

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Privatdozent Dr. Gerhard Wess

Analytische und klinische Evaluierung eines hochsensitiven  
Troponin I-Assays bei der dilatativen Kardiomyopathie des  
Dobermanns und Durchführung einer Follow-up-Studie unter  
Anwendung eines konventionellen Troponin I-Assays

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Elisabeth Theresia Maier

aus München

München 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Wess

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. André

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

## **Meinen Eltern**

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Dobermann-Kardiomyopathie.....</b>	<b>2</b>
<b>2.</b>	<b>Kardiale Troponine.....</b>	<b>7</b>
2.1.	Allgemeines.....	7
2.2.	Aufbau und Funktion .....	8
2.3.	Isoformen .....	9
2.3.1.	Struktur und Spezifität .....	10
2.3.2.	Zelluläre Verteilung, Freisetzung und Elimination.....	11
2.3.3.	<i>In vitro</i> Stabilität.....	13
2.3.4.	Serologischer Nachweis .....	14
2.3.5.	Interspezieshomologie.....	15
2.3.5.1.	Konventionelle Assays.....	15
2.3.5.2.	Hochsensitive Assays.....	16
2.3.5.3.	Limitationen .....	17
2.3.5.3.1.	Standardisierung.....	17
2.3.5.3.2.	Interferenzen.....	18
2.3.5.3.3.	Reproduzierbarkeit .....	18
2.4.	Verwendung .....	18
2.4.1.	Humanmedizin .....	19
2.4.1.1.	Diagnose eines akuten Myokardinfarkts.....	21
2.4.1.2.	Risikostratifizierung und Management .....	22
2.4.1.3.	Prognose .....	23
2.4.1.4.	Vor- und Nachteile von hochsensitiven Assays.....	24
2.4.2.	Tiermedizin .....	26
2.4.2.1.	Anwendung beim Hund .....	28
2.4.2.1.1.	Kardial bedingter Troponin-Konzentrationsanstieg.....	29
2.4.2.1.2.	Extrakardial bedingter Troponinkonzentrationsanstieg .....	36
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>40</b>
<b>1.</b>	<b>Patienten.....</b>	<b>40</b>
<b>2.</b>	<b>Ein- und Ausschlusskriterien .....</b>	<b>40</b>

---

<b>3.</b>	<b>Untersuchungen.....</b>	<b>40</b>
3.1.	Signalement und Anamnese .....	41
3.2.	Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung.....	41
3.3.	Elektrokardiographie .....	41
3.3.1.	Kurzzeit-Elektrokardiographie.....	41
3.3.2.	Langzeit-Elektrokardiographie.....	42
3.4.	Echokardiographie .....	42
3.4.1.	Zweidimensionale und M-Mode Echokardiographie.....	43
3.4.2.	Blutflussdoppler .....	44
3.4.3.	Simpson-Scheibchensummationsmethode .....	44
<b>4.</b>	<b>Offline-Datenanalyse.....</b>	<b>44</b>
4.1.	Linksventrikuläre Volumina .....	44
4.2.	Linksventrikuläre Durchmesser und Verkürzungsfraction .....	46
4.3.	Durchmesser des linken Atriums und der Aorta .....	47
<b>5.</b>	<b>Einteilung in Patientengruppen .....</b>	<b>47</b>
5.1.	Herzgesund.....	47
5.2.	Last normal.....	47
5.3.	Okkult.....	48
5.3.1.	Ausschließlich ventrikuläre Extrasystolen .....	48
5.3.2.	Ausschließlich echokardiographische Veränderungen .....	49
5.3.3.	Ventrikuläre Extrasystolen und echokardiographische Veränderungen ...	49
5.4.	Dekompensiert .....	49
<b>6.</b>	<b>Analyse des kardialen Troponin I .....</b>	<b>50</b>
6.1.	Blutprobengewinnung, Verarbeitung und Lagerung.....	50
6.2.	Beschreibung der Testverfahren.....	50
6.2.1.	ADVIA Centaur® TnI-Ultra .....	51
6.2.2.	Immulate® 2000 Troponin I.....	52
6.3.	Untersuchung der <i>in vitro</i> Langzeitstabilität.....	52
6.4.	Testpräzision des ADVIA Centaur® TnI-Ultra .....	53
6.5.	Vergleich zweier Probentypen mit dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra .....	53
6.6.	Testvergleich .....	53
<b>7.</b>	<b>Follow-up-Studie .....</b>	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>Statistische Datenanalyse.....</b>	<b>54</b>

---

8.1.	<i>In vitro</i> Langzeitstabilität des kardialen Troponin I.....	54
8.2.	ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay.....	55
8.2.1.	Testpräzision .....	55
8.2.2.	Vergleich von Serum- und EDTA-Plasmaproben.....	55
8.2.3.	Einfluss des Alters auf die cTnI-Konzentration.....	55
8.2.4.	Vergleich der verschiedenen Krankheitsstadien .....	55
8.2.5.	Cut-off-Werte .....	56
8.2.6.	Korrelation mit der Anzahl an ventrikulären Extrasystolen.....	56
8.3.	Testvergleich .....	56
8.3.1.	Analytischer Vergleich.....	56
8.3.2.	Klinischer Vergleich .....	56
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>57</b>
<b>1.</b>	<b>Charakterisierung der Studienpopulation.....</b>	<b>57</b>
<b>2.</b>	<b><i>In vitro</i> Langzeitstabilität des kardialen Troponin I.....</b>	<b>61</b>
<b>3.</b>	<b>ADVIA Centaur® TnI-Ultra.....</b>	<b>66</b>
3.1.	Intra- und Inter-Assay Varianz.....	67
3.2.	Vergleich von Serum- und EDTA-Plasmaproben.....	68
3.3.	Einfluss des Alters auf die cTnI-Konzentration.....	69
3.4.	Vergleich der verschiedenen Krankheitsstadien .....	72
3.5.	Cut-off-Werte .....	74
3.6.	Einfluss der Anzahl an ventrikulären Extrasystolen .....	84
3.7.	Testvergleich .....	85
3.7.1.	Analytischer Vergleich.....	85
3.7.2.	Klinischer Vergleich .....	87
<b>4.</b>	<b>Follow-up.....</b>	<b>91</b>
4.1.	Herzgesunde Patienten mit erhöhten cTnI-Konzentrationen .....	91
4.2.	Herzkranke Patienten mit niedrigen cTnI-Konzentrationen .....	98
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>122</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>124</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>126</b>

---

<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>155</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>156</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ACC	American College of Cardiology
ACCF	American College of Cardiology Foundation
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACS	Acute coronary syndrome = Akutes Koronarsyndrom
AHA	American Heart Association
AK	Antikörper
AMI	Akuter Myokardinfarkt
Ao	Aorta
ARVC	Arrhythmic right ventricular Cardiomyopathy
AS	Aminosäure
AUC	Area under Curve
AV	Atrioventrikulär
BSA	Body Surface Area
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CHF	Congestive Heart Failure = Kongestives Herzversagen
CK	Creatin-Kinase
CK-MB	Isoenzym-MB der Creatin-Kinase
CL	Chemilumineszenz
cm	Zentimeter
cTn	Kardiales Troponin
cTnC	Kardiales Troponin C
cTnI	Kardiales Troponin I
cTnT	Kardiales Troponin T
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DoCM	Dobermann-Kardiomyopathie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure



EDV	Enddiastolisches Volumen
EKG	Elektrokardiographie
ESC	European Society of Cardiology
ESV	Endsystolisches Volumen
FS	Fractional Shortening = Verkürzungsfraction
hs	Hochsensitiv
ISACHC	International Small Animal Cardiac Health Council
IVSd	Dicke des interventrikulären Septums in der Diastole
IVSs	Dicke des interventrikulären Septums in der Systole
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
km	Kilometer
LA	Linkes Atrium
LDH	Laktatdehydrogenase
LV	Linker Ventrikel
LVFWd	Dicke der linksventrikulären freien Wand in der Diastole
LVFWs	Dicke der linksventrikulären freien Wand in der Systole
LVIDd	Linksventrikuläre innere Dimension in der Diastole
LVIDs	Linksventrikuläre innere Dimension in der Systole
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
ME	Mitralklappenendokardiose
MI	Mitralklappeninsuffizienz
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
NT-proBNP	N-terminales B-Typ Natriuretisches Peptid
PDA	Persistierender Ductus arteriosus Botalli
PE	Perikarderguss

PH	Pulmonale Hypertension
PS	Pulmonalstenose
RLU	Relative Lichteinheiten
ROC	Receiver-Operator-Curve
SAS	Subaortenstenose
SSSM	Simpson-Scheibchensummationsmethode
Tn	Troponin
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
VES	Ventrikuläre Extrasystolen
VK	Variationskoeffizient
VSD	Ventrikelseptumdefekt
WHF	World Heart Federation
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter

## I. EINLEITUNG

Die Dobermann-Kardiomyopathie (DoCM) stellt eine häufig auftretende Form (Prävalenz 58,2 Prozent (%)) der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) dar, die mit einem autosomal dominanten Erbgang einhergeht (MEURS et al., 2007; WESS et al., 2010a). Der Krankheitsverlauf ist mit einer langsamen Progression assoziiert, beginnend mit einem Myokardschaden auf zellulärer Ebene, gefolgt von der klinisch asymptomatisch verlaufenden okkulten Phase und anschließendem symptomatischen dekompensierten Stadium (MOISE & FOX, 1999; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; MEURS et al., 2007). Eine Diagnose der DoCM ist gegenwärtig erst im okkulten Stadium möglich, basierend auf dem Nachweis von ventrikulären Arrhythmien anhand eines 24-Stunden-Elektrokardiogramms (EKG) und/oder einer linksventrikulären systolischen Dysfunktion mittels Echokardiographie. Hinsichtlich der Therapie, der Prognose sowie des Zuchteinsatzes von Dobermännern in jungen Jahren, ist eine sichere Diagnosestellung bereits im frühen Krankheitsstadium essentiell. Die Messung der kardialen Troponin I (cTnI)-Konzentration erwies sich neben der elektro- und echokardiographischen Untersuchung als ein hilfreicher zusätzlicher diagnostischer Test zur Identifikation von asymptomatischen Hunden im Stadium I sowie im okkulten Stadium einer DoCM (WESS et al., 2010b).

