

Die Zuverlässigkeit von Point-of-Care-Assays zur Messung von equinem Serum Amyloid A

Julia Kiemle^{1,2}, Michael Röcken¹ und Natali Bauer³

¹ Klinik für Pferde – Chirurgie, Orthopädie – Justus-Liebig-Universität, Gießen

² Pferdepraxis Kühnle, Ilshofen

³ Klinik für Kleintiere, klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik des Fachbereichs Veterinärmedizin – Justus-Liebig-Universität, Gießen

Zusammenfassung: Serum Amyloid A (SAA) wird in der Pferdemedizin häufig zur Einschätzung des Gesundheitsstatus des Pferdes und zur Erfolgskontrolle einer begonnenen Therapie entzündlicher Erkrankungen gemessen. Zur Messung von equinem SAA stehen 3 patientennahe Point-of-Care-Assays (POCAs) verschiedener Firmen zur Verfügung, die hauptsächlich in der Pferdepraxis oder -klinik angewendet werden. In tiermedizinischen Großlaboren wird SAA mit einer anderen Methode, dem turbidimetrischen Immunoassay (TIA) gemessen. Dabei stehen ein humanmedizinischer TIA (TIA-Hum) und ein veterinärmedizinischer TIA (TIA-Vet) zur Verfügung. Bei SAA-Messungen kann es zu teilweise extremen Präzisionsschwankungen innerhalb derselben Testmethode sowie zwischen unterschiedlichen Testmethoden und zu Mittelwertsunterschieden (Bias) kommen. Validierungsstudien ergeben für einen POCA analytische Variationskoeffizienten (CV_a) von bis zu 45,5%. Die berichteten Mittelwertsunterschiede liegen zwischen -28,2% (TIA-Hum versus TIA-Vet) und 80,9% (POCA versus TIA-Vet). Die Linearität der POCAs ist als mäßig (Bestimmtheitsmaß [R²] = 0,87; SAA 0–562 µg/ml) bis hervorragend (R² = 0,99; SAA 0–1 000 µg/ml) beschrieben. Bei den TIAs-Hum und -Vet bewegt sich die Linearität für die untersuchten Messbereiche 0–1 593 µg/ml (TIA-Hum) beziehungsweise 0–6 160 µg/ml (TIA-Vet) zwischen R² = 0,95–0,99 bei Anwendung einer Vorverdünnung der Proben von 1:6. Bei der Messung hoher SAA-Werte > 3000 µg/ml kann bei einem POCA ein Hook-Effekt zur Wiedergabe falsch-niedriger SAA-Werte führen. Während eine Lipämie in falsch-hohen SAA-Werten resultieren kann, können Bilirubinämie und Hämolyse einen falsch-niedrigen SAA-Wert bedingen. Der Vergleich von SAA-Ergebnissen unterschiedlicher Testmethoden (POCA versus TIA), aus unterschiedlichem Probenmaterial (Serum versus Plasma versus Vollblut) sowie die Messung mit Testkartuschen unterschiedlicher Chargennummern ist nicht zu empfehlen. Insgesamt können Impräzision, Bias zwischen Methoden, Hook-Effekt und Interferenzen zu Fehlinterpretationen der gemessenen SAA-Werte führen und eine unangebrachte Änderung des Therapieplanes zur Folge haben. Das klinische Bild eines Pferdes muss stets mit dem ermittelten SAA-Wert korreliert werden. Bei offensichtlichen Abweichungen sind gegebenenfalls Verdünnungs- und Wiederholungsmessungen durchzuführen. Die den SAA-POCAs zugesprochene schnelle und unkomplizierte Einschätzung des Gesundheitsstatus eines Pferdes muss kritisch hinterfragt werden, da die Heranführung eines SAA-Resultats an einen möglichst „wahren“ SAA-Wert lediglich mit fundiertem Hintergrundwissen zur Interpretation der Ergebnisse möglich ist.

Schlüsselwörter: Pferd, Serum Amyloid A, Point-of-Care-Assay, Richtigkeit, Präzision

Reliability of patient-side point-of-care assays for the measurement of equine serum amyloid A

Summary: In equine veterinary medicine, serum amyloid A (SAA) is frequently measured to assess the health status of horses and to monitor therapy success for treatment of inflammatory diseases. To date, 3 different stall-side point-of-care assays (POCAs) are commercially available for equine SAA measurement. SAA-POCAs are mainly used in equine ambulatory practices or in the clinical setting. Clinical pathology laboratories mainly work with a different type of SAA assay, the so-called turbidimetric immunoassay (TIA) of which a human TIA (TIA-Hum) and a veterinary TIA (TIA-Vet) are available. Precision is extremely variable both within the same test method and between different test methods and a bias can occur when measuring equine SAA. Validation studies of a POCA show an analytical coefficient of variation (CV_a) of up to 45.5%. The reported biases vary between -28.8% (TIA-Hum versus TIA-Vet) and 80.9% (POCA versus TIA-Vet). Linearity of SAA-POCAs is fair (determination coefficient [R²] = 0.87; SAA 0–562 µg/ml) to excellent (R² = 0.99; SAA 0–1 000 µg/ml). Linearity of the TIAs TIA-Hum and TIA-Vet is very good (R² = 0.95) to excellent (R² = 0.99) when measuring SAA concentrations from 0–1 593 µg/ml (TIA-Hum) and from 0–6 160 µg/ml (TIA-Vet) and using a sample pre-dilution of 1:6. In one POCA, the Hook effect can lead to falsely low SAA concentrations when measuring high SAA concentrations > 3000 µg/ml. While lipemia might result in falsely high SAA measurements, bilirubinemia and hemolysis potentially cause falsely low SAA results. The comparison of SAA results between different test methods (POCA versus TIA), of varying sample material (serum versus plasma versus whole blood) and measurement with test cartridges of different lots is not recommended. Overall, imprecision, bias between methods, Hook effect, and interferences can lead to misinterpretation of the measured SAA values, thus potentially cause unjustified adjustments of an initiated treatment plan. The clinical appearance of a horse must always be correlated with the determined SAA value. If there are obvious deviations, dilutions and repeat measurements may have to be carried out. The quick and uncomplicated assessment of a horse's state of health, which is attributed to POCAs must be critically questioned as the approximation of an SAA result to an "as true as possible" SAA value is only possible with well-founded background knowledge for the interpretation of SAA results.

Keywords: equine, serum amyloid A, point-of-care-assay, accuracy, precision

Zitation: Kiemle J., Röcken M., Bauer N. (2023) Die Zuverlässigkeit von Point-of-Care-Assays zur Messung von equinem Serum Amyloid A. Pferdeheilkunde 39, 43–51; DOI 10.21836/PEM20230105

Korrespondenz: Dr. Julia Kiemle, Fachtierärztin für Pferde – Pferdepraxis Kühnle, Parkstraße 7, 74532 Ilshofen, Deutschland; jkiemle@pferdepraxis-kuehnle.com

Eingereicht: 6. Oktober 2022 | **Angenommen:** 10. November 2022

Einleitung

Serum Amyloid A (SAA) ist ein in der Pferdemedizin sehr häufig gemessenes Akute-Phase-Protein (APP) (Witkowska-Pilaszewicz et al. 2019). Für die SAA-Messung im Pferdepraxis- oder Klinikalltag stehen verschiedene patientennahe Point-of-Care Assays (POCAs) zur Verfügung (Schwartz et al. 2018, Stack et al. 2019, Karam et al. 2020, Kiemle et al. 2022), während in veterinärmedizinischen Großlaboren hauptsächlich turbidimetrische Immunoassays (TIAs) verwendet werden (Jacobsen et al. 2006a, Jacobsen et al. 2019). Den SAA-POCAs wird generell die schnelle und patientennahe Einschätzung des Gesundheitsstatus eines Pferdes (Schwartz et al. 2018, Karam et al. 2020) zugeschrieben. Verschiedene Validierungsstudien berichten jedoch von einer teilweise sehr hoher Impräzision und von ausgeprägten Mittelwertsunterschieden (Bias) der SAA-POCAs im Vergleich zu der jeweiligen Referenzmethode, was einen erheblichen Einfluss auf die Interpretation der ermittelten SAA-Werte hat (Schwartz et al. 2018, Kiemle et al. 2022).

