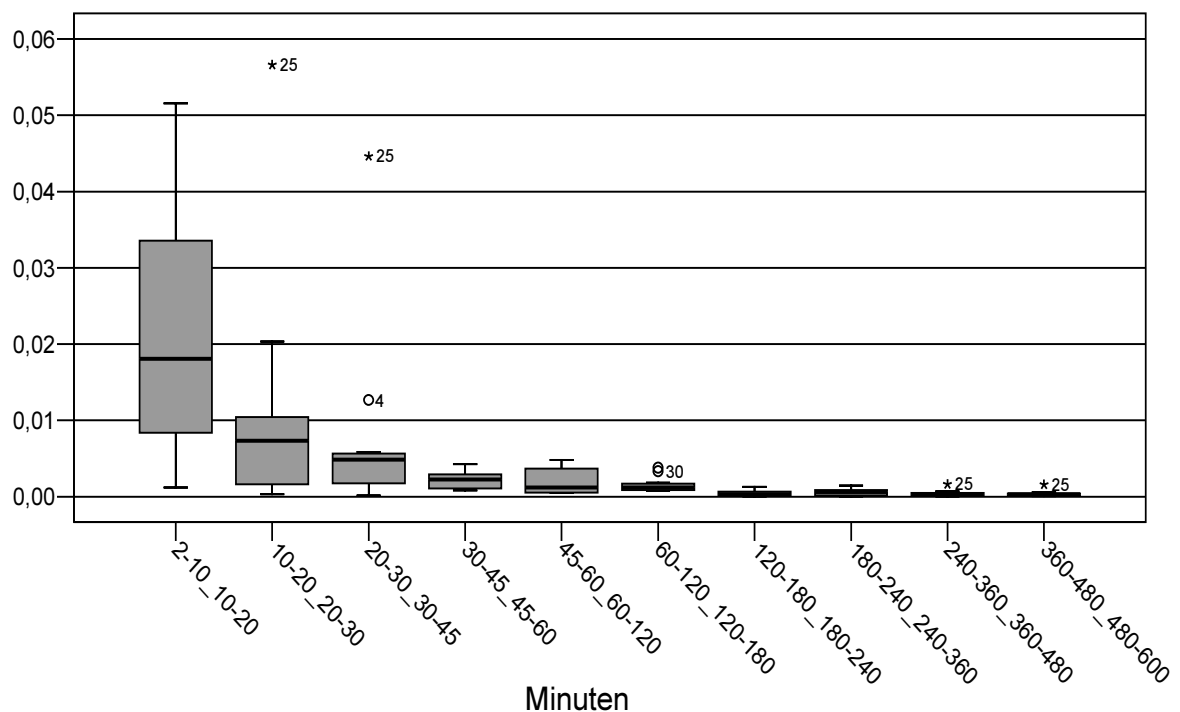


Abb. 24: Differenzen der Exponenten β bei nierenkranken Hunden mit einer GFR $\leq 70\%$ nach unterschiedlichen Zeiträumen der Kreatininzufuhr

Bei den Hunden mit einer zunehmenden renalen Malfunktion sieht die Verteilung des Markers Kreatinin ähnlich aus wie bei den nierengesunden Tieren mit einer GFR $> 70\%$. Auch hier liegt der Median von $< 0,0015$ im Zeitraum 60 - 120 bis 120 - 180 min nach der Kreatininzufuhr. Die Streuung in diesem Zeitraum ist bereits sehr gering, so dass bei nierenkranken Patienten die Verteilung des Kreatinins schon nach 60 Minuten abgeschlossen zu sein scheint.

4.6 Das „Zwei-Schritt-Verfahren“

In weiteren Untersuchungen wurde geprüft, ob eine qualitative Einteilung der Hunde anhand ihrer GFR in „vermindert“ (krank) und „nicht vermindert“ (gesund) mit nur einer Blutprobe nach der Applikation des Markers möglich wird. Einschließlich der 0 - Probe wären dann insgesamt nur zwei Blutproben zur Diagnostik einer renalen Malfunktion notwendig.