Ziele dieser Doktorarbeit waren die Untersuchung der *in vitro* Langzeitstabilität des cTnI sowie die analytische und klinische Evaluierung eines neuen hochsensitiven (hs) cTnI-Assays. Es erfolgte die Beurteilung der Eignung des hs cTnI-Assays als Screening-Test für die DoCM, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Diagnosestellung in einem frühen Stadium, in welchem ein Nachweis der Krankheit anhand des diagnostischen Goldstandards nicht möglich ist. Außerdem wurden geeignete Cut-off-Werte zur Differenzierung zwischen herzgesunden und an der DoCM erkrankten Patienten ermittelt. Des Weiteren wurde der hs cTnI-Assays mit einem konventionellen cTnI-Test sowohl analytisch als auch klinisch verglichen. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand aus der Durchführung einer Follow-up-Studie, in der zum einen herzgesunde Dobermänner mit erhöhten cTnI-Konzentrationen und zum anderen Patienten, die an der DoCM erkrankt waren, aber einen niedrigen cTnI-Serumspiegel zeigten, nachuntersucht wurden.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Dobermann-Kardiomyopathie**

Die DCM stellt bei mittelgroßen und großen Hunderassen eine häufige Ursache für ein kongestives Herzversagen (CHF) sowie für einen plötzlichen Herztod dar. Der Dobermann zählt zu den am häufigsten betroffenen Hunderassen (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997a; TIDHOLM et al., 2001; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004), wobei in Amerika oder Kanada eine Prävalenz von 45 – 63 % beschrieben wurde (HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 1997b; O'GRADY & HORNE, 1998; CALVERT & MEURS, 2000). In Europa konnte eine ähnlich hohe kumulative Prävalenz für die DoCM von 58,2 % nachgewiesen werden. Meist sind Hunde mittleren oder fortgeschrittenen Alters betroffen (WESS et al., 2010a). In Untersuchungen von CALVERT und Mitarbeitern wiesen 77 % der an einer DoCM erkrankten Patienten ein Alter zwischen fünf und zehn Jahren auf, wobei Hunde im CHF ein Durchschnittsalter von 6,7 Jahren zeigten (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997b). In einer weiteren Studie in welcher die Prävalenz der DoCM in verschiedenen Altersgruppen untersucht wurde waren 43,6 % der erkrankten Dobermänner zwischen sechs und acht Jahren alt und 44,1 % hatten das achte Lebensjahr überschritten (WESS et al., 2010a). Einige Untersuchungen wiesen auf ein gehäuftes Vorkommen der DoCM bei Rüden hin (CALVERT et al., 1982; HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 1997b; O'GRADY & HORNE, 1998; CALVERT et al., 2000a). Dagegen lag in neueren Untersuchungen eine homogene Geschlechtsverteilung vor (MEURS et al., 2007; WESS et al., 2010a).

Bei der DoCM handelt es sich um eine familiäre Erkrankung, die mit einem autosomal dominanten Erbgang einhergeht. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte eine Assoziation zwischen genetischen Veränderungen innerhalb des caninen Chromosoms fünf und dem Auftreten der DoCM nachgewiesen werden. Da nur 50 % der erkrankten Dobermänner der Studienpopulation das Risikoallel innerhalb des Chromosoms fünf aufwiesen, stellt dieses einen bedeutenden, aber vermutlich nicht den einzigen genetischen Risikofaktor dar (MAUSBERG et al., 2011).

Zu den histopathologischen Charakteristika der DoCM zählen eine myofibrilläre Degeneration, eine Myozytenatrophie und -lyse, eine Vakuolisierung sowie der extensive Ersatz von Myokardzellen durch Kollagen und Fettzellen (fettige Infiltration und Degeneration) (CALVERT et al., 1982; HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 1997a; EVERETT et al., 1999).

Bei der DoCM, die mit einer langsam verlaufenden Progression assoziiert ist, können drei verschiedene Krankheitsstadien (I – III) unterschieden werden (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 1997b; PETRIC et al., 2002; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Während des asymptomatisch verlaufenden Stadium I liegt ausschließlich ein Myokardschaden auf zellulärer Ebene vor. Sowohl echokardiographisch als auch elektrokardiographisch ist dieses Krankheitsstadium durch ein völlig unauffälliges Herz gekennzeichnet, welches demnach auch nicht mit dem derzeitigen diagnostischen Goldstandard, bestehend aus 24-Stunden-EKG und Echokardiographie, nachgewiesen werden kann. Stadium II verläuft aus Sicht der Besitzer ebenfalls ohne das Auftreten von klinischen Symptomen einer Herzkrankheit, weshalb dieses auch als okkulte Phase bezeichnet wird. Allerdings ist das okkulte Stadium durch morphologische Veränderungen des Herzens und/oder ventrikuläre Arrhythmien, überwiegend in Form von ventrikulären Extrasystolen (VES), charakterisiert. Echokardiographisch liegt initial eine linksventrikuläre systolische Dysfunktion vor, gefolgt von einer Volumenüberladung des linken Ventrikels (LV) (HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; O'GRADY et al., 2009). Zwei Studien konnten zeigen, dass Dobermänner im okkulten Stadium sowohl elektrokardiographische als auch echokardiographische Abnormalitäten aufweisen (O'GRADY & HORNE, 1998; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Andere dagegen beschreiben das Auftreten von VES als erstes Anzeichen einer DoCM im okkulten Stadium (CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; CALVERT & MEURS, 2000; CALVERT & WALL, 2001; WESS et al., 2010a). In Untersuchungen von WESS und Mitarbeitern wies nur ein kleiner Anteil (13 %) der im okkulten Stadium befindlichen Dobermänner ausschließlich echokardiographische Veränderungen auf (WESS et al., 2010a). 25 - 30 % der Patienten sterben in der okkulten Phase an einem durch ventrikuläre Arrhythmien verursachten plötzlichen Herztod

(CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b). Das nachfolgende Stadium III ist mit der Entwicklung von klinischen Symptomen aufgrund eines CHF verbunden, in welchem wiederum 50 % an einem plötzlichen Herztod und 50 % der Patienten an den Folgen des CHF versterben (HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; O'GRADY et al., 2009). In einer Studie konnte bezüglich des Krankheitsverlaufs eine unterschiedliche Geschlechtsverteilung belegt werden, wobei bei Hündinnen eine langsamere Progression nachgewiesen werden konnte. Außerdem zeigten diese auch in einem fortgeschrittenen Alter überwiegend VES ohne morphologische Veränderungen des Herzens. Im Gegensatz dazu wiesen Rüden zu einem früheren Zeitpunkt der DoCM morphologische Abnormalitäten auf, was mit der Entwicklung eines CHF (Stadium III) in jüngeren Jahren assoziiert war (WESS et al., 2010a).

Bislang war eine Diagnosestellung erst ab dem okkulten Stadium möglich. Hierbei stellen das 24-Stunden-EKG (Holter-EKG) sowie die konventionelle Echokardiographie den derzeitigen diagnostischen Goldstandard dar (CALVERT & BROWN, 1986; CALVERT et al., 2000a). Obwohl ein Kurzzeit-EKG aufgrund der geringen Sensitivität ein Holter-EKG nicht ersetzen kann ist das Auftreten von nur einer VES in fünf Minuten mit einer Spezifität von 96,7 % und einem positiv prädiktiven Wert von 85,6 % auf eine bestehende DoCM im okkulten Stadium (> 100 VES in 24 Stunden) hinweisend (WESS et al., 2010c). Um die kardiale Funktion echokardiographisch beurteilen zu können, kommen überwiegend die linksventrikulären Dimensionen in der Systole (LVIDs) sowie in der Diastole (LVIDd) zum Einsatz. Hierbei werden für den Doberman je nach Studie unterschiedliche Referenzwerte verwendet. Für herzgesunde Dobermänner liegt die obere Grenze der physiologischen LVIDd bei 47 Millimeter (mm), die der LVIDs bei 38 mm. Als an der DoCM erkrankt werden Patienten beurteilt, deren LVIDd > 49 mm beträgt (CALVERT et al., 2000a; CALVERT & BROWN, 2004; O'GRADY et al., 2009). Dagegen existieren verschiedene Cut-off-Werte bezüglich der LVIDs für kranke Dobermänner. CALVERT und Mitarbeiter definieren eine systolische Dysfunktion ab einer LVIDs > 40 mm, O'GRADY und Mitarbeiter dagegen erst ab einer LVIDs > 42 mm. In einer neueren Studie von WESS und Mitarbeitern wurden unter Berücksichtigung des Geschlechts neue Cut-off-Werte für die M-Mode-Echokardiographie erstellt und mit bisher zum

Einsatz kommenden („alten) Cut-off-Werten verglichen. In Tabelle 1 sind sowohl die neuen als auch die alten Cut-off-Werte mit der jeweiligen Sensitivität und Spezifität dargestellt (WESS et al., 2010d).

**Tabelle 1:** Darstellung der von WESS und Mitarbeitern ermittelten neuen Cut-off-Werte der M-Mode-Echokardiographie für die Diagnosestellung einer Dobermann-Kardiomyopathie, unter Berücksichtigung des Geschlechts (mm = Millimeter, LVIDd = linksventrikuläre innere Dimension in der Diastole, LVIDs = linksventrikuläre innere Dimension in der Systole, ♂ = männliches Geschlecht, ♀ = weibliches Geschlecht) (WESS et al., 2010d).