Insgesamt können Fehler im gesamten Testprozess auftreten, wobei traditionell prä-analytische (bei der Probengewinnung), analytische (Funktionsstörung des Gerätes, Interferenzen beim Messprozess selbst) und post-analytische Fehler (bei der Befunderstellung) unterschieden werden (Hawkins 2012). Teilweise wird noch eine weitere Differenzierung in eine prä-prä-analytische Phase (Indikationsstellung für den Test, Wahl des Antikoagulans und Transport der Proben) und eine post-post-analytische Phase (korrekte Interpretation der Testergebnisse) vorgenommen (Hawkins 2012). Untersuchungen in Humanlaboren haben ergeben, dass die meisten Fehler in der prä-prä-analytischen (46–68%) und in der post-post-analytischen Phase (25–46%) auftreten, dagegen die wenigsten in der rein analytischen Phase (7–13%) (Plebani 2010). Da die POCAs sehr anwenderfreundlich und auch von ungeübten Untersuchern einfach durchzuführen sind (Karam et al. 2020), sind auch hier in der reinen analytischen Phase vergleichsweise wenig Fehler zu erwarten. Wichtig ist hier jedoch – ähnlich wie in der Humanmedizin – die Kenntnis von prä-prä-analytischen Faktoren wie eine korrekte Indikationsstellung für die SAA-Messung, patientenbedingte Faktoren wie der Einfluss von Stress, körperlicher Belastung, vorangegangener Impfung und Gravidität des Pferdes sowie die Wahl des Probenmaterials und Antikoagulans auf die Messresultate (Braun et al. 2015). Die Kenntnis der Testeigenschaften selbst wie Präzision, Linearität, Hook-Effekt sowie Mittelwertsunterschied (Bias) und Korrelationsanalyse im Vergleich zu einer Referenzmethode vervollständigen das Bild (Jensen und Kjelgaard-Hansen 2006, Flatland et al. 2013). Sie führen zusammen mit Kenntnissen über die biologische Variation des Messparameters und der von Präzision und biologischen Variation bestimmten kritischen Differenz, des sogenannten „Reference Change Value“ (RCV) zu einer korrekten Interpretation der Testresultate in der post-post-analytischen Testphase. Der RCV ist die Differenz von zwei Verlaufs-

untersuchungen eines Patienten, die als signifikant und somit als klinisch relevant betrachtet werden kann (Fraser 2009, Fraser 2011, Walz und Fierz 2015).

Da Fehler im gesamten Testprozess der SAA-Messung schwerwiegende medizinische Fehlentscheidungen nach sich ziehen können (Fiedler und Thiery 2004), ist das Ziel der vorliegenden Literaturübersicht, eine Interpretationshilfe für die mittels POCAs gemessenen SAA-Werte bei Pferden zu liefern. Hierbei sollen die Indikation und Bedeutung der Messung von SAA als APP beim Pferd und die bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen zu erwartende Höhe des SAA-Anstiegs vorgestellt werden. Weiterhin soll auf die derzeit auf dem Markt befindlichen POCAs, die zu ihrer Evaluation verwendeten Referenzmethoden und ihre Testeigenschaften eingegangen und die daraus resultierenden Einflüsse auf die Interpretation der Testergebnisse in der post-post-analytischen Phase diskutiert werden.

Indikation und Patienten-Einflüsse auf die SAA Messung beim Pferd

Die Messung von SAA hat in der Pferdemedizin vielseitige Indikationen. Als APP ist es beim gesunden Pferd nur in sehr geringen Konzentrationen ($< 20 \mu\text{g/ml}$) (Witkowska-Pilaszewicz et al. 2019) vorhanden, wobei es beim erkrankten Pferd zu einem sehr schnellen tausendfachen Konzentrationsanstieg kommen kann (Urieli-Shoval et al. 2000, Christensen et al. 2012, Jacobsen et al. 2019). Es wird von SAA-Konzentrationsanstiegen von $> 15000 \mu\text{g/ml}$ berichtet (Jacobsen et al. 2019, Kiemle et al. 2022). Dabei erreicht die SAA-Serumkonzentration innerhalb von 48 Stunden nach entzündlichem oder infektiösem Stimulus (Petersen et al. 2004, Jacobsen und Andersen 2007) Maximalwerte, die bei erfolgreicher Therapie innerhalb von 12 Stunden wieder absinken (Long und Nolen-Walston 2020). Aus diesem Grund gilt SAA als idealer Parameter, um gesunde von erkrankten Pferden mit ablaufenden Entzündungsreaktionen zu unterscheiden (Nolen-Walston 2015).

Zu einem SAA-Anstieg kommt es beim Pferd unter zahlreichen klinischen Bedingungen (Tab. 1), wobei der Anstieg des SAA-Wertes mit dem Ausmaß der vorhandenen Symptome korreliert (Hultén et al. 1999). Die höchsten SAA-Anstiege auf $> 3000 \mu\text{g/ml}$ werden dabei im Zusammenhang mit viralen und bakteriellen Infektionen gesehen (Viner et al. 2017). Neben chirurgischen Traumata (Pepys et al. 1989), Geburten (Coutinho da Silva et al. 2013) und Kastrationen (Jacobsen et al. 2005) führen auch Langstreckentransporte (Endo et al. 2015), Distanzritte (Cywinska et al. 2010) und Impfungen (Andersen et al. 2012) zu einem SAA-Anstieg. Der SAA-Trend wird außerdem zur Erfolgskontrolle einer begonnenen Therapie verwendet. Dies ist hilfreich, um beispielsweise die Wirksamkeit zur Therapie ausgewählter Antibiotika zu kontrollieren (Witkowska-Pilaszewicz et al. 2019).

Tab. 1 Übersicht über Krankheitsbilder und Konditionen des Pferdes, die zu einem SAA-Konzentrationsanstieg führen sowie die assoziierten SAA-Konzentrationsspannweiten und Mediane, modifiziert nach Kiemle, 2021. | Overview of equine diseases and clinical conditions leading to an SAA increase with the associated concentration ranges and medians, modified from Kiemle, 2021.

	Konzentrationsspannweite	Median	Quellen
Pferde ohne Entzündungen	1,8–14,5 µg/ml	5,6 µg/ml	Hooijberg et al. 2014
Systemische Entzündungen	688–4000 µg/ml	1583 µg/ml	Hooijberg et al. 2014
Lokale Entzündungen	37–1609 µg/ml	343 µg/ml	Hooijberg et al. 2014
EIV-Infektionen	0→3000 µg/ml	731 µg/ml	Viner et al. 2017
EHV-4-Infektionen	0→3000 µg/ml	1173 µg/ml	Viner et al. 2017
S. equi subsp. equi-Infektionen	0→3000 µg/ml	1953 µg/ml	Viner et al. 2017
R. equi-Pneumonie des Fohlens	7–781 µg/ml	212 µg/ml	Giguère et al. 2016
Andere bakterielle Pneumonien des Fohlens außer R.equi	0–604 µg/ml	27 µg/ml	Giguère et al. 2016
Fohlen mit lokalen Infektionen (z.B. Omphalitis)	k.A.	195 µg/ml	Stoneham et al. 2001
Fohlen mit Septikämie	k.A.	280 µg/ml	Stoneham et al. 2001
Pferde ohne intraabdominale Schmerzen	k.A.	1 µg/ml* (gemessen in Peritonealflüssigkeit und Serum)	Pihl et al. 2013
Intraabdominale Schmerzen	k.A.	249 µg/ml* (gemessen in Serum) 97 µg/ml* (gemessen in Serum)	Pihl et al. 2013
Koliken entzündlichen Ursprungs (Enteritis, Colitis, Peritonitis)	3–500 µg/ml	65,5 µg/ml	Vandenplas et al. 2005
Idiopathische Peritonitis	90–2754 µg/ml	799 µg/ml*	Odelros et al. 2019
Chirurgische, nicht-entzündliche Koliken; strangulierende Obstruktionen	0,3–58,6 µg/ml	4,8 µg/ml	Vandenplas et al. 2005
Pferde ohne Komplikationen post-Kolik-OP	346,4–1078,7 µg/ml	454,5 µg/ml	De Cozar et al. 2019
Pferde mit Komplikationen post-Kolik-OP	402,4–1819,5 µg/ml	949,8 µg/ml	De Cozar et al. 2019
Equine Grass Sickness	k.A.	50 µg/ml	Copas et al. 2013
Kleinere operative Eingriffe	100–400 µg/ml	k.A.	Pepys et al. 1989
Kastration	400–600 µg/ml	k.A.	Jacobsen et al. 2005
Stuten 36 Stunden post partum	0–1615 µg/ml	189 µg/ml	Coutinho da Silva et al. 2013
Experimentell induzierte Plazentitis	274,2–4385,9 µg/ml	k.A.	Coutinho da Silva et al. 2013
Pyometra	11,36–22,90 µg/ml	19,36 µg/ml	El-Bahr und El-Deeb, 2016
Synovia gesunder Pferde	k.A.	< 5 µg/ml	Jacobsen et al. 2006b Nunokawa et al. 1993 Sanchez-Teran et al. 2012
Septische Gelenkerkrankungen	0–368,9 µg/ml (gemessen in Synovia) 0–1421,8 µg/ml (gemessen in Plasma)	39,2 µg/ml (gemessen in Synovia) 275,5 µg/ml (gemessen in Plasma)	Robinson et al. 2017
Experimentell erzeugte aseptische Gelenkerkrankungen	0–0 µg/ml (gemessen in Synovia) 0–0 µg/ml (gemessen in Serum)	0 µg/ml (gemessen in Synovia) 0 µg/ml (gemessen in Serum)	Robinson et al. 2017
Experimentell erzeugte septische Gelenkerkrankungen	60–555 µg/ml (gemessen in Synovia) 217–1434 µg/ml (gemessen in Serum)	135 µg/ml (gemessen in Synovia) 663 µg/ml (gemessen in Serum)	Robinson et al. 2017
Transport	k.A.	160 ± 348,5 µg/ml†	Endo et al. 2015
Impfung	~ 30–175 µg/ml	k.A.	Andersen et al. 2012
Distanzritt	k.A.	13,8 ± 1,3 µg/ml†	Cywinska et al. 2010