Zunächst wurde der frühest mögliche Zeitpunkt nach abgeschlossener Verteilung des Markers untersucht. Die Blutprobenentnahme erfolgte im Zeitraum von 2 - 3 Stunden nach Kreatiningabe. Das Streudiagramm in Abbildung 25 zeigt, dass zu diesem frühen Zeitpunkt bei der Mehrzahl der untersuchten Tiere ein diagnostisch nicht verwertbarer Unterschied zwischen „nierengesunden“ und „nierenkranken“ zu finden ist. Als Grenzwert zwischen gesunden und nierenfunktionsgestörten Hunden wurde eine GFR von 70 % festgelegt.

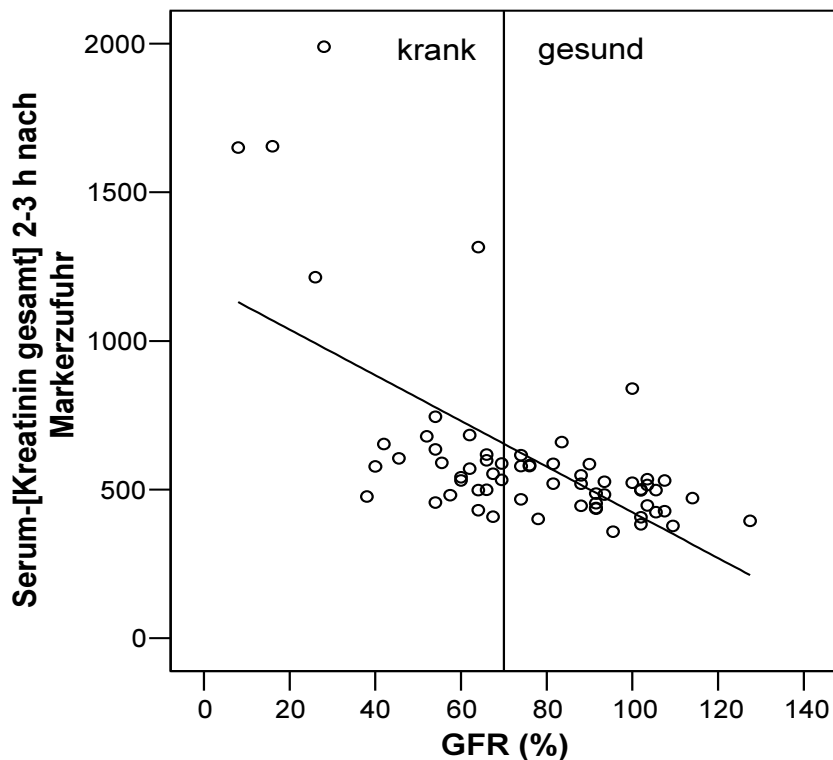


Abb. 25: Streudiagramm der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] zwischen 2 und 3 Stunden nach der Kreatininapplikation in Abhängigkeit von der GFR

Die eingezeichnete Trendlinie zeigt zwar einen relativ steilen Verlauf, es ist jedoch bei der Mehrzahl der Tiere kaum eine Unterscheidung hinsichtlich der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] zwischen nierengesunden und renal erkrankten Tieren zu diesem Zeitpunkt möglich.

Desweiteren wurde der Zeitpunkt 3 - 4 Stunden nach der Kreatininapplikation untersucht. Wie die Abbildung 26 zeigt, konnte hier ebenfalls kaum ein Unterschied in der Serum-

[Kreatinin_{gesamt}] zwischen gesunden und nierenfunktionsgestörten Hunden festgestellt werden.

