

Der **Catalyst® SDMA Test** von IDEXX zur praxisinternen Messung der SDMA-Konzentration im Serum von Hunden und Katzen

Von Graham Bilbrough, Barbara Evert, Karen Hathaway, Gina Panagakos, Jane Robertson und Maha Yerramilli

Einführung

SDMA ist eine methylierte Form von Arginin, das in intrazellulären Proteinen in sämtlichen Zellen mit Nukleus bei Wirbeltieren vorkommt und über die Nieren ausgeschieden wird. SDMA korreliert bei Mensch¹, Hund^{2,3} und Katze⁴⁻⁶ eng mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR). SDMA weist eine höhere Sensitivität auf als Kreatinin (CREA) und steigt früher an. Während Kreatinin erst über den Referenzbereich hinausgeht, wenn die Nierenfunktion bereits bis zu 75 % abgenommen hat, wurde in Studien ein Anstieg von SDMA bei einem durchschnittlichen Rückgang der glomerulären Filtrationsrate (GFR) um 40 % sowie bereits ab 25 % nachgewiesen.^{2,3,5} SDMA steigt sowohl bei akuten oder aktiven Nierenschädigungen als auch bei chronischen Nierenerkrankungen, sodass Veterinärmediziner früher eingreifen und bessere Erfolge vorweisen können. Überdies hat die Körpermasse auf SDMA im Gegensatz zu Kreatinin keinen Einfluss.^{6,7} Aus diesen Gründen eignet sich der IDEXX SDMA™-Test gut zum routinemäßigen Einsatz in der klinischen Chemie.

Der Catalyst® SDMA Test ist ein neues Immunassay-System von IDEXX, mit dem die SDMA-Konzentration in Serum oder Lithiumheparinplasmaproben von Hunden und Katzen gemessen werden kann, ohne dass die Probe verdünnt werden muss. Es liefert über die Chemieanalysegeräte IDEXX Catalyst One® oder IDEXX Catalyst Dx® umgehend verlässliche und präzise Testergebnisse. Es verfügt über dieselben Referenzwerte (0–14 µg/dl), Interpretationsempfehlungen und Anzeigebereiche (0–100 µg/dl) wie der Referenzlabortest IDEXX SDMA™.

Die vier Ziele dieser Studie bestanden in der Auswertung der folgenden Punkte:

- Leistungsfähigkeit des neuen Tests anhand eines Methodenvergleichs mit einer Referenzmethode (Methodenvergleich).
- Präzision des Assays anhand von Kontrollflüssigkeiten (Präzision).
- Analytische Spezifität (analoge Spezifität).
- Auswirkungen von Hämolyse, Lipämie und Ikterus auf die angezeigte Konzentration (Störsubstanzen).

Materialien und Methoden

Die Daten wurden in Microsoft Office Excel® 2016* gebündelt, bevor sie zur statistischen Analyse nach JMP® 13.0.0[†] exportiert wurden, inkl. Add-in für den Methodenvergleich.[‡]

Methodenvergleich

Serumproben von 107 Hunden und 113 Katzen wurden gesammelt, die eine Mischung aus gesunden Tieren und Klinikpatienten darstellten. Alle Proben wurden einmal mit dem Catalyst® SDMA Test und zweimal mit einem analytischen Verfahren anhand von Flüssigchromatografie mit Massenspektrometriekopplung (LC-MS) analysiert.[§] Der Durchschnittswert der LC-MS-Ergebnisse wurde als Referenzmethode genommen und mit dem Ergebnis des Catalyst® SDMA Tests verglichen.

Eine lineare Regressionsanalyse nach Passing/Bablok wurde für jede Spezies vorgenommen. Die Korrelationskoeffizienten wurden wie folgt interpretiert: $r = 0,90-1,0$ als sehr hohe Korrelation; $0,70-0,89$ als hohe Korrelation; $0,50-0,69$ als mittlere Korrelation; $0,30-0,49$ als geringe Korrelation; und $0-0,29$ als sehr geringe oder nicht vorhandene Korrelation.[§]

Die Regressionsanalyse wurde auch auf statistische Hinweise auf systematische Fehler (konstante und/oder proportionale Verzerrung) untersucht. 95%-Konfidenzintervalle (KI) für einen Ordinatenabschnitt ohne Nullwert wurden als Hinweis auf konstante Verzerrung betrachtet. 95%-KI für eine Steigung ohne den Wert 1,0 wurden als Hinweis auf proportionale Verzerrung betrachtet.