EHV – Equines Herpesvirus / EIV – Equines Influenzavirus/k.A. – keine Angaben / R. equi – Rhodococcus equi / S. equi subsp. equi – Streptococcus equi subspecies equi / * Angabe von Mittelwerten / † Angabe von Mittelwerten ± Standardabweichung

POCAs zur Messung von equinem SAA

Nach aktuellem Stand der Literatur sind 3 POCAs zur patientennahen Messung von equinem SAA auf dem amerikanischen (Karam et al. 2020) und europäischen Markt erhältlich (Schwartz et al. 2018, Stack et al. 2019, Karam et al. 2020, Kiemle et al. 2022). Hierbei handelt es sich um die POCAs der Firmen 1) StableLab, in Deutschland vertrieben über Zoetis Deutschland GmbH, Berlin (StableLab EQ-1 Handheld Reader und StableLab Testkartuschen, nachfolgend POCA-1 genannt) (Schwartz et al. 2018, Kiemle 2021, Kiemle et al. 2022), 2) Veterinary Medical Research and Development Inc., USA (VMRD-SAA, nachfolgend POCA-2 genannt) (Karam et al. 2020) und 3) Accuplex Diagnostics Ltd, Maynoth University, Irland (EquiCheck™ -SAA, nachfolgend POCA-3 genannt) (Stack et al. 2019). Diese POCAs werden regelmäßig zur schnellen Messung von equinem SAA im Praxis- oder Klinikalltag angewendet (Schwartz et al. 2018, Stack et al. 2019, Kiemle et al. 2022). Sie sind einfach anzuwenden und liefern Ergebnisse innerhalb weniger Minuten (Kiemle 2021), was eine schnelle Überprüfung von Gesundheitsstatus und Therapieerfolg ermöglichen soll.

Referenzmethoden zur Messung von equinem SAA

Grundlage für die Messung von equinem SAA ist die Kreuzreaktivität von anti-Mensch-SAA-Antikörpern mit equinem SAA (Jacobsen et al. 2006a, Jacobsen et al. 2019). Alle zur Verfügung stehenden SAA-Assays zur Messung von equinem SAA verwenden heterologe anti-Mensch-SAA-Antikörper (Jacobsen et al. 2006a, Schwartz et al. 2018, Jacobsen et al. 2019, Stack et al. 2019, Karam et al. 2020, Kiemle et al. 2022), da die Purifizierung von equinem SAA bisher nicht gelungen ist (Karam et al. 2020). Während POCAs vor allem in Pferdepraxen und -kLINIKen Anwendung finden, werden in tiermedizinischen Großlaboren TIAs zur Messung von Pferde-SAA verwendet (Jacobsen et al. 2006a, Jacobsen et al. 2019). Ein humanmedizinischer TIA (LZ-SAA, Eiken Chemical Co, Ltd, Tokyo, Japan, TIA-Hum genannt) wurde als zuverlässig bei der Messung von equinem SAA befunden (Jacobsen et al. 2006a). Der Nachteil des TIA-Hum bei der Messung von equinem SAA ist, dass dieser TIA auf der Grundlage monoklonaler sowie polyklonaler anti-Mensch-SAA-Antikörper beruht, was ein hohes Risiko für Messwertunterschiede zwischen einzelnen Testchargen birgt (Jacobsen et al. 2006a, Jacobsen

Tab. 2 Übersicht über die Intra- und Inter-Assay Präzision zweier Point-of-Care-Assays im Vergleich zu zwei turbidimetrischen Immunoassays innerhalb verschiedener SAA-Konzentrationsstufen, modifiziert nach Kiemle 2021 und Kiemle et al. 2022. | Overview of the intra- and inter-assay precision of two point-of-care assays compared to two turbidimetric immunoassays within different SAA concentration levels, modified from Kiemle 2021 and Kiemle et al. 2022.

Gerät	Intra-Assay-Präzision			Inter-Assay-Präzision			
	SAA KB	SAA [$\mu\text{g/ml}$]	CV _a [%]	SAA [$\mu\text{g/ml}$]	CV _a [%]	Studie	
POCA-1	SAA _{Low}	102 ± 33	16,1	83,5 ± 28,5	22,4	Kiemle et al. 2022	
	SAA _{Med}	784,5 ± 95,5	7,6	248 ± 72	19,8		
	SAA _{High}	1772,5 ± 647,5	30,0	1926 ± 871	35,8		
	SAA _{Low}	63,9 ± 9,3	14,5	55,9 ± 8,5	15,0	Schwartz et al. 2018	
	SAA _{Med}	115,8 ± 20,6	18,0	140,1 ± 19,0	14,0		
	SAA _{High}	782,3 ± 103,9	13,0	1372,4 ± 624,9	45,5		
POCA-2	SAA _{Low}	113,8 ± 8,6	7,8	95,3 ± 11,0	12,0	Karam et al. 2020	
	SAA _{Med}	684,1 ± 64,9	9,8	668,9 ± 62,3	9,7		
	SAA _{High}	1416,8 ± 182,2	13,3	1437,3 ± 139,4	10,0		
		2601,7 ± 215,3	8,6	2710 ± 149,1	5,7		
	SAA _{Low}	35,2 ± 2,5	4,8	77,7 ± 11,6	8,8		Kiemle et al. 2022
	SAA _{Med}	330,1 ± 15,3	3,8	236,3 ± 10,8	3,1		
SAA _{High}	1068 ± 26	1,6	2945 ± 1535	40,2			
TIA-Hum	SAA _{Low}	0,67 ± 0,16	24,4	0,48 ± 0,16	33,2	Jacobsen et al. 2006a	
	SAA _{Med}	55,48 ± 0,89	1,6	60,85 ± 2,78	4,6		
	SAA _{High}	771 ± 16,13	2,1	773,80 ± 50,48	6,5		
	SAA _{Low}	94,2 ± 5,9	3,3	42,2 ± 3,9	4,9	Kiemle et al. 2022	
	SAA _{Med}	560 ± 18,5	2,5	137,3 ± 18,9	8,3		
	SAA _{High}	857 ± 44	3,5	1272,4 ± 202,1	11,6		
TIA-Vet	SAA _{Low}	124,7 ± 3,8	3,0	113,4 ± 7,7	6,8	Jacobsen et al. 2019	
	SAA _{Med}	805,3 ± 41,9	5,2	842,0 ± 63,6	7,6		
	SAA _{High}	4443 ± 161,3	3,6	4646 ± 445,7	9,6		

CV_a, welche die Qualitätsanforderungen an humanes SAA von 12,5% überschreiten, sind fett gedruckt. | CV_a exceeding quality requirements for human SAA of 12.5% are printed in bold letters.