	<b>Cut-off (mm)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
LVIDd alt ♂	> 49	70,6	100,0
LVIDd neu ♂	> 48	78,4	100,0
LVIDd alt ♀	> 49	55,0	100,0
LVIDd neu ♀	> 46	86,7	99,3
LVIDs alt ♂	> 39	62,7	100,0
LVIDs neu ♂	> 36	82,4	99,0
LVIDs alt ♀	> 39	56,7	100,0
LVIDs neu ♀	> 36	88,3	99,7

In einer weiteren von WESS und Mitarbeitern durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu den konventionellen M-Mode-Messungen der linksventrikulären Dimensionen, die Bestimmung der linksventrikulären Volumina anhand der Simpson-Scheibchensummationsmethode (SSSM) die Detektion einer systolischen oder diastolischen Dysfunktion zu einem früheren Zeitpunkt ermöglichen. Unter Verwendung der Cut-off-Werte von 95 Milliliter pro Quadratmeter ( $\text{ml/m}^2$ ) (Sensitivität 96,9 %, Spezifität 96,3 %) für das enddiastolische Volumen (EDV) und 55  $\text{ml/m}^2$  (Sensitivität 94,4 %, Spezifität 97,4 %) für das endsystolische Volumen (ESV) des LV konnte, verglichen mit dem M-Mode, eine deutlich höhere Sensitivität für die SSSM nachgewiesen werden (WESS et al., 2010e).

Neben dem diagnostischen Goldstandard (24-Stunden-EKG und Echokardiographie) erwiesen sich die kardialen Biomarker, N-terminales B-Typ Natriuretisches Peptid (NT-proBNP) und das cTnI als hilfreiche zusätzliche

Screening-Tests für die DoCM. Im Vergleich zu herzgesunden Dobermännern zeigten an der DoCM erkrankte Patienten sowohl eine statistisch signifikant höhere NT-proBNP- als auch eine signifikant erhöhte cTnI-Konzentration in der Zirkulation. Sogar bei jenen Patienten, die initial elektro- und echokardiographisch als herzgesund beurteilt wurden, aber innerhalb der folgenden 18 Monate eine systolische Dysfunktion und/oder VES im Sinne einer DoCM entwickelten, konnten signifikant erhöhte Konzentrationen dieser beiden kardialen Biomarker festgestellt werden. Demnach war anhand der Analysen dieser Biomarker eine Detektion der DoCM bereits im frühen Krankheitsstadium I möglich, in welchem lediglich ein Myokardschaden auf zellulärer Ebene vorliegt, der zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht mit der Entwicklung von ventrikulären Arrhythmien oder einer systolischen Dysfunktion assoziiert ist und demnach auch nicht mit dem derzeitigen diagnostischen Goldstandard nachgewiesen werden kann. Aus diesem Grund besteht bei Dobermännern, die elektro- und echokardiographisch als herzgesund eingestuft werden, aber eine erhöhte NT-proBNP- oder cTnI-Konzentration aufweisen der Verdacht auf eine bestehende DoCM, weshalb bei diesen regelmäßige kardiologische Kontrolluntersuchungen mittels Echokardiographie und 24 Stunden-EKG durchgeführt werden sollten (WESS et al., 2010b; WESS et al., 2011). Generell wird für den Doberman eine jährliche kardiologische Routineuntersuchung auf eine bestehende DoCM empfohlen (CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; CALVERT & WALL, 2001; WESS et al., 2010b). Weisen elektro- und echokardiographisch unauffällige Patienten allerdings eine erhöhte NT-proBNP- oder cTnI-Konzentration auf sollten bei diesen kardiologische Kontrolluntersuchungen in kürzeren Zeitabständen erfolgen (WESS et al., 2010b; WESS et al., 2011). Für die Differenzierung zwischen herzgesunden Hunden und an der DoCM erkrankten Patienten wurde für das NT-proBNP ein Cut-off-Wert von 400 Pikomol pro Liter und für das cTnI eine Konzentration von 0,22 Nanogramm pro ml (ng/ml) ermittelt (WESS et al., 2010b; WESS et al., 2011).

Die Therapie muss je nach erhobenen kardiologischen Untersuchungsbefunden und klinischen Symptomen für jeden Patienten individuell angepasst werden (CALVERT, 1986; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Bei Patienten im okkulten Stadium einer DoCM wird eine antiarrhythmische Therapie bei Auftreten von schnellen isolierten VES, komplexen Tachyarrhythmien

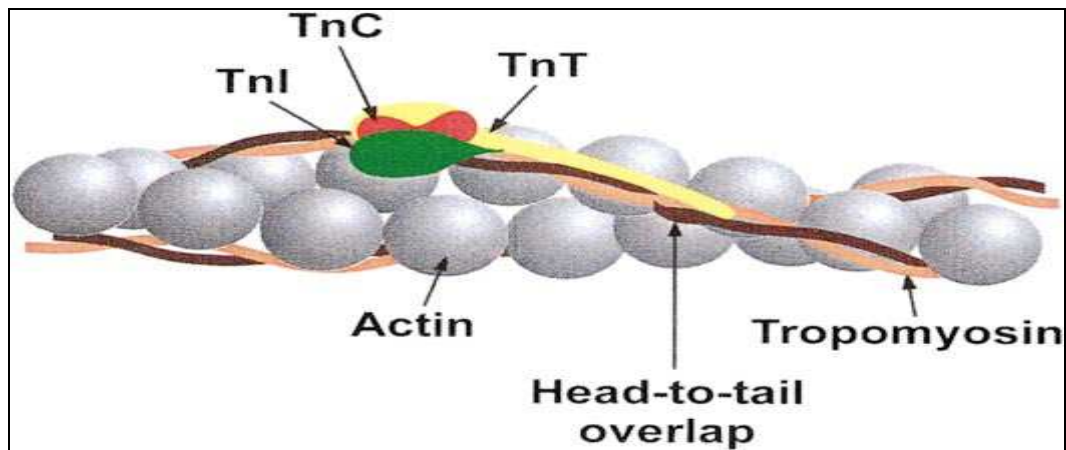


(multiforme VES, Couplets, Triplets, Bi-, Trigemini, Salven) sowie Synkopen empfohlen, um das Risiko für das Eintreten eines plötzlichen Herztodes zu minimieren (CALVERT, 1995; MEURS, 2002). Durch den Einsatz von Benazeprilhydrochlorid, einem Inhibitor des Angiotensin Converting Enzyms (ACE), konnte die Dauer des okkulten Stadiums der DoCM verlängert und somit der Eintritt des CHF signifikant verzögert werden (O'GRADY et al., 2009). Die Therapie des dekompensierten Stadium III reicht von Diuretika über ACE-Inhibitoren bis hin zu positiv inotropen Medikamenten. Im Vergleich zu einer Placebogruppe ist eine Therapie mit Pimobendan, einem Inodilatator, bei Patienten im CHF mit signifikant längeren Überlebenszeiten assoziiert. Bei Vorliegen von Arrhythmien sollten diese ebenfalls mit entsprechenden antiarrhythmischen Medikamenten therapiert werden (CALVERT & BROWN, 1986; FUENTES et al., 2002; MEURS, 2002; MOISE, 2002; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; O'GRADY et al., 2008). Die klinische Relevanz einer Therapie mit Pimobendan bereits im okkulten Stadium einer DoCM ist gegenwertig noch nicht bekannt (PROSEK & ETTINGER, 2010).

## **2. Kardiale Troponine**

### **2.1. Allgemeines**

Troponine (Tn) stellen myofibrilläre Proteine dar, die zusammen mit dem Aktin und Tropomyosin das Aktinfilament der quergestreiften Muskulatur bilden (Abbildung 1). Die Tn sind an der Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-medierten Interaktion zwischen den beiden kontraktilen Proteinen, Aktin und Myosin, beteiligt und regulieren somit die Kontraktion sowie die Relaxation der quergestreiften Muskulatur.



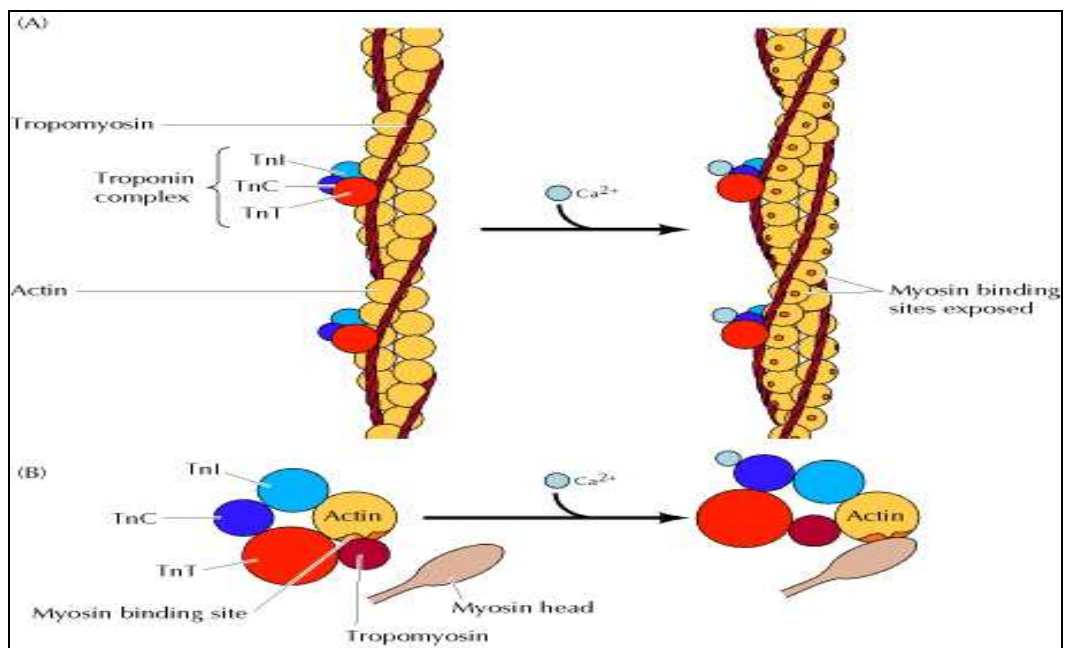
**Abbildung 1:** Darstellung des Aktinfilaments der quergestreiften Muskulatur, bestehend aus Aktin, Tropomyosin und den drei Komponenten des Troponinkomplexes (TnC = Troponin C, TnI = Troponin I, TnT = Troponin T) (GORDON et al., 2000)

Entlang des Aktinfilaments tritt das Tn, welches in einer spezifischen Region eines jeden Tropomyosinmoleküls gebunden ist (EBASHI et al., 1969), mit einer Periodizität von 38 Nanometern auf (OHTSUKI et al., 1967). Das Tn stellt kein einzelnes Protein dar, sondern besteht vielmehr aus drei Untereinheiten, dem Troponin C (TnC), Troponin T (TnT) und Troponin I (TnI), wobei jede dieser Komponenten eine spezifische Funktion aufweist (TAKEDA et al., 2003; SOLARO et al., 2008). Der Tn-Komplex ist sowohl im Myokard als auch in der Skelettmuskulatur für die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -medierten Kontraktion essentiell (TAKEDA et al., 2003). Allerdings handelt es sich bei den verschiedenen Tn-Untereinheiten des Herz- sowie des Skelettmuskels um antigenetisch differenzierbare und somit gewebespezifische Isoformen (DHOOT et al., 1978; DHOOT & PERRY, 1979). Die kardialen Tn (cTn)-Isoformen stellen in der Medizin die Biomarker der Wahl für den Nachweis einer myokardialen Zellschädigung dar (BABUIN & JAFFE, 2005).