Die auf die nächste ganze Zahl gerundeten Ergebnisse aus jeder Methode wurden an den folgenden Schwellenwerten ausgerichtet: $\leq 14 \mu\text{g/dl}$ (innerhalb des Referenzbereichs); $15-19 \mu\text{g/dl}$; $\geq 20 \mu\text{g/dl}$. Diese Einteilungen wurden anschließend für jede Spezies in einer Kontingenztafel verglichen.

Präzision

Die Präzision wurde nach den methodischen Leitlinien EP5-A des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ausgewertet.⁹ Zwei Kontrollflüssigkeiten (Flüssigkeit A und Flüssigkeit B) wurden mit dem Catalyst Dx® untersucht. Pro Spezies wurden an 10 Tagen jeden Morgen und jeden Nachmittag 4 Durchläufe gemacht, was insgesamt 80 Durchläufe pro Spezies ergab. Die Präzision insgesamt wurde nach den methodischen Leitlinien EP5-A des CLSI berechnet.

* Microsoft Office Excel® 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA.

† JMP® 13.0.0, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.

‡ Add-in für Methodenvergleich, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.

§ Die LC-MS-Methode wurde in einem Abstract an der AACC 2015 vorgestellt. Die LC-Abscheidung wurde mithilfe der C18-Säule XBridge™ mit Umkehrphase (RP) und einem Ionenpaarbildner erreicht. Der dreifach vierpolige Massenspektrometer API 4000™ (Applied Biosystems / MDS Sciex) wurde im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring) mit einer positiven Elektrospray-Schnittstelle betrieben. Der MRM-Übergang für SDMA wurde im folgenden Bereich beobachtet: m/z 203,2 172,1.¹⁰

Analoge Spezifität

Die Untersuchung auf Kreuzreaktionen wurde vorgenommen, indem drei unterschiedliche Kontrollmaterialien mit physiologisch maßgeblichen Konzentrationen von Arginin, asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) bzw. Monomethyl-L-Arginin (MMA) dotiert wurden. Eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurde als Kontrollsubstanz verwendet, um die Volumenänderung aufgrund der Additive zu kompensieren (im Folgenden als „Kontrollsubstanz“ bezeichnet).

Für jede Kontrollflüssigkeit gab es vier Aliquote (mit ADMA dotiert, mit MMA dotiert, mit Arginin dotiert sowie mit der Kontrollsubstanz), was insgesamt 12 Aliquote ergab, die jeweils sechsmal mit dem Catalyst® SDMA Test analysiert wurden, worauf ein Mittelwert berechnet wurde.

Die prozentuale Veränderung wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Veränderung in \%} = 100 \times \frac{\text{Mittlere „dotierte“ SDMA-Konzentration} - \text{mittlere SDMA-Konzentration mit „Kontrollsubstanz“}}{\text{Mittlere SDMA-Konzentration mit „Kontrollsubstanz“}}$$

Die prozentuale Veränderung wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Kreuzreaktion in \%} = 100 \times \frac{\text{Mittlere „dotierte“ SDMA-Konzentration} - \text{mittlere SDMA-Konzentration mit „Kontrollsubstanz“}}{\text{Additivkonzentration}}$$

Die mittlere SDMA-Konzentration für jedes „dotierte“ Aliquot wurde mit der mittleren SDMA-Konzentration der „Kontrollsubstanz“ auf statistisch signifikante Unterschiede verglichen (HSD-Verfahren nach Tukey/Kramer; $p < 0,05$).

Störsubstanzen

Interferenzen aufgrund des Vorhandenseins von Hämoglobin, Lipiden oder Bilirubin wurden gemäß den methodischen Leitlinien EP7-A2 des CLSI beurteilt.¹¹ Hierzu wurden Serumproben von Hunden, in denen keine Störsubstanzen erkennbar waren, gesammelt und kombiniert. Daraufhin wurden Aliquote der kombinierten Proben präpariert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Substanzen gemäß Tabelle 1 dotiert. Jedes Aliquot wurde in doppelter Ausfertigung und in zufälliger Reihenfolge mit acht verschiedenen Catalyst One® Geräten untersucht.