CV_a – analytischer Variationskoeffizient / KB – Konzentrationsbereich / POCA – Point-of-Care-Assay

POCA-1 – Point-of-Care-Assay-1, Firma früher: StableLab (Sligo, Irland), jetzt Zoetis (Berlin, Deutschland)

POCA-2 – Point-of-Care-Assay-2, Firma Veterinary Medical Research and Development (Pullman, USA)

SAA – Serum Amyloid A / SAA_{Low} – Gruppe niedriger SAA-Werte / SAA_{Med} – Gruppe mittlerer SAA-Werte / SAA_{High} – Gruppe hoher SAA-Werte

TIA-Hum – humanmedizinischer turbidimetrischer Immunoassay, Firma Eiken Chemical (Tokyo, Japan)

TIA-Vet – veterinärmedizinischer turbidimetrischer Immunoassay, Firma Eiken Chemical (Tokyo, Japan)

et al. 2019). Der TIA-Hum war bis Juni 2022 auf dem Markt und wurde durch einen Nachfolgetest (RUO-SAA, Eiken Chemical Co, Ltd, Tokyo, Japan) abgelöst, für den derzeit noch keine publizierten Daten für die Veterinärmedizin vorliegen. Seit 2020 ist ein TIA (VET-SAA Test, Eiken Chemical Co, Ltd, Tokyo, Japan, nachfolgend TIA-Vet genannt) verfügbar, der für die Messung hoher, vor allem in der Pferdemedizin vorkommender SAA-Werte ausgelegt ist. Grundlage hierfür ist die ausschließliche Verwendung monoklonaler anti-Mensch-SAA-Antikörper zur Messung von Pferde-SAA (Jacobsen et al. 2019).

Testeigenschaften der POCAs und ihre Interpretation

Präzision

Die Präzision eines Gerätes oder Tests ist neben den Eigenschaften der Methode selbst auch vom Messbereich abhängig. Daher erfolgt die Bestimmung der analytischen (Intra- und Inter-Assay-) Variationskoeffizienten (CV_a) innerhalb verschiedener SAA-Konzentrationsbereiche (Flatland et al. 2010). Intra-Assay- CV_a werden nach wiederholter Messung derselben SAA-Probe am selben Tag berechnet, während Inter-Assay- CV_a durch die Messung derselben SAA-Probe an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen kalkuliert werden (Flatland et al. 2010). Tabelle 2 zeigt die CV_a der Geräte POCA-1, POCA-2, TIA-Hum und TIA-Vet, die in verschiedenen Studien und für verschiedene SAA-Konzentrationsbereiche ermittelt wurden (Jacobsen et al. 2006a, Schwartz et al. 2018, Jacobsen et al. 2019, Karam et al. 2020, Kiemle et al. 2022). Vor allem der POCA-1 zeigt teilweise erhebliche Abweichungen von den Qualitätsanforderungen (Schwartz et al. 2018, Kiemle et al. 2022) an den CV_a für humanmedizinische SAA-Assays, der unter 12,5% liegen soll (Westgard et al. 1974). Besonders bei der Messung hoher SAA-Konzentrationen ist beim POCA-1 eine hohe Impräzision nachweisbar mit CV_a von 35,8% (Kiemle et al. 2022) beziehungsweise 45,5% (Schwartz et al. 2018). Im Gegensatz hierzu liegen die CV_a der Assays POCA-2, TIA-Hum und TIA-Vet größtenteils < 12,5% (Karam et al. 2020, Jacobsen et al. 2006a, Jacobsen et al. 2019, Kiemle et al. 2022). Praktisch dargestellt bedeutet dies: Wenn bei einem Pferd ein SAA-Wert von 1000 $\mu\text{g/ml}$ mit einer Methode deren CV_a bei 10% liegt gemessen wird, kann der „wahre“ SAA-Wert zwischen 900 $\mu\text{g/ml}$ und 1100 $\mu\text{g/ml}$ liegen. Der SAA-Assay kann somit nicht zwischen diesen Werten unterscheiden. Liegt der CV_a eines Assays bei 40%, kann der Test nicht zwischen einem SAA-Wert von 600 $\mu\text{g/ml}$ und 1400 $\mu\text{g/ml}$ differenzieren.

Biologische Variation und Reference Change Value

Betrachtet man Verlaufsuntersuchungen, werden diese neben der analytischen Variation (CV_a) auch durch die intra-individuelle, biologische Variation (CV_i) beeinflusst (Jensen und Kjølgaard-Hansen 2010). Die Frage, welche Differenz zwischen zwei Messwerten eines Patienten bei einer Verlaufsuntersuchung als klinisch relevant und somit als „echter“ Unterschied beurteilt werden kann, soll der RCV (oder auch kritische Differenz im Deutschen) beantworten, in dessen Berechnung der kombinierte Einfluss von CV_a und CV_i einfließt (Boulat et

al. 2011, Walz und Fierz 2015). Erst wenn der prozentuale Unterschied zwischen zwei Messwerten einer Verlaufsuntersuchung den RCV überschreitet, liegt eine „echte“ Differenz zwischen zwei Ergebnissen einer Verlaufsuntersuchung vor (Walz und Fierz 2015). Für Pferde ist der CV_i nach aktuellem Stand der Literatur nicht bekannt (Jensen und Kjølgaard-Hansen 2010). Legt man aber den für den Menschen bekannten CV_i von 25% (D'Eril et al. 2001) für die Berechnung des RCV zugrunde, bedeutet dies, dass bei einem CV_a von 10% und einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ der RCV bei 75% liegt. Bei einem Pferd, bei dem an Tag 1 ein SAA-Wert von 1000 $\mu\text{g/ml}$ gemessen wird, kann erst ein SAA-Anstieg von > 75% (das heißt auf einen Wert > 1750 $\mu\text{g/ml}$) als „echter“ SAA-Anstieg erkannt und interpretiert werden. Ist der CV_a dagegen mit 40% sehr hoch, dann liegt der RCV bei 131%. Dies bedeutet, dass erst ein SAA-Anstieg von > 1310 $\mu\text{g/ml}$ (das heißt von 1000 $\mu\text{g/ml}$ auf 2310 $\mu\text{g/ml}$) als „echte“ Differenz erkannt werden kann. Damit hat ein Test mit einer derart hohen Impräzision nicht das Potenzial, kleinere Veränderungen zu erkennen und ist somit für Verlaufsuntersuchungen auch nicht zu empfehlen.

Linearität und Hook-Effekt

Der POCA-1 hat im SAA-Konzentrationsbereich 0–10312 $\mu\text{g/ml}$ eine gute Linearität (Bestimmtheitsmaß $[R^2] = 0,92$) und eine mäßige Linearität bei SAA-Werten von 0–562 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0,87$) (Kiemle 2021, Kiemle et al. 2022). Eine andere Studie zeigt eine hervorragende Linearität des POCA-1 bei SAA-Werten < 1000 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0,99$), wobei der POCA-1 SAA-Werte > 3000 $\mu\text{g/ml}$ im Vergleich zum TIA-Hum überschätzt (Schwartz et al. 2018). Der POCA-2 hat eine sehr gute Linearität bei SAA-Werten bis zu 3000 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0,98$) (Karam et al. 2020) (Tab. 3). Wie für den POCA-1 beschrieben, können bei der Messung hoher SAA-Werte die Verdünnungsprotokolle der POCA-Herstellerfirmen hilfreich sein, um lineare Ergebnisse zu erhalten (Kiemle et al. 2022). Für beide TIAs werden hervorragende Linearitäten bei der SAA-Messung beschrieben, wenn eine automatische Vorverdünnung der Proben von 1:6 erfolgt. Dabei zeigen der TIA-Vet bei einer Messung von SAA-Werten von 0–969 $\mu\text{g/ml}$ und der TIA-Hum bei der Messung von SAA-Werten zwischen 0–1593 $\mu\text{g/ml}$ die niedrigste aber immer noch sehr gute Linearität ($R^2 = 0,95$) (Kiemle et al. 2022). Der TIA-Hum hat hervorragende Linearitäten bei der Messung von SAA-Werten von 0–198 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0,99$) (Kiemle et al. 2022) beziehungsweise bei SAA-Werten < 800 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0,98$) (Jacobsen et al. 2006a). Auch der TIA-Vet zeigt eine hervorragende Linearität ($R^2 = 0,99$), wenn SAA-Werte von 1–115 $\mu\text{g/ml}$ (Kiemle et al. 2022) beziehungsweise von 0–3000 $\mu\text{g/ml}$ und von 0–6160 $\mu\text{g/ml}$ (Jacobsen et al. 2019) gemessen werden (Tab. 3). Im Messbereich zwischen 3000 $\mu\text{g/ml}$ und 6000 $\mu\text{g/ml}$ ist beim TIA-Vet eine geringgradige Überschätzung der SAA-Werte festzustellen (Jacobsen et al. 2019).