## 2.2. Aufbau und Funktion

Die Funktion des Tn-Komplexes liegt in der Regulation der kontraktile Interaktion zwischen Aktin und Myosin. Bei dem TnC handelt es sich um die  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende, bei dem TnT um die tropomyosinbindende und bei dem TnI um die inhibitorische Untereinheit. Sobald das TnC  $\text{Ca}^{2+}$  bindet, kommt es innerhalb des Aktinfilaments zu einer Lageveränderung des Tn-Tropomyosin-Komplexes, wodurch die Bindungsstellen für Myosin freigelegt werden (Abbildung 2). Die

dadurch ermöglichte Aktin-Myosin-Wechselwirkung resultiert in einer anschließenden zellulären Muskelkontraktion. Das TnI verhindert dagegen diese Lageveränderung des Tn-Tropomyosin-Komplexes bis es zu einer erneuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an TnC kommt, wodurch die inhibitorische Wirkung des TnI aufgehoben wird. TnT bindet einerseits den Troponinkomplex über Tropomyosin an das Aktinfilament und ist andererseits für die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierende Funktion des Tn-Komplexes essentiell (COLLINSON et al., 2001; OHTSUKI & MORIMOTO, 2008).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Lageveränderung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes durch Kalzium-Bindung an Troponin C (A = Darstellung des Aktinfilaments der Länge nach, B = Darstellung des Aktinfilaments im Querschnitt,  $\text{Ca}^{2+}$  = Kalzium, TnI = Troponin I, TnC = Troponin C, TnT = Troponin T) (COOPER, 2000).

### 2.3. Isoformen

Alle drei Komponenten des Tn-Komplexes weisen gewebespezifische Isoformen auf (DHOOT et al., 1978; DHOOT & PERRY, 1979).

### 2.3.1. Struktur und Spezifität

Es existieren zwei Isoformen des TnC (161 und 162 Aminosäuren (AS)), die allerdings keine kardiale Spezifität aufweisen, da das kardiale Troponin C (cTnC) auch in der Skelettmuskulatur exprimiert wird. Aus diesem Grund hat das cTnC keine Bedeutung als Diagnostikum für eine myokardiale Zellschädigung erlangt (CUMMINS & PERRY, 1978; SCHREIER et al., 1990; PARMACEK & LEIDEN, 1991). Dagegen werden in den Herzmuskelzellen gewebespezifische Isoformen des TnI und TnT exprimiert, das cTnI und das kardiale TnT (cTnT). Diese sind anhand von Immunoassays von jenen Isoformen des Skelettmuskels differenzierbar, da sie sich in einigen wesentlichen Epitopen unterscheiden. Aufgrund dieser kardialen Gewebespezifität gelten das cTnI sowie das cTnT als Diagnostikum der Wahl für die nichtinvasive Diagnose einer myokardialen Zellschädigung (GREASER & GERGELY, 1973; LIPPI et al., 2009). Das Myokard weist nur eine Isoform des cTnI auf (CUMMINS & PERRY, 1978), welche weder im Skelettmuskel noch in einem anderen extrakardialen Gewebe exprimiert wird (CUMMINS & PERRY, 1978; BABUIN & JAFFE, 2005). Das cTnI stellt ein aus 210 AS bestehendes lineares Protein dar, das ein Molekulargewicht von 22,5 Kilodalton (kDa) erreicht. Außerdem besitzt es am N-terminalen Ende einen, aus 32 AS bestehenden, posttranslationalen Rest (BABUIN & JAFFE, 2005). Aufgrund dieser AS-Sequenz sowie den Strukturunterschieden (42 – 45 %) zu den Isoformen des Skelettmuskels war die Entwicklung von hochspezifischen monoklonalen Antikörpern (AK) möglich, die keine Kreuzreaktivität mit extrakardialen Isoformen zeigten (LARUE et al., 1992). TnT tritt dagegen in mehreren Isoformen auf, die eine variable Sequenz im Bereich des N- und C-terminalen Endes aufweisen (ANDERSON et al., 1995; PERRY, 1998). Allerdings ist nur eine cTnT-Isoform, bestehend aus 260 AS (Molekulargewicht von 37 kDa), für das physiologische adulte Myokard des Menschen sowie der meisten Vertebraten charakteristisch (JIN & LIN, 1988). Das fetale Myokard enthält zusätzlich Isoformen der Skelettmuskulatur, die allerdings während der späten fetalen Entwicklung durch cTnI und cTnT ersetzt werden (TOYOTA & SHIMADA, 1981; SAGGIN et al., 1989). Dagegen wird das cTnI während der Entwicklung weder im Skelettmuskel noch in einem anderen extrakardialen Gewebe exprimiert (TOYOTA & SHIMADA, 1981). Auch eine de- oder regenerative Myopathie ist kein Auslöser einer cTnI-Expression (BODOR et al., 1995). Dagegen kommt es im kardialen Gewebe (ANDERSON et

al., 1995) sowie in der erkrankten Skelettmuskulatur zu einer Reexpression der fetalen cTnT-Isoformen (BODOR et al., 1997). Die heutzutage zum Einsatz kommenden cTnT-Assays verwenden allerdings hochspezifische AK zur Detektion des cTnT, die keine Kreuzreaktivität mit diesen reexprimierten, fetalen cTnT-Isoformen aufweisen (RICCHIUTI et al., 1998a; RICCHIUTI & APPLE, 1999). Folglich besitzen Assays zur Messung der zirkulierenden cTnT-Konzentration und cTnI-Tests eine äquivalente kardiale Spezifität (BABUIN & JAFFE, 2005).

### **2.3.2. Zelluläre Verteilung, Freisetzung und Elimination**

Innerhalb der Herzmuskelzellen liegen die cTn überwiegend in strukturell gebundener Form (Tn-Tropomyosin-Komplex) vor. Daneben verbleibt ein kleiner Anteil ungebunden im Zytosol gelöst. Das frei im Zytosol vorliegende Kompartiment macht etwa 6 - 8 % des totalen cTnT und nahezu 2 - 4 % des absoluten cTnI aus (KATUS et al., 1991; ADAMS et al., 1994). Aufgrund dieser intrazellulären Kompartimentierung weist die Freisetzung der cTn meist einen biphasischen Verlauf auf (MAIR, 1999). Infolge einer akuten Herzmuskelzellschädigung kommt es zu einem initialen Austritt der frei im Zytosol gelösten cTn, was in einem frühzeitigen Anstieg der cTn-Blutkonzentration resultiert. Im Anschluss folgt eine verzögerte Freisetzung der strukturell gebundenen cTn, welche mit einem anhaltend erhöhten cTn-Serumspiegel assoziiert ist (KATUS et al., 1991; ADAMS et al., 1994; JAFFE et al., 1996). Die Serumhalbwertszeit des cTnI beträgt bei Labortieren sowie bei Hunden etwa sechs Stunden, die des cTnT dagegen nur zwei Stunden. Kontinuierlich erhöhte cTn-Konzentrationen weisen demnach auf eine anhaltende myokardiale Zellschädigung hin (PROSEK & ETTINGER, 2010). Nach einem akuten Myokardinfarkt (AMI) können beim Menschen innerhalb der ersten zwei bis vier Stunden erhöhte cTn-Konzentrationen im Blut detektiert werden (JAFFE et al., 2006; MORROW et al., 2007). Spitzenkonzentrationen werden dagegen erst nach zwölf bis 48 Stunden erreicht, gefolgt von einem langsamen Konzentrationsabfall nach sieben bis zehn Tagen des cTnI und zehn bis 14 Tagen des cTnT (CUMMINS et al., 1987; GOLDMANN et al., 2001; BABUIN & JAFFE, 2005). Hunde mit experimentell induzierten AMI zeigten eine ähnliche Freisetzungskinetik mit dem einzigen Unterschied, dass die Maximalkonzentrationen bereits nach zehn bis 16 Stunden und somit zu einem