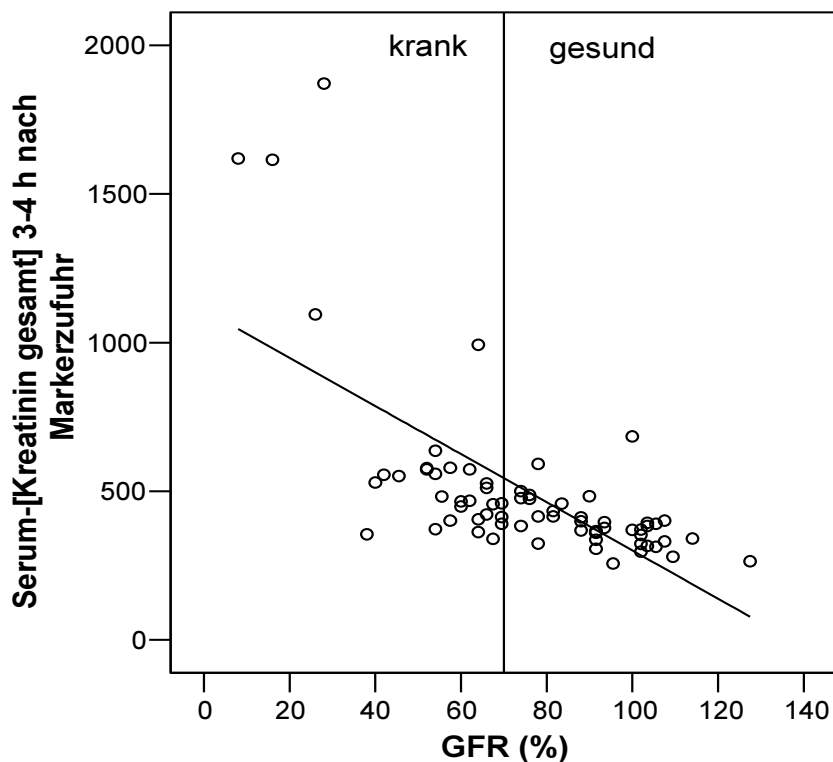


Abb. 26: Streudiagramm der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] zwischen 3 und 4 Stunden nach der Kreatininapplikation in Abhängigkeit von der GFR

In der nachfolgenden Abbildung 27 ist die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt (6 - 7 Stunden nach Markierzufuhr) dargestellt. Die Kalkulation der GFR erfolgte für diese Darstellung mit der Serum-[Kreatinin_{exo}] der vorhergehenden drei Blutproben (vgl. Kap. 3.2.2, Tab. 4, Blutprobe 3 - 5).

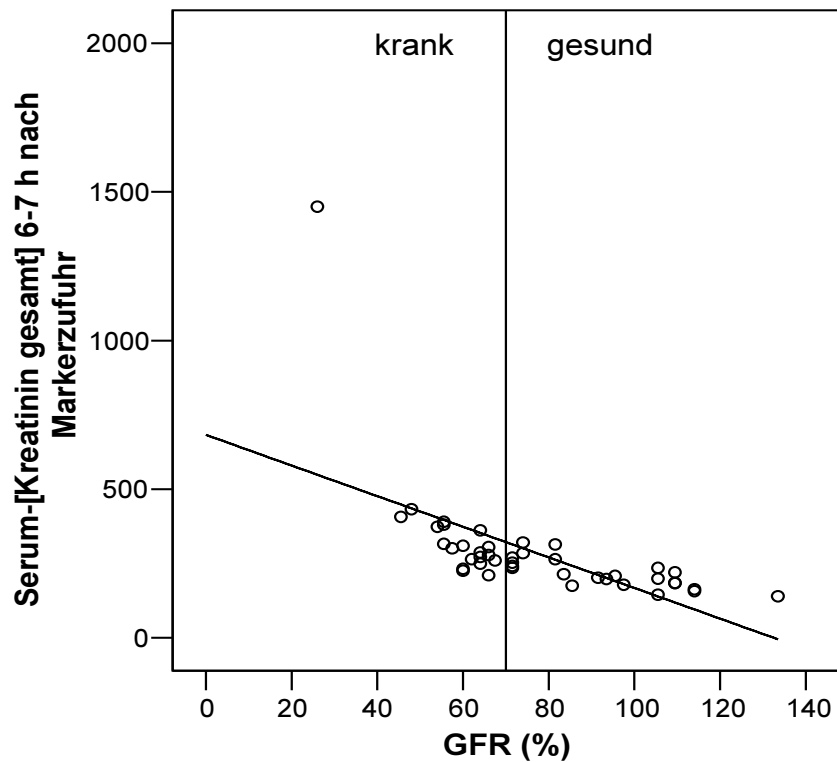


Abb. 27: Streudiagramm der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] zwischen 6 und 7 Stunden nach der Kreatininapplikation in Abhängigkeit von der GFR