Bei TIAs und POCAs kann es bei der Messung sehr hoher SAA-Werte zu dem sogenannten Hook-Effekt kommen (Schwartz et al. 2018, Kiemle et al. 2022). Dabei werden falsch-niedrige SAA-Konzentrationen gemessen, wenn eigentlich sehr hohe SAA-Werte vorliegen, weil alle Bindungsstellen des zur Messung verwendeten Antikörpers durch den zu messenden Analyten be-

legt sind (Rey et al. 2017). Während das Phänomen des Hook-Effekts in Großlaboren hinreichend bekannt ist, muss es auch bei der Anwendung der POCAs berücksichtigt werden. Für den POCA-1 wird beispielsweise bei SAA-Werten von $> 3000 \mu\text{g/ml}$ über das Vorkommen eines Hook-Effekts berichtet (Schwartz et al. 2018, Kiemle et al. 2022). Das Nicht-Erkennen eines Hook-Effektes birgt potenziell eine „Gefahr“ für den Patienten, da gegebenenfalls falsche Schlüsse gezogen werden. So könnte zum Beispiel ein scheinbares Absinken der SAA-Resultate bei einem kritisch kranken Pferd fälschlicherweise als „Verbesserung“ des klinischen Zustandes interpretiert werden, was möglicherweise Fehlentscheidungen bezüglich der weiteren Therapie und Prognose zur Folge hat (Kiemle 2021). Praktisch lässt sich diese Situation folgendermaßen darstellen: Wenn bei einem Pferd, welches Fieber, Apathie und andere Symptome einer schweren systemischen Entzündungsreaktion zeigt (Moore und Vandenas 2014), ein inadäquat niedriger SAA-Wert von $1000 \mu\text{g/ml}$ gemessen wird, der nicht zum klinischen Zustand passt, liegt hier vermutlich ein Hook-Effekt vor.

Tabelle 1 stellt mehrere Krankheitsbilder beim Pferd dar, die zu einer SAA-Konzentration von $> 3000 \mu\text{g/ml}$ führen können.

Tab. 3 Die Linearität von Point-of-Care Assays und turbidimetrischen Immunoassays bei verschiedenen Serum Amyloid A-Konzentrationen. | *Linearity of point-of-care assays and turbidimetric immunoassays at different serum amyloid A concentrations.*

Test	Getesteter SAA-Konzentrationsbereich [$\mu\text{g/ml}$]	Linearität (R^2)	Studie
POCA-1	0–562	0,87	Kiemle 2021 Kiemle et al. 2022
	0–1000	0,99	Schwartz et al. 2018
	0–10312	0,92	Kiemle 2021 Kiemle et al. 2022
POCA-2	0–3000	0,98	Karam et al. 2020
POCA-3	n.d.	n.d.	-
TIA-Hum	0–198	0,99	Kiemle 2021 Kiemle et al. 2022
	< 800	0,98	Jacobsen et al. 2006a
	0–1593	0,95	Kiemle 2021 Kiemle et al. 2022
TIA-Vet	1–115	0,99	Kiemle 2021 Kiemle et al. 2022
	0–969	0,95	Kiemle 2021 Kiemle et al. 2022
	0–3000	0,99	Jacobsen et al. 2019
	0–6160	0,99	Jacobsen et al. 2019

n.d. – nicht durchgeführt

POCA-1 – Point-of-Care-Assay-1, Firma früher: StableLab (Sligo, Irland), jetzt Zoetis (Berlin, Deutschland)

POCA-2 – Point-of-Care-Assay-2, Firma Veterinary Medical Research and Development (Pullman, USA)

POCA-3 – Point-of-Care-Assay-3, Firma Accuplex Diagnostics, Kildare, Irland

R^2 – Bestimmtheitsmaß

SAA – Serum Amyloid A

TIA-Hum – humanmedizinischer turbidimetrischer Immunoassay, Firma Eiken Chemical (Tokyo, Japan)

TIA-Vet – veterinärmedizinischer turbidimetrischer Immunoassay, Firma Eiken Chemical (Tokyo, Japan)

Dementsprechend ist bei vielen Erkrankungen des Pferdes ein Hook-Effekt potenziell zu erwarten, zumindest für die Messung mittels POCA-1, für den das Auftreten dieses Phänomens bei SAA-Werten $> 3000 \mu\text{g/ml}$ beschrieben ist (Schwartz et al. 2018, Kiemle 2021, Kiemle et al. 2022). In den Validierungsstudien der POCA-2 und -3 (Karam et al. 2020, Stack et al. 2019) wurden die jeweiligen Assays nicht auf das Vorhandensein eines Hook-Effekts untersucht. Ist ein Hook-Effekt bei einem Test häufig zu erwarten und kann man sich dementsprechend lediglich auf den klinischen Zustand des Patienten verlassen, ist die Hilfestellung bei der Entscheidungsfindung mittels SAA-Testergebnis sowie die Anwendung eines POCA fraglich. Dem bekannten Hook-Effekt des POCA-1 kann zumindest teilweise durch die Anwendung der herstellereigenen Verdünnungsprotokolle für SAA-Werte $> 3000 \mu\text{g/ml}$ entgangen werden (Kiemle et al. 2022). Es tritt jedoch keine entsprechende Warnmeldung auf, so dass bei einer deutlichen Diskrepanz zwischen der Störung des Allgemeinbefindens des Pferdes und dem SAA-Ergebnis, d.h. ein hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden bei gleichzeitig niedrigem SAA-Messwert, an einen Hook-Effekt gedacht und eine Nach-Messung nach Anwendung des Verdünnungsprotokolls durchgeführt werden sollte.

Korrelation und Mittelwertunterschied der Methoden

In der Literatur ist eine hervorragende Korrelation ($R^2 = 0,96$) zwischen dem POCA-2 und TIA-Hum beschrieben (Karam et al. 2020). Die Leistung des POCA-3 wurde im Vergleich zu einem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-SAA-Test überprüft, wobei ebenfalls eine hervorragende Korrelation zwischen den beiden Methoden ($R^2 = 0,96$) festgestellt wurde (Stack et al. 2019). Bisher gibt es keine publizierte Studie, die den POCA-3 mit einem TIA vergleicht.

Zwischen dem POCA-1 und den TIAs TIA-Hum und TIA-Vet sind jedoch deutliche Mittelwertsunterschiede (Bias) nachgewiesen (Tab. 4): Beim Vergleich der SAA-Ergebnisse des POCA-1 mit den Resultaten des TIA-Hum und des TIA-Vet liegen Bias von 56,7% beziehungsweise 80,9% vor (Kiemle et al. 2022). Auch in einer früheren Studie wird von einer generellen Überschätzung von POCA-1-SAA-Ergebnissen im Vergleich zu TIA-Hum-SAA-Ergebnissen berichtet (Schwartz et al. 2018).

Selbst die in den Studien verwendeten Referenzmethoden sind nicht frei von einem Mittelwertsunterschied. Beim Vergleich zwischen TIA-Hum und TIA-Vet wird zwar von einer hervorragenden Übereinstimmung berichtet ($R^2 = 0,93$) (Kiemle 2021, Kiemle et al. 2022), jedoch ermittelt der TIA-Vet-Test 28,2% niedrigere SAA-Ergebnisse als der TIA-Hum-Test (Kiemle 2021, Kiemle et al. 2022).