früheren Zeitpunkt erreicht werden. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt eine schnellere Entwicklung der Myokardnekrose unter experimentellen Bedingungen dar (CUMMINS & CUMMINS, 1987). Liegt allerdings eine fokale Myokardverletzung vor, wie es bei einer Myokardkontusion nach Thoraxtrauma oder interventioneller Katheterisation der Fall ist, kommt es zu einem Anstieg der zirkulierenden cTn-Konzentration innerhalb von vier bis acht Stunden mit einer anschließenden rapiden Konzentrationsabnahme in den darauffolgenden zwei bis drei Tagen (SCHOBER et al., 1999). In welcher Form die cTn infolge einer myokardialen Zellschädigung in der Zirkulation auftreten, ist von enzymatischen Abbauvorgängen durch zytosolische Proteasen abhängig (GAZE & COLLINSON, 2008). Innerhalb nekrotischen Gewebes, kommt es aufgrund der rapiden enzymatischen Spaltung des cTnI (> 90 %) zu einer Akkumulation von kurzen cTnI-Spaltprodukten (KATRUKHA et al., 1998). Das zirkulierende cTnI sowie das cTnT können sowohl in freier Form (intakt oder als enzymatisches Spaltprodukt) als auch mit anderen cTn-Untereinheiten komplexgebunden (binärer cTnI-C-, ternärer cTnT-I-C-Komplex) vorliegen (BODOR et al., 1992; COLLINSON et al., 2001; GAZE & COLLINSON, 2008). Das in die Zirkulation freigesetzte cTnI weist wiederum eine hohe Anfälligkeit gegenüber Proteolyse, Phosphorylierung sowie Oxidation auf, wodurch es zu Konformationsänderungen und zur Entstehung von verschiedenen Peptiden, die unterschiedliche Stabilitäten aufweisen, kommt. Beim Menschen konnte für das freie cTnI gegenüber der komplexgebundenen Form (bi- oder ternär) eine wesentlich geringere Stabilität ermittelt werden. Das N- und C-terminale Ende des cTnI haben sich dabei als besonders instabil erwiesen, da diese einer schnellen proteolytischen Spaltung unterliegen. Aufgrund dieser Instabilität sollten in cTnI-Assays AK gegen die stabile Core-Region des cTnI eingesetzt werden, die zwischen den AS-Resten 30 und 110 lokalisiert ist (KATRUKHA et al., 1998). Nach einem Myokardinfarkt liegen beim Menschen über 97 % des freigesetzten cTnI komplexgebunden mit cTnC vor (KATRUKHA et al., 1997; VARGA et al., 2009). Aufgrund einer sehr kurzen Halbwertszeit von circa 5 Minuten, macht das freie cTnI dagegen nur einen kleinen Anteil in der Zirkulation aus (JAFFE et al., 1996). Die beim Tier in der Zirkulation dominierende cTnI-Form ist gegenwärtig nicht bekannt (ADIN et al., 2005; VARGA et al., 2009). cTnT liegt beim Menschen infolge eines Myokardinfarkts in geringen Mengen intakt oder als Spaltprodukt im Blut vor. Da sich rekombinantes cTnT im Serum gegenüber proteolytischen Abbauprozessen

als stabil erwiesen hat, werden die in der Zirkulation auftretenden cTnT-Spaltprodukte mit großer Wahrscheinlichkeit bereits vor deren Freisetzung in der geschädigten Herzmuskelzelle gebildet (KATRUKHA et al., 1998). Obwohl der exakte Eliminationsmechanismus der cTn derzeit noch weitgehend ungeklärt ist, wird eine Beteiligung des retikuloendothelialen Systems vermutet (FREDA et al., 2002). Untersuchungen weisen außerdem auf eine renale Ausscheidung von kleinen cTnT-Fragmenten hin, was eine Erklärung für die hohe Prävalenz von erhöhten cTnT-Konzentrationen bei Patienten mit Nierenversagen darstellen würde (DIRIS et al., 2004). Die Fragestellung ob eine cTn-Freisetzung nach einer reversiblen myokardialen Zellschädigung erfolgen kann oder nur in Verbindung mit einer irreversiblen Myokardnekrose auftritt, wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. Von manchen wird immer noch die Meinung vertreten, dass eine Freisetzung der cTn ausschließlich das Resultat einer irreversiblen Zellmembranschädigung darstellt, da eine reversible Ischämie infolge eines Belastungstests beim Menschen nicht mit einem cTn-Konzentrationsanstieg assoziiert war (CARLSON et al., 2002). Andere Studien weisen dagegen deutlich auf eine durch reversible Ischämie bedingte cTnI-Freisetzung hin (HAMM et al., 1992; FENG et al., 1998; RIFAI et al., 1999; WU & FORD, 1999; NEUMAYR et al., 2001). Unter anderem konnten mehrere Untersuchungen eine transiente cTn-Freisetzung nach anstrengendem Ausdauersport belegen (RIFAI et al., 1999; NEUMAYR et al., 2001). Als zugrundeliegende Ursache wird eine Freisetzung der im Zytosol gelösten cTn, infolge einer reversiblen Zellmembranschädigung, vermutet (FENG et al., 1998; RIFAI et al., 1999; NEUMAYR et al., 2001).

### **2.3.3. *In vitro* Stabilität**

CTnT erwies sich bei einer Lagerungstemperatur von -80 Grad Celsius (°C) über einen Zeitraum von zwölf Monaten als stabil. Dagegen konnten unter denselben Lagerungsbedingungen nach 24 Monaten eine Abnahme der Konzentration von 0,007 ng/ml nachgewiesen werden, wobei die klinische Signifikanz dieser lagerungsbedingten Konzentrationsreduktion laut Autoren derzeit noch unklar ist (BASIT et al., 2007). Untersuchungen von COLLINSON und Mitarbeitern ergaben keine signifikanten cTnT-Konzentrationsabweichungen nach einer Lagerungsdauer von bis zu fünf Jahren bei einer Temperatur von -70 °C (COLLINSON et al., 2001). Anhand von fünf wiederholten Messungen der cTnI-Konzentration aus bei Raumtemperatur gelagerten Serumproben (n = 11) im

Abstand von jeweils 24 Stunden konnten keine gerichteten Abweichung der cTnI-Resultate festgestellt werden. Demnach kann der Serumprobenversand per Post und ohne besondere Kühlungsmaßnahmen an ein zuständiges Labor erfolgen (SCHOBER et al., 2002c). PRICE und Mitarbeiter konnten die Instabilität der cTn, vor allem im Bereich der terminalen Epitope, bei einer Lagerungstemperatur von 15 – 20 °C nachweisen (PRICE et al., 2000). O'BRIEN und Mitarbeiter stellten eine kontinuierliche Abnahme der cTnI-Konzentration um 18 %, 17 % und 15 % in Kontrollproben hoher, mittlerer und niedriger cTnI-Konzentration nach einer fünftägigen Lagerung bei 4 °C fest. Bei einer Lagerungstemperatur von -20 °C erwies sich das Kontrollmaterial zwar als stabiler, aber auch hier konnte nach fünf Tagen eine Reduktion der cTnI-Werte um circa 6 % ermittelt werden. Dagegen war eine Aufbewahrung der Proben bei -80 °C für drei Monate mit keinem Konzentrationsabfall assoziiert (O'BRIEN et al., 2006). In einer weiteren Studie wurde die Stabilität des cTnI nach einer Lagerungsdauer von zwei Jahren bei -20 °C untersucht. Dabei konnte eine durchschnittliche Abnahme der cTnI-Konzentration um circa 15 % nachgewiesen werden, was mit einer relativ guten Langzeitstabilität vereinbart wurde (BROTHAG, 2003). Die *in vitro* Stabilität des cTnI scheint aufgrund der fehlenden Assay-Standardisierung von dem zur Analyse eingesetzten Test abhängig zu sein. Wird die cTnI-Analyse nicht umgehend nach der Blutprobengewinnung durchgeführt kann es bei Verwendung von verschiedenen Assays, aufgrund von proteolytischen Abbauprozessen der involvierten Epitope, zu erheblichen Abweichungen der Resultate kommen (SHI et al., 1999). Im Vergleich zu cTnI-Assays deren AK gegen das instabile N- oder T-terminale Ende gerichtet sind, war der Einsatz von AK gegen die stabile Core-Region des cTnI mit einer deutlich höheren Stabilität des cTnI assoziiert (KATRUKHA et al., 1998).

#### **2.3.4. Serologischer Nachweis**

Wie bei vielen anderen Proteinen oder Hormonen erfolgt der labordiagnostische Nachweis von zirkulierenden cTn mithilfe von Immunoassays, unter Anwendung von meist mehreren poly- oder monoklonalen AK, die gegen humanes cTnI oder cTnT gerichtet sind (SCHOBER et al., 2002c).



### 2.3.5. Interspezieshomologie

Die Funktion sowie die molekulare Struktur der phylogenetisch stark konservierten cTn-Proteine sind mit einer hohen Interspezieshomologie assoziiert, was den Einsatz von für die Humanmedizin entwickelte cTn-Tests auch bei anderen Spezies ermöglicht (WILKINSON & GRAND, 1978; PEARLSTONE et al., 1986; PARMACEK & LEIDEN, 1991; O'BRIEN et al., 1997b; OYAMA & SOLTER, 2004). Mit Hilfe von Sequenzanalysen konnte an geklonten felines und caninen cTnI-Genen eine ausgeprägte Nukleotid- und AS-Sequenzhomologie zwischen diesen beiden Spezies nachgewiesen werden. Gegenüber dem humanen cTnI-Gen wurde für das canine eine 95%ige und für das feline cTnI-Gen eine 96%ige Homologie ermittelt. Im Gegensatz zu dem humanen und caninen cTnI ist die AS Glutaminsäure<sup>4</sup>/Glycin<sup>4</sup> in der Sequenz des felines cTnI nicht enthalten. Dagegen weisen sowohl das feline als auch das canine cTnI die AS Alanin<sup>25</sup> auf, die wiederum dem humanen cTnI fehlt (RISHNIW et al., 2004). Dennoch existiert in der Region des cTnI, die üblicherweise als antigene Determinante (Epitop) verwendet wird, eine stark ausgeprägte Sequenzhomologie zwischen Hunden, Katzen, Menschen, Mäusen und Ratten. Innerhalb dieser Region unterscheiden sich die cTnI-Proteine von Hund und Katze gegenüber dem humanen cTnI lediglich in einer AS (COLLINSON et al., 2001), wobei eine völlige Übereinstimmung bei Hund und Katze vorliegt (RISHNIW et al., 2004). Zahlreiche andere Studien konnten zeigen, dass eine Messung der cTn anhand von cTn-Assays, die für die Humanmedizin entwickelt wurden, bei vielen Säugetierarten möglich ist (O'BRIEN et al., 1997b; FREDERICKS et al., 2001).

#### 2.3.5.1. Konventionelle Assays

Die ersten Testsysteme für die Bestimmung der cTn wurden in den späten 80er Jahren entwickelt (WELLS & SLEEPER, 2008). Es existieren cTn-Assays von unterschiedlichen Generationen bei denen die analytische Nachweisgrenze sowie die Messgenauigkeit in den letzten Jahrzehnten stetig verbessert wurden. Diese Testgenerationen unterscheiden sich hinsichtlich der verwendeten AK, der Sensitivität und Spezifität, der Heterogenität der verwendeten humanen cTn-Standards sowie der definierten Referenzwerte (JAFFE et al., 2000; LABUGGER et al., 2000). Derzeit werden multiple cTnI-Assays von verschiedenen Herstellern angeboten, die allerdings keiner einheitlichen Standardisierung unterzogen sind (WU et al., 1998; SHI et al., 1999; CHRISTENSON et al., 2001). Dagegen wird

der cTnT-Assay von nur einem Hersteller vermarktet und ist somit patentiert und standardisiert (JAFFE et al., 2000; LABUGGER et al., 2000).