Bei einigen Tieren wurde die letzte Blutprobe ≥ 7 Stunden nach der Kreatininapplikation entnommen. Der Zusammenhang zwischen der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] und der GFR in diesem Zeitraum ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

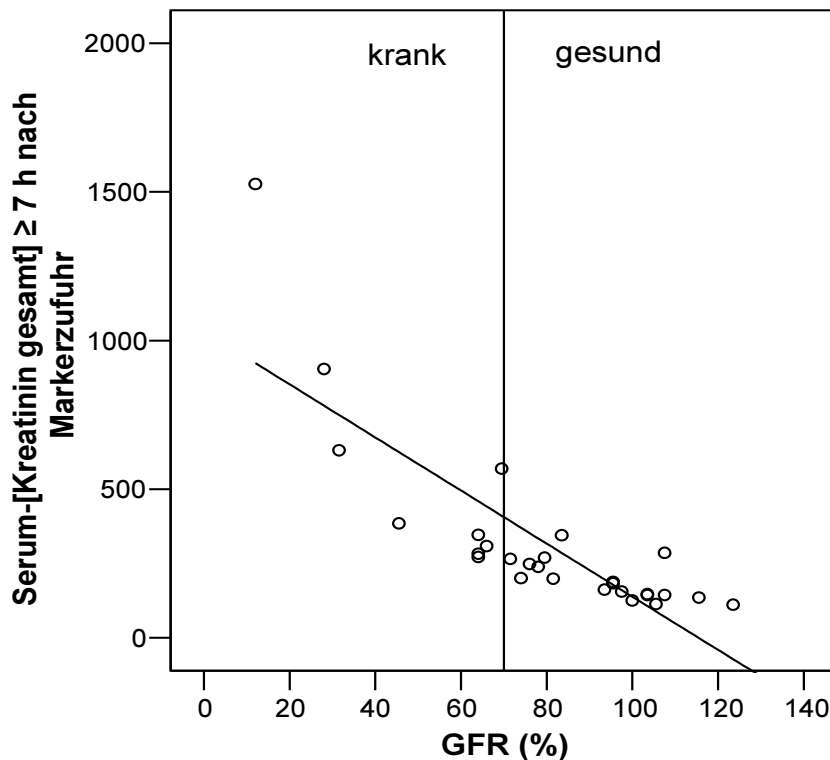


Abb. 28: Streudiagramm der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] ≥ 7 Stunden nach der Kreatininapplikation in Abhängigkeit von der GFR

Um die gezeigten Ergebnisse hinsichtlich ihrer diagnostischen Aussagekraft zu prüfen, erfolgte eine ROC - Analyse. Diese ist in den Abbildungen 29 und 30 für den Zeitraum 2 - 3 und 3 - 4 Stunden sowie in den Abbildungen 31 und 32 für den Zeitraum 6 - 7 und 7 - 7,5 Stunden nach der Markerapplikation dargestellt. Es sind jeweils die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] und die Serum-[Kreatinin_{exo}] vergleichend abgebildet. Dabei gilt:

$$\text{Serum-[Kreatinin}_{\text{gesamt}}] = \text{Serum-[Kreatinin}_{\text{endo}}] + \text{Serum-[Kreatinin}_{\text{exo}}] \quad (11)$$

Als Zustandsvariable wurde die GFR herangezogen und die Hunde in gesund (GFR > 70 %) und krank (GFR ≤ 70 %) eingeteilt. Über die diagnostische Sensitivität, Spezifität sowie die AUC der Testvariablen Serum-[Kreatinin_{gesamt}] bzw. Serum-[Kreatinin_{exo}] konnte geklärt werden, welcher Zeitraum der Blutprobenentnahme zur diagnostischen Erfassung der Zustandsvariable GFR der günstigste ist.