Für Mittelwertsunterschiede zwischen Labortests können eine Vielzahl von Faktoren verantwortlich sein: Vor allem bei der Messung hoher SAA-Werte kommt es zu deutlichen Bias zwischen POCA-1 und TIA-Hum (Schwartz et al. 2018, Kiemle 2021, Kiemle et al. 2022) sowie zwischen POCA-2 und TIA-Hum (Karam et al. 2020) (Tab. 4). Teilweise sind in verschiedenen Studien beobachtete, unterschiedlich hohe Bias zwischen den Assays durch unterschiedlich hohe Analytenkonzentrationen

nen zu erklären (Flatland et al. 2010). Einer der Gründe für die deutlichen Bias zwischen den POCA-1 (Schwartz et al. 2018, Kiemle 2021, Kiemle et al. 2022) und -2 (Karam et al. 2020) im Vergleich zu den jeweiligen Referenzmethoden kann außerdem sein, dass eine Kalibrierung einzelner Testchargen lediglich für den POCA-2 möglich ist (Karam et al. 2020). Einer der wichtigsten Gründe für Mittelwertsunterschiede und variable Testergebnisse bei den equinen SAA-Assays sind variable Antikörper-Kreuzreaktivitäten von anti-Mensch-SAA-Antikörpern für equines SAA (Jacobsen et al. 2006a, Jacobsen et al. 2019). Stärkere Affinitäten der anti-Mensch-SAA-Antikörper zu equinem SAA führen dabei zur Messung höherer equiner SAA-Werte (Jacobsen et al. 2019).

Weitere mögliche Ursachen für die beobachteten Bias zwischen den Tests sind die Messmethodik (Jacobsen et al. 2019, Kiemle et al. 2022), biochemische Hintergrundreaktionen (Hindenberg et al. 2018), Variationen verschiedener Testchargen (Schwartz et al. 2018), Anwenderfehler wie Verdünnungs- und Pipettierfehler (Hindenberg et al. 2018), die Verwendung verschiedener Analysegeräte (Jasensky et al. 2015, Hindenberg et al. 2017, Hindenberg et al. 2018), die Verwendung von unterschiedlichem Probenmaterial und Antikoagulans wie beispielsweise Serum versus Plasma (Schwartz et al. 2018) und die Verwendung derselben Testmethode auf verschiedenen Analysegeräten (Jasensky et al. 2015, Munoz-Prieto et al. 2017, Hindenberg et al. 2018).

Haben zwei Methoden einen deutlichen Bias, hat dies zur Konsequenz, dass bei Verlaufsuntersuchungen eines Patienten nicht zwischen den Testmethoden gewechselt werden darf (Kiemle 2021, Kiemle et al. 2022). Die Ergebnisse der Studien (Schwartz et al. 2018, Kiemle et al. 2022) zeigen außerdem, dass die mit POCA-1 erhobenen Resultate (beispielsweise aus dem Notdienst) im weiteren Verlauf nicht mit einem TIA im Großlabor weiterkontrolliert werden können.

Interferenzen

Hämoglobin, Bilirubin und Triglyceride haben einen deutlichen Einfluss auf die SAA-Messergebnisse des POCA-1 und des TIA-Vet (Kiemle 2021, Kiemle et al. 2022). Dies ist für

die Pferdepraxis besonders dann von Bedeutung, wenn Pferde mit entsprechenden klinischen Konditionen vorgestellt werden (Kiemle 2021). Eine Lipidämie kann zu falsch-hohen SAA-Werten führen (Kiemle 2021). Dagegen bedingen Bilirubinämie (beispielsweise bei einem Inanitionsikterus) und Hämolyse (beispielsweise bei Vorliegen einer hämolytischen Anämie (Okumiya et al. 2004, Kyaw et al. 2008), bei Endotoxinbelastung (Kyaw et al. 2008) oder prä-analytisch durch falsche Transportbedingungen des Blutes (Bush und Mangan 2003) und folgender artifizieller Hämolyse) die Messung falsch-niedriger SAA-Werte mittels POCA-1 (Kiemle 2021). Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung liegt keine Interferenzstudie für die POCA-2 und -3 vor. Der TIA-Vet wurde auf Interferenz durch Hämolyse und Lipämie untersucht, wobei kein Einfluss von 10g/L Hämoglobin oder 5g/L Intralipid auf die gemessenen Werte festgestellt wurde (Jacobsen et al. 2019).

Einfluss des Antikoagulans

Auch wenn die Wahl des Antikoagulans ein prä-prä-analytischer Faktor ist, bestimmen die Testeigenschaften die konkreten Auswirkungen. So gibt es Tests, die kaum oder gar nicht von dem verwendeten Antikoagulans beeinflusst werden, wogegen andere Tests signifikante Messwertunterschiede in Abhängigkeit von dem verwendeten Antikoagulans zeigen. So weist der POCA-1 signifikante Unterschiede von SAA-Resultaten bei der Messung von Serum oder Plasma im Vergleich zur SAA-Messung aus EDTA-Vollblutproben auf ($p = 0,002$) (Schwartz et al. 2018). Hierbei wird bei EDTA-Vollblutproben mit SAA-Konzentrationen $> 500 \mu\text{g/ml}$ ein negativer proportionaler Bias (Mittelwertsunterschied $-71,8 \pm 31,6 \mu\text{g/ml}$) beobachtet (Schwartz et al. 2018). Bei der Untersuchung von SAA-Werten mittels POCA-2 konnten keine signifikanten Messwertunterschiede bei der SAA-Messung aus EDTA-Plasma im Vergleich zur Messung aus EDTA-Vollblut festgestellt werden ($p > 0,05$). Jedoch wurden bei der Messung von EDTA-Vollblutproben in dieser Studie tendenziell höhere SAA-Ergebnisse ermittelt, als bei der Messung von EDTA-Plasmaproben (Karam et al. 2020). Vergleichbare Untersuchungen fehlen bisher für TIAs. Praktisch bedeutet dies, dass bei der Messung von SAA unabhängig von dem angewendeten POCA stets derselbe Blutprobentyp verwendet werden sollte.

Tab. 4 Übersicht über die proportionalen beobachteten Bias sowie die Korrelation zwischen Point-of-Care Assays und Turbidimetrischen Immunoassays. | Overview of the observed proportional bias as well as correlation between point-of-care assays and turbidimetric immunoassays.

POCA	Referenztest	Bias _{obs} [%]	Korrelation (R ²)	Studie
POCA-1	TIA-Hum	-56,7	0,77	Kiemle et al. 2022
POCA-1	TIA-Hum	n.d.	0,96	Schwartz et al. 2018
POCA-1	TIA-Vet	-80,9	0,69	Kiemle et al. 2022
POCA-2	TIA-Hum	n.d.	0,96	Karam et al. 2020
POCA-2	TIA-Vet	n.d.	n.d.	-
POCA-3	SAA-ELISA	n.d.	0,96	Stack et al. 2019

Bias_{obs} – beobachteter proportionaler Bias / ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay / n.d. – nicht durchgeführt

POCA-1 – Point-of-Care-Assay-1, Firma früher: StableLab (Sligo, Irland), jetzt Zoetis (Berlin, Deutschland)

POCA-2 – Point-of-Care-Assay-2, Firma Veterinary Medical Research and Development (Pullman, USA)

POCA-3 – Point-of-Care-Assay-3, Firma Accuplex Diagnostics, Kildare, Irland

R² – Bestimmtheitsmaß / SAA – Serum Amyloid A

TIA-Hum – humanmedizinischer turbidimetrischer Immunoassay, Firma Eiken Chemical (Tokyo, Japan)

TIA-Vet – veterinärmedizinischer turbidimetrischer Immunoassay, Firma Eiken Chemical (Tokyo, Japan)

Fazit für die Praxis

Die Resultate der unterschiedlichen Testmethoden (POCA vs. TIA) sind nicht vergleichbar. Aus diesem Grund ist die teilweise übliche Kontrolle eines im Fremdlabor mittels TIA-Methode bestimmten, erhöhten SAA-Wertes anhand eines praxiseigenen POCA nicht zu empfehlen. Um einen möglichst „wahrheitsgetreuen“ SAA-Trend zu erhalten, sollte stets dieselbe Testmethode und dasselbe Antikoagulans verwendet werden.