### **2.3.5.2. Hochsensitive Assays**

In der Humanmedizin wurde bereits in dem Konsensdokument der European Society of Cardiology (ESC) und des American College of Cardiology (ACC) die cTn-Analyse als der labordiagnostische Goldstandard für den Nachweis einer akuten Myokardschädigungen definiert, wobei als einheitlicher Cut-off-Wert für die Diagnose eines Myokardinfarkts die 99. Perzentile einer gesunden Referenzpopulation festgelegt wurde (ALPERT et al., 2000). Dieser Grenzwert wurde in den neuen Richtlinien beibehalten (THYGESEN et al., 2007). Zusätzliche wurde von den cTn-Assays eine ausreichende Messpräzision mit einem Variationskoeffizient (VK) von zehn Prozent oder weniger im Bereich dieses Cut-off-Wertes gefordert (ALPERT et al., 2000; THYGESEN et al., 2007), um Fehlklassifikationen aufgrund von Testungenauigkeiten im untersten Messbereich zu minimieren. Diese empfohlene Präzision ( $VK \leq 10\%$  am Referenzwert der 99. Perzentile) konnte allerdings mit den bisherig verfügbaren konventionellen cTn-Assays nicht konstant erreicht werden. Aus diesem Grund wurden für die meisten cTn-Assays Cut-off-Werte, die den empfohlenen Referenzwert der 99. Perzentile überschritten, willkürlich festgelegt (MOHAMMED & JANUZZI, 2010). Erst mit der Entwicklung einer neuen Immunoassay-Generation, den sogenannten „hoch- oder ultrasensitiven“ cTn-Tests ist eine akkurate Messung der cTn-Konzentration mit der gegenwärtig empfohlenen Präzision möglich (MOHAMMED & JANUZZI, 2010). Diese hs Tests sind im Vergleich zu den konventionellen cTn-Assays in der Lage bis zu zehnfach niedrigere cTn-Konzentrationen (Konzentrationen unterhalb der 99. Perzentile) zu detektieren, wodurch nun auch geringgradige strukturelle Veränderungen des Myokards, wie sie beispielsweise in der Frühphase des Myokardinfarkts auftreten, nachweisbar sind (TATE, 2008). Außerdem führte der Einsatz von hs cTn-Assays zu der Erkenntnis, dass ein Nachweis von cTn in der Zirkulation bei den meisten Probanden der Referenzpopulation möglich ist, wobei die hierfür zugrundeliegende Ursache derzeit noch nicht geklärt ist. Allerdings wird die Interpretation von geringgradig erhöhten cTn-Konzentrationen dadurch zusätzlich verkompliziert (GIANNITSIS et al., 2010).

### **2.3.5.3. Limitationen**

Obwohl die Analyse der zirkulierenden cTn-Konzentrationen den gegenwärtigen Goldstandard zum Nachweis einer myokardialen Zellschädigung darstellt, weist diese einige Limitationen auf.

#### **2.3.5.3.1. Standardisierung**

Wie bereits unter 2.3.5.1. erwähnt, wird derzeit eine Vielfalt an cTnI-Assays von verschiedenen Herstellern auf dem Markt angeboten, wobei allerdings jegliche Teststandardisierung fehlt. Es werden sowohl unterschiedliche AK als auch verschiedene cTn-Präparate für die Assay-Kalibration verwendet. Außerdem weist das cTnI in der Zirkulation multiple Formen (komplexgebunden oder durch Oxidation sowie enzymatische Prozesse modifizierte Formen) auf, welche von einigen in den verschiedenen cTnI-Tests zum Einsatz kommenden AK detektiert werden können, von anderen dagegen nicht (WU et al., 1998; SHI et al., 1999; CHRISTENSON et al., 2001). Die Variabilität der zirkulierenden cTn-Spaltprodukte und der damit verbundenen Epitopininstabilität kann entweder mit einer Detektion und daher mit einer Erhöhung des Testergebnisses oder bei Nichterkennung, bedingt durch strukturelle Veränderungen innerhalb der antigenen Determinanten, mit einer Abnahme der cTn-Resultate (falsch negativ) assoziiert sein (SCHOBER et al., 2002c). Aus diesem Grund sollten in cTnI-Assays bevorzugt AK eingesetzt werden, die gegen die stabile Core-Region des cTnI gerichtet sind (KATRUKHA et al., 1998). Aufgrund der fehlenden Standardisierung können die Grenzwerte der cTnI-Assays trotz desselben Testsubstrates um das Zehnfache und mehr differieren, was für den klinischen Gebrauch ein wesentliches Problem darstellt (LARUE et al., 1992; FERRIERES et al., 1998; KATRUKHA et al., 1998; DASGUPTA et al., 2000; SAADEDDIN et al., 2003). Jeder Test weist deshalb einen eigenen ermittelten Cut-off-Wert auf. Ein Vergleich von cTnI-Resultaten aus verschiedenen Studien in denen unterschiedliche cTnI-Assays zum Einsatz kamen, ist aus diesem Grund ausgeschlossen (APPLE, 1999; PANTEGHINI et al., 2004). Im Gegensatz dazu ist der von nur einem Hersteller vermarktete cTnT-Assay patentiert und standardisiert. Demnach existiert für das cTnT auch nur ein einziger Grenzwert, wodurch Studienvergleiche bezüglich der cTnT-Konzentrationen ermöglicht werden (JAFFE et al., 2000; LABUGGER et al., 2000).

### **2.3.5.3.2. Interferenzen**

Neben der fehlenden Standardisierung stellen auch falsch positive cTnI-Resultate, die durch die Anwesenheit von interferierenden Substanzen im Blut verursacht werden können ein Problem innerhalb der cTn-Analytik dar. Zu den möglichen Ursachen, die mit einem falsch positiven Testergebnis assoziiert sein können zählen heterophile AK, Anti-Tn-AK, rheumatoide Faktoren, Fibrin in der zu analysierenden Blutprobe, Hämolyse, Hämoglobinämie, Lipidämie, gesteigerte Aktivität der alkalischen Phosphatase, Hyperproteinämie sowie eine Hyperbilirubinämie (LAGNEAU et al., 1999; LUM & SOLARZ, 2006).

### **2.3.5.3.3. Reproduzierbarkeit**

Eine essentielle Voraussetzung für das Erhalten von verlässlichen Testresultaten stellt eine gute Reproduzierbarkeit dar. Die gegenwärtigen cTn-Assays weisen allerdings die Problematik auf, dass sich die Reproduzierbarkeit mit abnehmender cTn-Konzentration verschlechtert. Dabei ist gerade der niedrige Konzentrationsbereich, in welchem aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit häufig widersprüchliche Testergebnisse beobachtet werden, für das weitere Management des Patienten und wichtige therapeutische Entscheidungen ausschlaggebend (MCNEIL, 2007).

## **2.4. Verwendung**

Die Analyse von cTnI und cTnT gilt derzeit aufgrund ihrer hohen Sensitivität und nahezu absoluten Spezifität, sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin, als labordiagnostischer Goldstandard für den Nachweis einer myokardialen Zellschädigung. Wegen der deutlich höheren myokardialen Gewebespezifität sowie der höheren klinischen Sensitivität für die Detektion eines Myokardschadens wurden die klassischen Biomarker, die Laktatdehydrogenase (LDH), die Creatin-Kinase (CK) sowie deren Isoenzym-MB (CK-MB), durch die cTn verdrängt (ROBERTS & SOBEL, 1973; GERHARDT et al., 1999; MORROW et al., 2007). Ein Anstieg der cTn zeigt zwar eine Schädigung des Myokards an, allerdings kann keine Aussage über die zugrundeliegende Ursache getroffen werden. Neben der Identifikation von myokardialen Zellschädigungen kommen die cTn auch innerhalb der Risikostratifizierung zum Einsatz, da die cTn-Konzentration mit dem klinischen Schweregrad der zugrundeliegenden Erkrankung sowie der Lebenserwartung korreliert (O'BRIEN, 2008). Anhand von

cTn-Messungen können Permeabilitätsstörungen, eine fokale Entzündung oder Nekrosen der kardialen Myozyten sehr frühzeitig und teilweise noch vor einer histologischen Nachweisbarkeit festgestellt werden (LAUER et al., 1997). Außerdem kommen die cTn in präklinischen Studien an Labortieren wie Hunden, Ratten und Schweinen zum Einsatz, um das kardiotoxische Potential verschiedener Substanzen und kardiovaskulärer Eingriffe beim Menschen beurteilen zu können. Chemotherapeutika, antiretrovirale Pharmazeutika, aber auch chirurgische Eingriffe am Herzen, die mit einer kardialen Toxizität verbunden sind werden unter anderem hierbei untersucht. Des Weiteren wird die Wirksamkeit von kardioprotektiven Medikamenten für den Einsatz in der Humanmedizin als zusätzliche Agentien für Therapien, die kardiale Nebenwirkungen aufweisen, eruiert (O'BRIEN, 2008).