Tabelle 1. Vorbereitung von Aliquoten der kombinierten Proben zur Beurteilung häufiger Störsubstanzen.

Störfaktor	Dotierungsmaterial	Anzahl Stufen der Störsubstanz
Hämolyse	Lysierte Erythrozyten vom Hund zur Bildung von Hämoglobin	7
Lipämie	Intralipid 20 %	5
Ikterus	Ditaurobilirubin (DTB, ein synthetisches Bilirubinderivat)	7

Für alle Paare wurde ein HSD-Verfahren nach Tukey/Kramer ($p < 0,05$) mit der mittleren SDMA-Konzentration jedes Aliquots durchgeführt, um statistisch signifikante Unterschiede zu ermitteln.

Ergebnisse

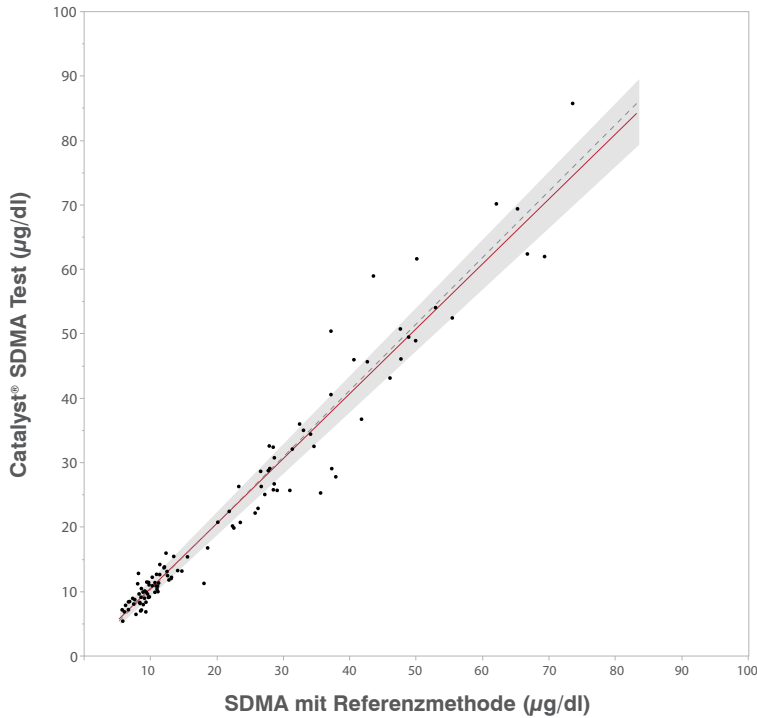
Methodenvergleich

Die Regressionskurven sind in den Abbildungen 1A (Hund) und 1B (Katze) dargestellt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefasst. Für den Catalyst® SDMA Test wurde eine hervorragende Korrelation mit der Referenzmethode nachgewiesen, wobei für keine Spezies ein Hinweis auf Verzerrungen vorlag. Für die Klassifizierung der Ergebnisse wurden starke Übereinstimmungen zwischen den beiden Methoden festgestellt.

Abbildung 1. Regression nach Passing/Bablok.

Die Regressionskurve ist blau dargestellt (mit 95%-KI), die Einheitsgerade als gestrichelte graue Linie.