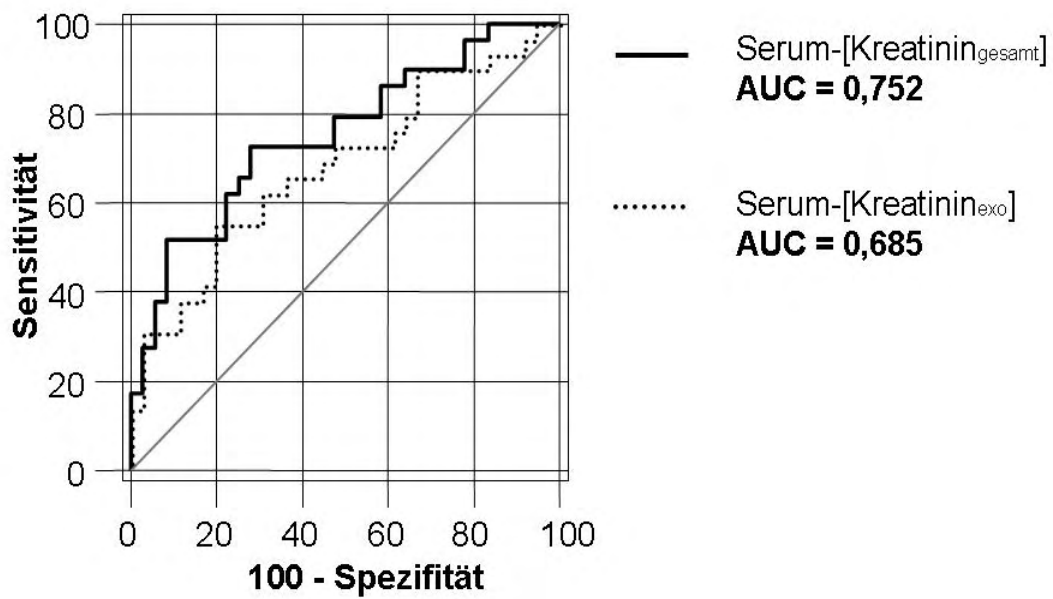


Abb. 29: Vergleich der ROC-Kurven für Serum-[Kreatinin_{gesamt}] und Serum-[Kreatinin_{exo}] im Zeitraum 2 - 3 Stunden nach der Kreatininapplikation