Eine große Limitation der POCAs ist ihre Impräzision mit Variationskoeffizienten von teilweise > 40%, die nur eine sehr grobe Beurteilung der tatsächlich vorhandenen SAA-Konzentration erlaubt. Bei Verlaufsuntersuchungen sind unter Berücksichtigung der biologischen Variation nur sehr starke Veränderungen der SAA-Konzentration von > 130% des Ausgangswertes als „echte“ Differenz interpretierbar.

Eine weitere Limitation der POCAs ist das Auftreten eines Hook-Effektes bei einer bei Pferden mit einer akuten Phase-Reaktion häufig zu erwartenden SAA-Konzentration von etwa 3000 µg/ml, der nicht von einer Warnmeldung begleitet ist. Daher muss bei Pferden mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden und einem scheinbar niedrigen, dazu nicht passenden SAA-Messwert an einen Hook-Effekt gedacht und eine Nachmessung nach Verdünnung durchgeführt werden. Das Vorliegen einer Hämolyse, Bilirubinämie oder Lipidämie muss stets bei der Interpretation der SAA-Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die den SAA-POCAs zugesprochene schnelle Überprüfung und Einschätzung des Gesundheitszustandes von Pferden muss aufgrund der dargelegten Fakten kritisch hinterfragt werden. Eine realistische Interpretation ermittelter SAA-Werte ist lediglich mit fundiertem Hintergrundwissen über die möglichen Limitationen der SAA-POCAs beim Pferd möglich. Letzten Endes bleibt die SAA-Messung einer unter vielen weiteren diagnostischen Parametern, der immer im Kontext mit dem klinischen Gesamtbild des Pferdes betrachtet werden sollte.

Literatur

Andersen S., Petersen H., Ersbøll A., Falk-Rønne J., Jacobsen S. (2012) Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses. *Vet. J.* 191, 199–202; DOI 10.1016/j.tvjl.2011.01.019

Boulat O., Nusbaumer C., Walz B. (2011) Validation assistée: Apport de deux règles simples appliquées aux résultats des paramètres les plus fréquents de la chimie. *Clinique Générale et de l'urgence. Pipette* 3, 6–8

Braun J.-P., Bourgeois-Abella N., Geffré A., Concordet D., Trumel C. (2015) The preanalytic phase in veterinary clinical pathology. *Vet. Clin. Pathol.* 44, 8–25; DOI 10.1111/vcp.12206

Bush V., Mangan L. (2003) The hemolyzed specimen: causes, effects, and reduction. *BD Vacutainer Systems and Preanalytical Solutions*, 1–8

Christensen M., Jacobsen S., Ichiyangi T., Kjølgaard-Hansen M. (2012) Evaluation of an automated assay based on monoclonal anti-human serum amyloid A (SAA) antibodies for measurement of canine, feline, and equine SAA. *Vet. J.* 194, 332–337; DOI 10.1016/j.tvjl.2012.05.007

Copas V. E. N., Durham A. E., Stratford C. H., McGorum B. C., Waggett B., Pirie R. S. (2013) In equine grass sickness, serum amyloid A and fibrinogen are elevated, and can aid differential diagnosis from non-inflammatory causes of colic. *Vet. Rec.* 172, 395–395; DOI 10.1136/vr.101224

Coutinho da Silva M. A., Canisso I. F., MacPherson M. L., Johnson A. E. M., Divers T. J. (2013) Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. *Equine Vet. J.* 45, 619–624; DOI 10.1111/evj.12034

Cywinska A., Gorecka R., Szarska E., Witkowski L., Dziekan P., Schollenberger A. (2010) Serum amyloid A level as a potential indicator of the status of endurance horses. *Equine Vet. J. Suppl.* 38, 23–27; DOI 10.1111/j.2042-3306.2010.00280.x

De Cozar M., Sherlock C., Knowles E., Mair T. (2019) Serum Amyloid A and plasma fibrinogen concentrations in horses following emergency exploratory celiotomy. *Equine Vet. J.* 52, 59–66; DOI 10.1111/evj.13117

D'Eril G. M., Anesi A., Maggiore M., Leoni V. (2001) Biological variation of serum amyloid A in healthy subjects. *Clin. Chem.* 47, 1498–1499

El-Bahr S. M., El-Deeb W. M. (2016) Acute-phase proteins, oxidative stress biomarkers, proinflammatory cytokines, and cardiac troponin in Arabian mares affected with pyometra. *Theriogenology* 86, 1132–1136; DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.04.002

Endo Y., Tsuchiya T., Omura T., Nakai K., Korosue K., Ishimaru M., Ishikawa Y., Hobo S. (2015) Effects of pre-shipment marbofloxacin administration on fever and blood properties in healthy Thoroughbreds transported a long distance. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 75–79; DOI 10.1292/jvms.14-0336

Fiedler G. M., Thiery J. (2004) Der „fehlerhafte“ Laborbefund – Teil 1: Fehlerquellen der prä- und postanalytischen Phase. *Der Internist*, 315–329; DOI 10.1007/s00108-003-1126-y

Flatland B., Freeman K. P., Friedrichs K. R., Vap L. M., Getzy K. M., Evans E. W., Harr K. E. (2010) ASVCP quality assurance guidelines: control of general analytical factors in veterinary laboratories. *Vet. Clin. Pathol.* 39, 264–277; DOI 10.1111/j.1939-165X.2012.00413.x

Flatland B., Freeman K. P., Vap L. M., Harr K. E. (2013) ASVCP guidelines: quality assurance for point-of-care testing in veterinary medicine. *Vet. Clin. Pathol.* 42, 405–423; DOI 10.1111/vcp.12099

Fraser C. G. (2009) Reference change values: the way forward in monitoring. *Ann. Clin. Biochem.* 46, 264–265; DOI 10.1258/acb.2009.009006

Fraser C. G. (2011) Reference change values. *Clin. Chem. Lab. Med.* 50, 807–812; DOI 10.1515/CCLM.2011.733

Giguère S., Berghaus L. J., Miller C. D. (2016) Clinical assessment of a point-of-care serum amyloid A assay in foals with bronchopneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 1338–1343; DOI 10.1111/jvim.13978

Gómez-Rioja R., Segovia Amaro M., Díaz-Garzón J., Bauçà J. M., Martínez Espartosa D., Fernández-Calle P. (2019) A protocol for testing the stability of biochemical analytes. Technical document. *Clin. Chem. Lab. Med.* 57, 1829–1836; DOI 10.1515/cclm-2019-0586

Hawkins M. D. (2012) Managing the pre- and post-analytical phases of the total testing process. *Ann. Lab. Med.* 32, 5–16; DOI 10.3343/alm.2012.32.1.5

Hindenberg S., Klenner-Gastreich S., Kneier N., Zielinsky S., Gommeren K., Bauer N., Moritz A. (2017) Evaluation of a species-specific C-reactive protein assay for the dog on the ABX Pentra 400 clinical chemistry analyzer. *BMC Vet. Res.* 13, 1–13; DOI 10.1186/s12917-017-1065-9

Hindenberg S., Keßler M., Zielinsky S., Langenstein J., Moritz A., Bauer N. (2018) Evaluation of a novel quantitative canine species-specific point-of-care assay for C-reactive protein. *BMC Vet. Res.* 14, 1–12; DOI 10.1186/s12917-018-1415-2

Hooijberg E., van den Hoven R., Tichy A., Schwendenwein I. (2014) Diagnostic and predictive capability of routine laboratory tests for the diagnosis and staging of equine inflammatory disease. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 1587–1593; DOI 10.1111/jvim.12404

Hultén C., Sandgren B., Skiöldebrand E., Klingeborn B., Marhaug G., Forsberg M. (1999) The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Vet. Scand.* 40, 323–333; DOI 10.1186/BF03547012