A. Hund: $n = 107$; Korrelation (r) = 0,98; Steigung = 0,98; Schnittpunkt = 0,44 $\mu\text{g/dl}$



B. Katze: $n = 113$; Korrelation (r) = 0,94; Steigung = 1,00; Schnittpunkt = -0,95 $\mu\text{g/dl}$

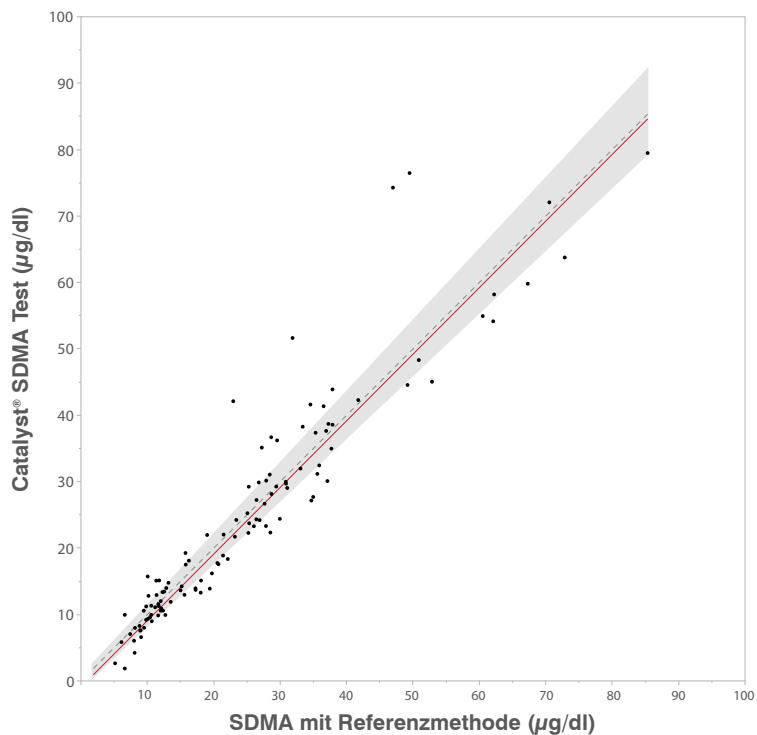


Tabelle 2. Regressionsanalyse nach Spezies.

	Hund	Katze
n	107	113
Korrelation (<i>r</i>)	0,98	0,94
Mittlere Differenz (Standardabweichung) in $\mu\text{g/dl}$	-0,28 (3,84)	-0,02 (5,69)
Schnittpunkt (95%-KI) in $\mu\text{g/dl}$	0,44 (-0,54 bis 0,99)	-0,95 (-2,18 bis 0,03)
Steigung (95%-KI)	0,98 (0,92 bis 1,02)	1,00 (0,94 bis 1,07)

Tabelle 3. Kontingenztabelle nach Spezies.

A. Hund: $n = 107$; Konkordanz insgesamt = 95 %

		Mittlere SDMA-Konzentration mit Referenzmethode		
		$\leq 14 \mu\text{g/dl}$	15–19 $\mu\text{g/dl}$	$\geq 20 \mu\text{g/dl}$
Ergebnis des Catalyst® SDMA Tests	$\leq 14 \mu\text{g/dl}$	49 %	3 %	0 %
	15–19 $\mu\text{g/dl}$	2 %	2 %	0 %
	$\geq 20 \mu\text{g/dl}$	0 %	0 %	44 %

Bei den abweichenden Proben betrug die mittlere absolute Differenz 2 $\mu\text{g/dl}$.

B. Katze: $n = 113$; Konkordanz insgesamt = 85 %

		Mittlere SDMA-Konzentration mit Referenzmethode		
		$\leq 14 \mu\text{g/dl}$	15–19 $\mu\text{g/dl}$	$\geq 20 \mu\text{g/dl}$
Ergebnis des Catalyst® SDMA Tests	$\leq 14 \mu\text{g/dl}$	31 %	6 %	0 %
	15–19 $\mu\text{g/dl}$	4 %	4 %	4 %
	$\geq 20 \mu\text{g/dl}$	0 %	1 %	50 %

Bei den abweichenden Proben betrug die mittlere absolute Differenz 3 $\mu\text{g/dl}$.

Präzision

Die Ergebnisse der Präzisionsanalyse sind in Tabelle 4 dargestellt. Die neue Methode weist einen Variationskoeffizienten (VarK) von insgesamt < 10 % auf. Dies stimmt mit dem Immunassay mit hohem Durchsatz überein, der beim externen IDEXX Labor für SDMA verwendet wird.[†]

Tabelle 4. Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Präzisionsstudie.

Kontroll-flüssigkeit	Spezies	Replikate	Mittlere SDMA-Konzentration (µg/dl)	Standard-abweichung (µg/dl)	VarK in %
Flüssigkeit A	Hund	80	15,50	0,96	6,2
	Katze	80	18,39	1,25	6,8
Flüssigkeit B	Hund	80	36,01	2,02	5,6
	Katze	80	44,99	2,54	5,6

Analoge Spezifität

Die Ergebnisse der Spezifitätsanalyse sind in Tabelle 5 dargestellt. Es wurde keine statistisch signifikante Änderung mit irgendeinem der dotierten Aliquote beobachtet.