#### **2.4.1. Humanmedizin**

In der Humanmedizin stellen die cTn, aufgrund der hohen Gewebespezifität, der diagnostischen Sensitivität, der niedrigen basalen Blutkonzentration, der rapiden Freisetzung sowie der Persistenz in der Zirkulation, den diagnostischen Goldstandard für den Nachweis einer myokardialen Zellschädigung dar. Es besteht eine gute Korrelation zwischen der cTn-Serumkonzentration und histopathologischen Myokardveränderungen, dem Ausmaß der myokardialen Zellschädigung, der klinischen Symptomatik sowie der Prognose (O'BRIEN, 2006, 2008). Myokardschäden, die durch ein ischämisches Ereignis verursacht wurden, führen zu einem stärkeren cTn-Konzentrationsanstieg (> 11 fach) (ALEHAN et al., 2003) als solche, die durch eine nicht-ischämische Ursache (z.B. Myokarditis) bedingt sind (3 – 5 fach) (LANG et al., 2000). Die cTn-Analyse kommt in der Humanmedizin vor allem als nichtinvasives Diagnostikum eines akuten Koronarsyndroms (ACS) sowie zur Risikostratifizierung von Patienten mit ACS zum Einsatz (LAMB et al., 2004). Des Weiteren werden die cTn zum Nachweis einer chronischen oder beginnenden DCM und Hypertrophen Kardiomyopathie, sowie eines myokardialen Traumas oder einer systemischen Hypertonie eingesetzt (PROSEK & ETTINGER, 2010). Als kardiale Biomarker weisen das cTnI und das cTnT eine gleichwertige Aussagekraft auf. Eine Ausnahme stellen Patienten mit einer eingeschränkten renalen Funktion dar (LAMB et al., 2004). Weitere mit einem cTn-Konzentrationsanstieg assoziierte Ursachen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2:** Ursachen einer erhöhten Konzentration der kardialen Troponine in Abwesenheit eines akuten Koronarsyndroms (THYGESEN et al., 2007; MOHAMMED & JANUZZI, 2010)

<b>Kardiale Ursachen</b>	Kardiale Amyloidose
	Kardiale Kontusion
	Herzchirurgie
	Kardioversion
	Verschluss eines Atriumseptumdefekts
	Koronarspasmus
	Dilatative und hypertrophe Kardiomyopathie
	Herzversagen (akut/chronisch)
	Myokarditis, Perikarditis
	Perkutane Koronarintervention
	Post Herztransplantation
	Radiofrequenz-Ablation
	Tachy- oder Bradykardie, Herzblock
	<b>Extrakardiale Ursachen</b>
Chemotherapeutika (hohe Dosen)	
Sympathomimetika	
Primäre pulmonale Hypertension	
Pulmonale Embolie	
Lungenödem	
Chronische Niereninsuffizienz	
Apoplexie	
Subarachnoidale Hämorrhagien	
Vergiftungen (Skorpion- oder Quallenstich)	
Sepsis	
Verbrennungen (> 30 % der Körperoberfläche)	
Extremer Ausdauersport	

#### **2.4.1.1. Diagnose eines akuten Myokardinfarkts**

Beim Menschen kommt es zur Entstehung eines AMI durch Ablösung einer arteriosklerotischen Plaque in die Koronararterien, gefolgt von Thrombozytenaggregation, Koagulation und damit verbundener Gefäßokklusion oder distaler Embolisation. Die Folge stellt eine myokardiale Ischämie dar, die in einem Zelluntergang resultiert (ALPERT et al., 2000; COLLINSON & STUBBS, 2003). Von den im Jahr 1979 durch die World Health Organization festgelegten Kriterien (passende Anamnese und klinische Präsentation, elektrokardiographischer Nachweis einer Ischämie sowie erhöhte kardiale Enzyme) mussten zwei positiv sein, um die Diagnose AMI stellen zu können. Im Jahre 2000 wurden durch die ESC und ACC neue Empfehlungen für die Diagnose eines AMI veröffentlicht. Demnach sollte ein akuter, beginnender oder kürzlich aufgetretener Myokardinfarkt durch den Nachweis eines typischen Anstiegs und Abfalls der myokardialen Nekrosemarker (cTn oder CK-MB) in Kombination mit mindestens einem der folgenden Kriterien diagnostiziert werden: Symptome einer Ischämie (z.B. Thoraxschmerzen), Entwicklung einer pathologischen Q-Welle im EKG, Ischämie bedingte EKG-Veränderungen (neu auftretende Veränderungen der ST-T-Welle) oder arterielle Koronarintervention (z.B. Angioplastie). Außerdem konnte die Diagnosestellung durch den Nachweis von pathologischen Befunden eines AMI erfolgen. Dabei stellten die cTn die bevorzugten Biomarker dar und eine alternative Messung der CK-MB sollte nur durchgeführt werden, falls eine Bestimmung der cTn nicht verfügbar war. Somit galten die kardialen Biomarker als fundamentales Diagnostikum eines AMI, da klinische Symptome sowie EKG-Veränderungen unspezifisch oder sogar völlig fehlen können (ALPERT et al., 2000). Aufgrund von neuen Erkenntnissen in der Forschung, Diagnostik und Therapie kam es im Jahr 2007 durch ein Joint-ESC/American College of Cardiology Foundation (ACCF)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF)-Task-Force zu einer Neudefinition des AMI. Wesentliche Änderungen stellten neben der Hinzunahme von bildgebenden Verfahren, ergänzend zu den kardialen Biomarkern (bevorzugt cTn), die Klassifizierung des AMI in fünf Typen (siehe Anhang Tabelle 20) dar. Laut diesen neuen Empfehlungen kann bei Vorliegen eines EKG mit infarkttypischer ST-Streckenhebung die Diagnose AMI primär anhand der Klinik und des EKG-Befundes gestellt werden, um eine Verzögerung von therapeutischen Entscheidungen durch das Warten auf cTn-Ergebnisse zu verhindern. Handelt es

sich dagegen um einen AMI ohne ST-Streckenhebung stellen kardiale Biomarker, bevorzugt cTn, neben der Klinik ein wichtiges Diagnostikum dar. Für die sichere Diagnose eines AMI ist sowohl eine den Grenzwert überschreitende cTn-Konzentration als auch eine infarkttypische cTn-Kinetik (signifikanter Anstieg und Abfall der cTn-Konzentrationen im Zeitverlauf) während seriellen Blutentnahmen essentiell. Da die cTn-Konzentration circa zwei bis vier Stunden nach beginnender Myokardschädigung ansteigt (JAFFE et al., 2006; MORROW et al., 2007) sollte eine Blutentnahme zum Zeitpunkt der Vorstellung sowie sechs bis neun Stunden danach erfolgen (THYGESEN et al., 2007). Spitzenkonzentrationen treten dagegen erst nach 18 – 24 Stunden auf (ALPERT et al., 2000). In Fällen in denen während dieser Zeitspanne keine erhöhten cTn-Werte nachgewiesen werden, aber ein starker klinischer Verdacht auf einen AMI besteht, sind zusätzliche cTn-Analysen nach zwölf und 24 Stunden erforderlich (MACRAE et al., 2006). Eine infarkttypische cTn-Kinetik ist zur Differenzierung eines AMI von einer chronisch erhöhten cTn-Konzentrationen notwendig, wie sie beispielsweise bei Patienten mit chronischem Nierenversagen auftritt (JAFFE, 2006). In den neuen Richtlinien wurden die 99. Perzentile einer gesunden Referenzpopulation als einheitlicher Grenzwert beibehalten. Zusätzlich wurde von den zum Einsatz kommenden Labortests eine ausreichende Messpräzision mit einem VK von maximal zehn Prozent im Bereich dieses Cut-off-Wertes gefordert, um Fehlklassifikationen aufgrund von Testungenauigkeiten im untersten Messbereich zu minimieren. Bei Vorliegen von erhöhten cTn-Konzentrationen in Abwesenheit von klinischen Hinweisen auf eine Ischämie ist eine Suche nach anderen mit myokardialer Zellschädigung assoziierten Erkrankungen (kardial oder extrakardial) angezeigt (THYGESEN et al., 2007).

#### **2.4.1.2. Risikostratifizierung und Management**

Neben der Verwendung als bedeutendes Diagnostikum für einen AMI kommen die cTn auch zur Risikostratifizierung von Patienten mit ACS zum Einsatz (MORROW et al., 2007). Verschiedene Studien an Patienten mit ACS konnten eine enge Korrelation zwischen erhöhten cTn-Konzentrationen und dem Schweregrad einer epikardialen Koronararterienerkrankung sowie einer reduzierten myokardialen mikrovaskulären Perfusion nachweisen (HAMM et al., 1999; WONG et al., 2002). Des Weiteren stellen die cTn hilfreiche Richtwerte bezüglich des Patientenmanagements dar. MORROW und Mitarbeiter konnten



nachweisen, dass Patienten mit einem klinisch gesicherten ACS und nur geringgradig erhöhten cTn-Konzentrationen ein deutlich höheres Risiko für einen erneuten Myokardinfarkt oder den Tod zu erleiden aufwiesen. Solche Patienten profitieren von einem frühzeitigen invasiven Management (Koronarangiographie mit anschließender Revaskularisation), im Vergleich zu einer konservativen Therapie. Im Gegensatz dazu war ein frühes invasives Vorgehen bei Patienten ohne erhöhte cTn-Konzentrationen mit keinem klinischen Vorteil assoziiert (MORROW et al., 2001). Das Ausmaß der zeitlichen cTn-Konzentrationsveränderungen erlaubt eine Differenzierung zwischen einem AMI und chronisch erhöhten cTn-Konzentrationen, wie sie beispielsweise bei anderen kardialen oder extrakardialen Krankheiten auftreten. Die cTn-Kinetik kann aber auch zur Beurteilung eines thrombolytischen Therapieerfolgs und der damit verbundenen Reperfusion der betroffenen Arterie herangezogen werden. Folglich ist das frühzeitige Auftreten von cTn-Spitzenkonzentrationen mit einer erfolgreichen Thrombolyse und Reperfusion vergesellschaftet (positiver prädiktiver Wert > 90 %) (TANASIJEVIC et al., 1999; DE LEMOS et al., 2001). Besteht bei einem Patienten aufgrund der von ihm gezeigten klinischen Symptome der Verdacht auf eine Reinfarktion ist eine sofortige cTn-Analyse indiziert, wobei ein 20%iger Anstieg der cTn-Konzentration die Diagnose Reinfarktion bestätigt (APPLE & MURAKAMI, 2005; JAFFE, 2008). Des Weiteren kann mittels cTn-Bestimmungen der Therapieerfolg eines CHF ermittelt werden, da nach erfolgreicher Therapie der akuten Episode, die cTn-Werte häufig wieder in den Referenzbereich abfallen (LA VECCHIA et al., 2000).