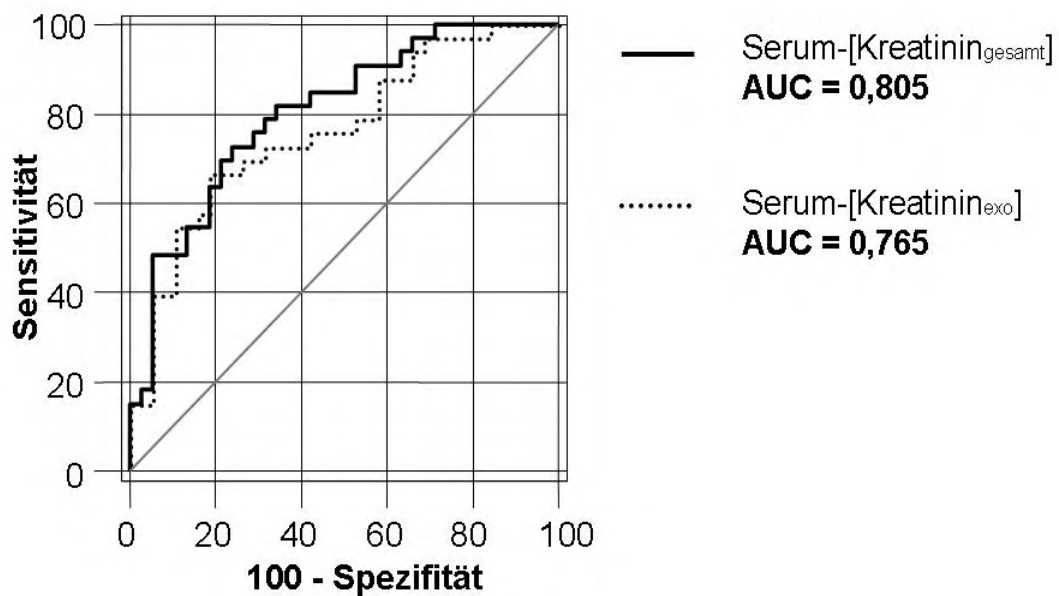


Abb. 30: Vergleich der ROC-Kurven für Serum-[Kreatinin_{gesamt}] und Serum-[Kreatinin_{exo}] im Zeitraum 3 - 4 Stunden nach der Kreatininapplikation

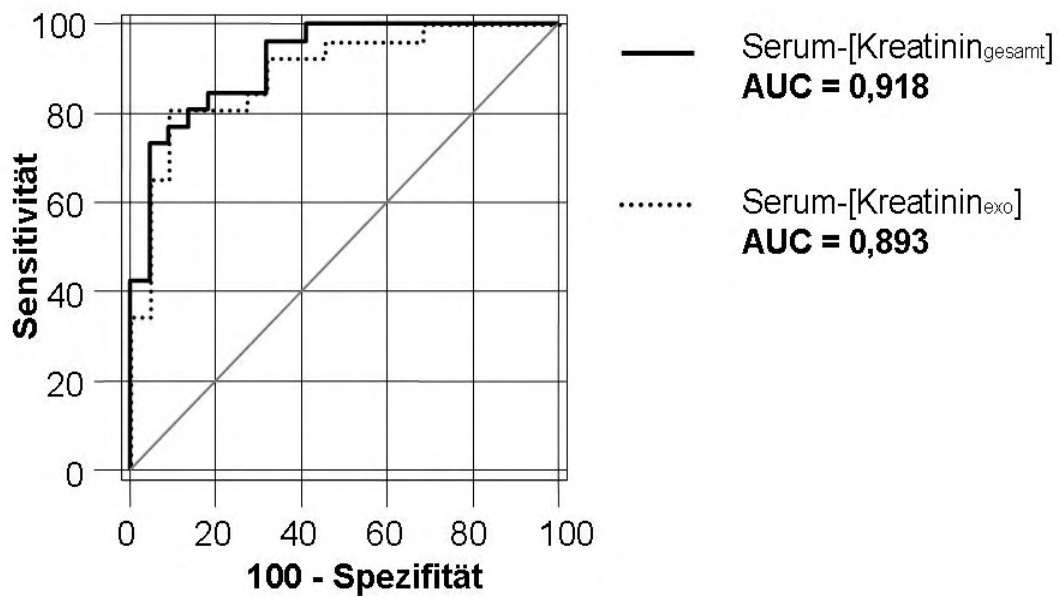


Abb. 31: Vergleich der ROC-Kurven für Serum-[Kreatinin_{gesamt}] und Serum-[Kreatinin_{exo}] im Zeitraum 6 - 7 Stunden nach der Kreatininapplikation