Tabelle 5. Zusammenfassung der Studie zur analogen Spezifität. Additivkonzentration nach Dotierung: MMA 50 µg/dl; ADMA 50 µg/dl; Arginin 2.500 µg/dl.

Kontroll-material	SDMA-Konzentration in „Kontrollsubstanz“ (µg/dl)	Additiv	Änderung in %	Kreuzreaktion in %
1	13,90	MMA	0,91	0,25
		ADMA	6,76	1,88
		Arginin	2,82	0,02
2	28,41	MMA	-6,83	-5,90
		ADMA	-0,02	-0,02
		Arginin	1,36	0,02
3	43,14	MMA	1,92	1,02
		ADMA	0,36	0,19
		Arginin	-0,46	0,00

[†]Gemäß dem Abstract an der AACC 2015 lag die Präzision insgesamt bei ≤ 10 %.¹²

Störsubstanzen

Die Ergebnisse der Studie zu Störsubstanzen sind in Tabelle 6 dargestellt. Die hier untersuchten häufigen Störsubstanzen hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die ausgewiesenen SDMA-Konzentrationen.

Tabelle 6. Einfluss von Störsubstanzen.

Hämolyse		Lipämie		Ikterus	
Hämoglobinkonzentration (mg/dl)	Durchschnittliche SDMA-Konzentration (µg/dl)	Intralipidkonzentration (mg/dl)	Durchschnittliche SDMA-Konzentration (µg/dl)	DTB-Konzentration (mg/dl)	Durchschnittliche SDMA-Konzentration (µg/dl)
Nicht dotiert	11,02	Nicht dotiert	12,84	Nicht dotiert	13,77
31,25	11,95	250	12,88	1	13,50
62,5	12,09	500	13,02	3	13,29
125	11,41	750	12,95	10	13,54
250	12,03	1.000	13,28	20	13,25
375	12,63			30	13,61
500	11,53			40	12,99

Schlussfolgerungen

Der neue Catalyst® SDMA Test weist eine hervorragende Korrelation mit der Referenzmethode auf. Er liefert Veterinärmedizinern eine exakte, präzise, verlässliche und praktische Möglichkeit zur Diagnose und Überwachung von nierenkranken Hunden und Katzen mithilfe der praxisinternen Chemieanalysegeräte Catalyst Dx® und Catalyst One®.

Literaturnachweise

1. Kielstein, J. T., Salpeter, S. R., Bode-Boeger, S. M., Cooke, J. P., und Fliser, D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function – a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21 (9): 2446–2451.
2. Nabity, M. B., Lees, G. E., Boggess, M., et al. Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. *J Vet Intern Med*. 2015; 29 (4): 1036–1044.
3. Hall, J. A., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., Almes, K., und Jewell, D. E. Serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine in dogs with naturally occurring chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 2016; 30 (3): 794–802.
4. Braff, J., Obare, E., Yerramilli, M., Elliott, J., und Yerramilli, M. Relationship between serum symmetric dimethylarginine concentration and glomerular filtration rate in cats. *J Vet Intern Med*. 2014; 28 (6): 1699–1701.
5. Hall, J. A., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., und Jewell, D. E. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 2014; 28(6): 1676–1683.
6. Hall, J. A., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., Yu, S., und Jewell, D. E. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides. *Vet J*. 2014; 202 (3): 588–596.
7. Hall, J. A., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., Melendez, L. D., und Jewell, D. E. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *J Vet Intern Med*. 2015; 29 (3): 808–814.
8. Zady, M. F. Z-stats/basic statistics, Z-12: Correlation and simple least squares regression. Website von Westgard QC. www.westgard.com/lesson42.htm. Veröffentlicht im August 2000. Letzter Zugriff am 5. Dezember 2017.
9. CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI-Dokument EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
10. Patch, D., Obare, E., Prusevich, P., et al. High throughput immunoassay for kidney function biomarker symmetric dimethylarginine (SDMA) [AACC-Abstract B-047]. *Clin Chem*. 2015; 61 (10): S135.
11. CLSI. *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline – Second Edition*. CLSI-Dokument EP7-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
12. Prusevich, P., Patch, D., Obare, E., et al. Validation of a novel high throughput immunoassay for the quantitation of symmetric dimethylarginine (SDMA) [AACC-Abstract B-048]. *Clin Chem*. 2015; 61 (10): S135.