- Jacobsen S., Jensen J. C., Frei S., Jensen A. L., Thoenen M. B. (2005) Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. *Equine Vet. J.* 37, 552–556; DOI 10.2746/042516405775314853
- Jacobsen S., Kjelgaard-Hansen M., Hagbard Petersen H., Jensen A. L. (2006a) Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. *Vet. J.* 172, 315–319; DOI 10.1016/j.tvjl.2005.04.021
- Jacobsen S., Niewold T. A., Halling-Thomsen M., Nanni S., Olsen E., Lindgaard C., Andersen P. H. (2006b) Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110, 325–330; DOI 10.1016/j.vetimm.2005.10.012
- Jacobsen S., Andersen P. H. (2007) The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Vet. Educ.* 19, 38–46; DOI 10.1111/j.2042-3292.2007.tb00550.x
- Jacobsen S., Vinther A. M., Kjelgaard-Hansen M., Nielsen L. N. (2019) Validation of an equine serum amyloid A assay with an unusually broad working range. *BMC Vet. Res.* 15, 1–9; DOI 10.1186/s12917-019-2211-3
- Jasensky A. K., Klenner S., Einspanier R., Kohn B. (2015) Evaluation of three different point-of-care tests for quantitative measurement of canine C-reactive protein. *Vet. Clin. Pathol.* 44, 205–214; DOI 10.1111/vcp.12264
- Jensen A., Kjelgaard-Hansen M. (2006) Method comparison in the clinical laboratory. *Vet. Clin. Pathol.* 35, 276–286; DOI 10.1111/j.1939-165X.2006.tb00131.x
- Jensen A., Kjelgaard-Hansen M. (2010) Schalm's Veterinary Hematology: Diagnostic test validation. Wiley Blackwell, Ames, USA. 1027–1033
- Karam B., Hines S., Skipper L., Pusterla N. (2020) Whole-blood validation of a new point-of-care equine serum amyloid A assay. *J. Equine Vet. Sci.* 94, 1–4; DOI 10.1016/j.evs.2020.103222
- Kiemle J. (2021) Validierungsstudie eines Point-of-Care Serum Amyloid A Lesegerätes für die Pferdepraxis im Vergleich zu zwei in der Tiermedizin verwendeten Turbidimetrischen Immunoassays. VVB Laufersweiler Verlag, Gießen
- Kiemle J., Hindenberg S., Bauer N., Röcken M. (2022) Comparison of a point-of-care serum amyloid A analyzer frequently used in equine practice with 2 turbidimetric immunoassays used in human and veterinary medicine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 34, 42–53; DOI 10.1177/10406387211056029
- Kyaw W. O., Uhlig A., Köller G., Sack U., Schusser G. F. (2008) Freies Hämoglobin und Tumor-Nekrose-Faktor- α im Blut von Pferden mit Kolik oder akuter Kolitis. *Tierärztliche Wochenschrift* 121 (11/12), 440–445
- Long A., Nolen-Walston R. (2020) Equine inflammatory markers in the twenty-first century: A focus on serum amyloid A. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 36, 147–160; DOI 10.1016/j.cveq.2019.12.005
- Moore J. N., Vandenplas M. L. (2014) Is it the systemic inflammatory response syndrome or endotoxemia in horses with colic? *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 30, 337–351; DOI 10.1016/j.cveq.2014.04.003
- Munoz-Prieto A., Tvarijonaviciute A., Escribano D., Martinez-Subiela S., Ceron J. (2017) Use of heterologous immunoassays for quantification of serum proteins: the case of canine C-reactive protein. *PLoS ONE* 12, 1–14; DOI 10.1371/journal.pone.0172188
- Nolen-Walston R. (2015) How to interpret serum amyloid A concentrations. *Proceedings of the 61st Annual AAEP Convention*, 61, 130–137, Las Vegas, USA
- Nunokawa Y., Fujigana T., Taira T., Okumura M., Yamashita K., Tsunoda N., Mitsuyoshi H. (1993) Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses. *J. Vet. Med. Sci.* 55, 1011–1016; DOI 10.1292/jvms.55.1011
- Okumiyama T., Ishikawa-Nishi M., Doi T., Kamioka M., Takeuchi H., Doi Y., Sugiura T. (2004) Evaluation of intravascular hemolysis with erythrocyte creatine in patients with valve prostheses. *Chest* 125, 2115–2120; DOI 10.1378/chest.125.6.2115
- Olderos E., Kendall A., Hedberg-Alm Y., Pringle J. (2019) Idiopathic peritonitis in horses: a retrospective study of 130 cases in Sweden (2002–2017). *Acta Vet. Scand.* 61, 1–8; DOI 10.1186/s13028-019-0456-2
- Pepys M. B., Baltz M. L., Tennent G. A., Kent J., Ousey J., Rossdale P. D. (1989) Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. *Equine Vet. J.* 21, 106–109; DOI 10.1111/j.2042-3306.1989.tb02108.x
- Petersen H. H., Nielsen J. P., Heegaard P. M. H. (2004) Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35, 163–187; DOI 10.1051/vetres:2004002
- Pihl T. H., Scheepers E., Sanz M. G., Goddard A., Page P. C., Toff N., Kjelgaard-Hansen M., Andersen P. H., Jacobsen S. (2016) Acute-phase proteins as diagnostic markers in horses with colic. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* 26, 664–674; DOI 10.1111/vec.12504
- Plebani M. (2010) The detection and prevention of errors in laboratory medicine. *Ann. Clin. Biochem.* 47, 101–110; DOI 10.1258/acb.2009.009222
- Rey E. G., O'Dell D., Mehta S., Erickson D. (2017) Mitigating the hook effect in lateral flow sandwich immunoassays using real-time reaction kinetics. *Anal. Chem.* 89, 5095–5100; DOI 10.1021/acs.analchem.7b00638
- Robinson C. S., Singer E. R., Piviani M., Rubio-Martinez L. M. (2017) Are serum amyloid A or D-lactate useful to diagnose synovial contamination or sepsis in horses? *Vet. Rec.* 181, 1–5; DOI 10.1136/vr.104386
- Sanchez-Teran A., Rubio-Martinez L., Villarino N., Sanz M. (2012) Effects of repeated intra-articular administration of amikacin on serum amyloid A, total protein and nucleated cell count in synovial fluid from healthy horses. *Equine Vet. J. Suppl.* 43, 12–16; DOI 10.1111/j.2042-3306.2012.00637.x
- Schwartz D., Pusterla N., Jacobsen S., Christopher M. M. (2018) Analytical validation of a new point-of-care assay for serum amyloid A in horses. *Equine Vet. J.* 50, 678–683; DOI 10.1111/evj.12807
- Stack J. D., Cousty M., Steele E., Handel I., Lechartier A., Vinardell T., David F. (2019) Comparison of serum amyloid A measurements in equine synovial fluid with routine diagnostic methods to detect synovial infection in a clinical environment. *Front. Vet. Sci.* 6 (325), 1–8; DOI 10.3389/fvets.2019.00325
- Stoneham S. J., Palmer L., Cash R., Rossdale P. D. (2001) Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease. *Equine Vet. J.* 33, 599–603; DOI 10.2746/042516401776563472
- Urieli-Shoval S., Linke R. P., Matzner Y. (2000) Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 64–69; DOI 10.1097/00062752-200001000-00012
- Vandenplas M. L., Moore J. N., Barton M. H., Roussel A. J., Cohen N. D. (2005) Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1509–1516; DOI 10.2460/ajvr.2005.66.1509
- Viner M., Mazan M. R., Bedenice D., Mapes S., Pusterla N. (2017) Comparison of serum amyloid A in horses with infectious and noninfectious respiratory diseases. *J. Equine Vet. Sci.* 49, 11–13; DOI 10.1016/j.jevs.2016.09.005
- Walz B., Fierz W. (2015) Der Referenzbereich ist tot – es lebe der Reference Change Value. *Therapeutische Umschau* 72, 130–135; DOI 10.1026/a000002
- Westgard J. O., Carey R. N., Wold S. (1974) Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. *Clin. Chem.* 20, 825–833; DOI 10.1093/clinchem/20.7.825
- Witkowska-Pilaszewicz O. D., Zmigrodzka M., Winnicka A., Miskiewicz A., Strzelec K., Cywinska A. (2019) Serum amyloid A in equine health and disease. *Equine Vet. J.* 51, 293–298; DOI 10.1111/evj.13062