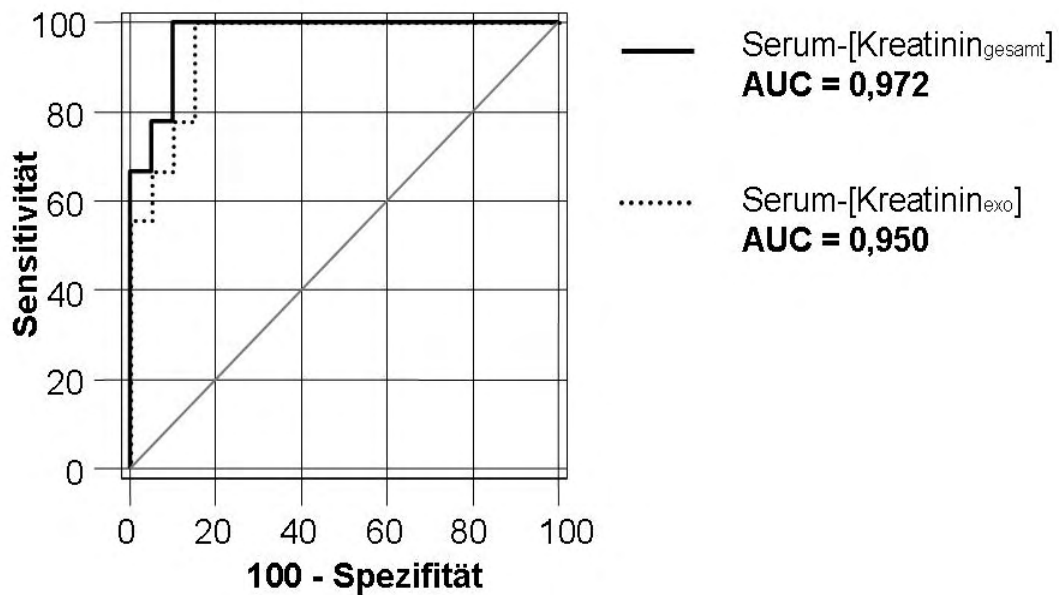


Abb. 32: Vergleich der ROC-Kurven für Serum-[Kreatinin_{gesamt}] und Serum-[Kreatinin_{exo}] im Zeitraum 7 - 7,5 Stunden nach der Kreatininapplikation

Bei allen dargestellten ROC-Kurven besitzt immer die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] eine größere AUC als die Serum-[Kreatinin_{exo}]. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Blutprobe vor Beginn der Kreatininapplikation für diese Auswertung nicht erforderlich ist.

Die mit 0,972 größte AUC und damit beste diagnostische Aussagekraft besitzt die ROC-Kurve der Serum-[Kreatinin_{gesamt}], wenn die Probenentnahme im Zeitraum 7 - 7,5 Stunden nach der Markerzufuhr erfolgt.

In der folgenden Abbildung sind die „nierengesunden“ und „nierenkranken“ Hunde vergleichend als Boxplots dargestellt. Es flossen in diese Grafik nur Hunde ein, bei denen eine Blutprobe im Zeitraum 7 - 7,5 h nach der Markerzufuhr entnommen wurde.

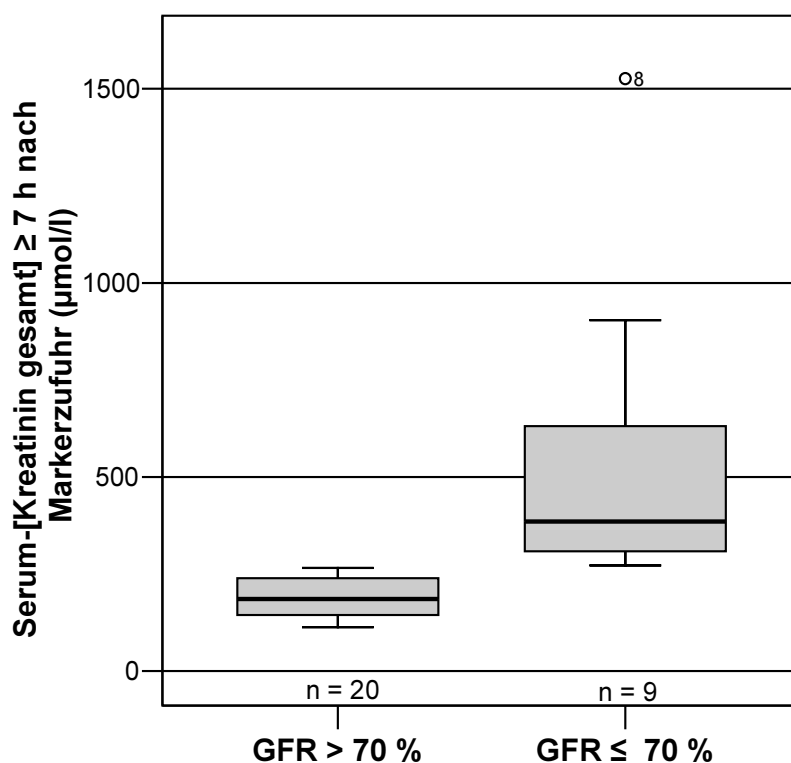


Abb. 33: Boxplots von „nierengesunden“ Hunden (linke Box) und „nierenkranken“ Hunden (rechte Box)

Aus der Abbildung 33 ist ersichtlich, dass zwischen der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] bei „nierengesunden“ und „nierenkranken“ Hunden ein deutlicher Unterschied besteht. Es existiert lediglich eine geringfügige Überschneidung der Extensionslinien von den Maximalwerten der „nierengesunden“ und den Minimalwerten der „nierenkranken“ Hunde.

Es galt nun zu untersuchen, bei welcher Serum-[Kreatinin_{gesamt}] die „nierengesunden“ von den „nierenkranken“ Hunden möglichst diagnostisch optimal unterschieden werden können. Hierzu wurde wiederum eine ROC-Analyse durchgeführt. Die GFR galt als Zustandsvariable.

Hunde mit einer GFR > 70 % wurden als „nierengesund“ und Hunde mit einer GFR ≤ 70 % als „nierenkrank“ angesehen. Die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] bildete die Testvariable. Über die ROC - Kurve wurden für jede Serum-[Kreatinin_{gesamt}] (= jeden Punkt der ROC - Kurve) die diagnostische Sensitivität und Spezifität bestimmt. Die Serum-[Kreatinin_{gesamt}], bei der sowohl Sensitivität als auch Spezifität die größten Werte besaßen, wurde als Grenzwert (Cut - off) zur Unterscheidung der Hunde festgelegt.

In der Tabelle 22 sind die Werte für die Sensitivität und Spezifität bei vier ausgewählten Serum-[Kreatinin_{gesamt}] aufgeführt. Bei den verschiedenen Werten der Testvariablen ändern sich die Sensitivität und gegenläufig auch die Spezifität. Die größten Werte besitzen Sensitivität und Spezifität bei einer Serum-[Kreatinin_{gesamt}] von 270 µmol/l (Tab. 21, fett umrahmter Bereich). Damit kann dieser Wert der Testvariablen als Grenzwert (Cut - off) festgelegt werden.

Tab. 22: Serum-[Kreatinin_{gesamt}], Sensitivität und Spezifität bei einer Blutprobenentnahme zwischen 7 - 7,5 h nach Markerapplikation (Einteilung der Hunde anhand der Zustandsvariable GFR in gesund (GFR > 70 %) und krank (GFR ≤ 70 %))

Testvariable: Serum-[Kreatinin_{gesamt}] 7-7,5 h nach Markerzufuhr (µmol/l)	Sensitivität (%) (MW, 95% KI)	Spezifität (%) (MW, 95%KI)
266	100 (66,2-100,0)	85 (62,1-96,6)
270	100 (66,2-100,0)	90 (68,3-98,5)
286	77,8 (40,1-96,5)	95 (75,1-99,2)
345	66,7 (30,1-92,1)	100 (83,0-100,0)

Wenn einem nüchternen Hund Kreatinin in einer Dosierung von 2 g/m² KOF intravenös oder subkutan verabreicht wurde, dann kann über eine Messung der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] im Zeitraum 7 - 7,5 h nach dieser Verabreichung eine Aussage darüber getroffen werden, ob der Hund „nierengesund“ (GFR > 70 %) oder „nierenkrank“ (GFR ≤ 70 %) ist. Eine perorale Gabe des Kreatinins ist ebenfalls möglich, sollte jedoch in einer Dosierung von 4 g/m² KOF erfolgen (Hartmann *et al.*, 2006).