#### **2.4.1.3. Prognose**

Neben dem Einsatz in der Diagnostik, der Risikostratifizierung sowie dem Management eines AMI, weisen die cTn auch eine prognostische Aussagekraft auf. Bei Patienten mit klinischen Anzeichen einer Ischämie und erhöhten cTn-Werten konnte, im Vergleich zu Patienten mit in der Zirkulation nicht nachweisbaren cTn, ein schlechteres Outcome festgestellt werden (KONTOS et al., 2004; EGGERS et al., 2007). Ein Nachweis von zirkulierenden cTn anhand von hs cTn-Assays wies bei Patienten, die an stabilen Erkrankungen der Koronararterien leiden, ebenfalls auf eine höhere Inzidenz des Herzversagens und des kardiovaskulär bedingten Todes hin (OMLAND et al., 2009). Dabei ist die Prognose der Patienten mit einer durch Ischämie verursachten myokardialen

Zellschädigung von dem Ausmaß der Konzentrationserhöhung abhängig (STUBBS et al., 1996; MORROW et al., 2001; HASSAN et al., 2009). In einer von HASSAN und Mitarbeiter durchgeführten Studie konnte nachgewiesen werden, dass anhand der cTnT-Spitzenkonzentration Aussagen über die vorliegende Infarktgröße, die linksventrikuläre Funktion innerhalb drei Monaten sowie über das Auftreten von nachteiligen kardialen Ereignissen innerhalb eines Jahres getroffen werden können (HASSAN et al., 2009). Des Weiteren stellten sich die cTn als potente Indikatoren für rezidivierende ischämische Ereignisse bei Patienten mit ACS heraus, wobei auch das Sterberisiko innerhalb dieser Patientenpopulation bewertet werden konnte (HEIDENREICH et al., 2001). Patienten, die an einem ACS erkrankt waren, wiesen eine höhere Mortalitätsrate auf, falls zum Vorstellungszeitpunkt erhöhte cTnI-Konzentrationen festgestellt wurden. Das Ausmaß des cTn-Anstiegs scheint hierbei mit dem Mortalitätsrisiko zu korrelieren (ANTMAN et al., 1996). Auch bei den nicht durch ein ACS bedingten Ursachen, wiesen erhöhte cTn-Konzentrationen auf eine nachteilige Prognose hin (AMMANN et al., 2003; ANAND et al., 2004; WAXMAN et al., 2006).

#### **2.4.1.4. Vor- und Nachteile von hochsensitiven Assays**

Verschiedene Studien, die die Anwendung von hs cTn-Assays (Nachweisgrenze unterhalb der 99. Perzentile einer gesunden Referenzpopulation) untersuchten, konnten hinsichtlich der Identifikation von Patienten mit AMI eine signifikante Verbesserung der Sensitivität, im Vergleich zu konventionellen cTn-Tests, nachweisen. APPLE und Mitarbeiter evaluierten die diagnostische Präzision des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays der Firma Siemens Medical Solutions Diagnostics (Referenzwert der 99. Perzentile  $\leq 0,04$  ng/ml) für die Diagnose eines AMI. Hierbei wurden Plasmaproben von Patienten mit ACS zum Zeitpunkt der Vorstellung (Baseline-Wert) sowie sechs bis 24 Stunden (Follow-up-Wert) später analysiert. Die Verwendung der Baseline-cTnI-Konzentrationen ergab eine Sensitivität von 74 %, was eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu den von konventionellen cTn-Tests gezeigten Sensitivitäten (3 - 33 %) darstellt (TUCKER et al., 1997; ZIMMERMAN et al., 1999; NEWBY et al., 2001). Auch die Sensitivität der Follow-up-Konzentrationen zeigte, im Vergleich zu den konventionellen Tests (50 – 92 %) (TUCKER et al., 1997; ZIMMERMAN et al., 1999; NEWBY et al., 2001), mit 94% eine Optimierung. Allerdings war die

Verbesserung der Sensitivität mit einer Abnahme der Spezifität für die Diagnose eines AMI verbunden. CTn-Assays der ersten Generation wiesen klinische Spezifitäten von über 90 % auf (JAFFE et al., 2006). Dagegen lag diese für den ADVIA Centaur® TnI-Ultra bei 84 % für die Baseline-Konzentrationen und bei 81 % für die Follow-up-Konzentrationen (APPLE et al., 2008b). Diese Reduktion der Spezifität verdeutlicht, dass durch die Anwendung von hs cTn-Tests der Anteil an Patienten mit erhöhten cTn-Konzentrationen, verursacht durch andere Erkrankungen als einen AMI, angestiegen ist (KELLER et al., 2009; REICHLIN et al., 2009). Aus diesem Grund werden serielle Blutentnahmen zur Beurteilung der cTn-Kinetik empfohlen, um Fehldiagnosen zu vermeiden (FESMIRE, 2001; APPLE et al., 2009). Gegenüber den Standard-cTn-Assays konnten REICHLIN und Mitarbeiter bei verschiedenen hs Tests ebenfalls eine signifikant höhere diagnostische Präzision zum Zeitpunkt der Vorstellung sowie innerhalb der ersten drei Stunden, nach Auftreten von Symptomen eines AMI nachweisen (REICHLIN et al., 2009). In einer weiteren Studie stieg dadurch die Identifikation von Patienten mit erhöhten cTnI-Konzentrationen zum Vorstellungszeitpunkt um 61 % an. Dagegen ergab ein konventioneller Test initial negative cTnI-Resultate und ein Anstieg der cTnI-Konzentration konnte erst zu einem späteren Zeitpunkt detektiert werden (MELANSON et al., 2007). Der Einsatz von hs cTn-Assays war demnach mit einem bedeutenden Fortschritt in der Frühdiagnostik des ACS verbunden und Patienten, die von einem invasivem Management profitieren würden, konnten frühzeitig identifiziert werden (VENGE et al., 2002; EGGERS et al., 2004; AMODIO et al., 2007; REICHLIN et al., 2009). Aufgrund der verbesserten analytischen Sensitivität der cTn-Assays wurde ein deutlicher Rückgang in der Diagnosestellung einer instabilen *Angina pectoris* von 60 % auf 30 % vernommen (JAMES et al., 2003). Mit der Einführung von hs cTn-Tests wird die Häufigkeit dieser Diagnose voraussichtlich weiterhin abnehmen (MOHAMMED & JANUZZI, 2010). Bei Patienten mit anhand von konventionellen Tests diagnostizierter instabiler *Angina pectoris* (serielle negative Testergebnisse) konnte unter Verwendung eines hs cTnI-Tests ein Anstieg der cTnI-Konzentration nachgewiesen werden. Den Autoren zufolge sind durch eine Ischämie bedingte Schmerzen im Ruhezustand nur in seltenen Fällen nicht mit einer myokardialen Zellschädigung verbunden (WILSON et al., 2009). Auch der Nachweis einer durch Chemotherapeutika verursachten Kardiotoxizität war anhand von hs cTn-Assays zu einem früheren Zeitpunkt möglich

(MOHAMMED & JANUZZI, 2010). Hinsichtlich der Risikostratifizierung nach Auftreten eines AMI wiesen Assays mit hohen Sensitivitäten außerdem eine bessere prädiktive Aussagekraft auf. Jegliche cTn-Konzentration deren Wert die 99. Perzentile einer gesunden Referenzpopulation überschritten hat, war bei Patienten mit ACS mit einer höheren Mortalität assoziiert (NEWBY et al., 2001).

#### 2.4.2. Tiermedizin

Die cTn wurden bereits bei etlichen Spezies (Ratten, Mäusen, Hamstern, Kaninchen, Meerschweinchen, Hunden, Katzen, Schweinen, Pferden, Rindern, Schafen, nicht-humane Primaten) untersucht, um unter anderem deren Anwendbarkeit als nichtinvasives Diagnostikum in der Human- und Tiermedizin zu evaluieren (GUNES et al., 2010). Zahlreiche Studien an verschiedenen Tierarten konnten erhöhte cTn-Konzentrationen bei diversen Krankheiten und Konditionen nachweisen (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Krankheiten/Konditionen bei verschiedenen Tierarten, die mit einer Erhöhung der cTn-Konzentration assoziiert sind (WELLS & SLEEPER, 2008; WELLS et al., 2009; SERRA et al., 2010; SNYDER et al., 2010).

<b>Kardiale Ursachen</b>	Kongestives Herzversagen
	Hypertrophe und dilatative Kardiomyopathie
	Endokardiose
	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (Boxer)
	Subaorten- und Pulmonalstenose
	Myokarditis
	Perikarderguss
	Experimentell induzierter Myokardinfarkt
	Atrioventrikulärer Block 3. Grades
<b>Infektionskrankheiten</b>	Babesiose
	Ehrlichiose
	Leptospirose
	Maul- und Klauenseuche
	Sepsis

<b>Toxische Ursachen</b>	Adrenergika (Isoproterenol, Phenylpropanolamin)
	Doxorubicin, Daunorubicin
	Monensin
	Fumonisin B1
	Schlangengifte
<b>Sonstige Ursachen</b>	Trauma (Kontusion, traumatische Reticuloperitonitis, kardiale Punktion)
	Magendilatation und –volvulus
	Pulmonale Krankheiten (extrakardiale Dyspnoe)
	Pyometra
	Hypoxie
	Nierenversagen
	Epilepsie
	Hochgradige Anstrengung
	Thromboembolie
	Feline Hyperthyreose
	Anämie (Hämatokrit < 20 %)
	Pankreatitis
	Viszerale Neoplasien, Lymphom, intrakranielles Meningiom
	Unkontrollierter Hyper- und Hypoadrenokortizismus
	Schwerwiegende Kolik
	Signifikanter Gewichtsverlust
	Steroidresponsive Meningitis-Arteritis
Rhabdomyolyse	
Hitzschlag	

Demnach stellen die cTn auch beim Tier hs und spezifische Biomarker einer myokardialen Zellschädigung dar, unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache für die Myokardschädigung. Hierbei korreliert der Konzentrationsanstieg der cTn ebenfalls mit dem Schweregrad des Myokardschadens (CUMMINS & CUMMINS, 1987; VOSS et al., 1995; O'BRIEN et al., 1997a; RICCHIUTI et al., 1998b; ADAMS, 1999). Ein progressiver Anstieg der cTn-Konzentration bei seriellen Messungen ist mit einer andauernden Herzmuskelnekrose und einer schlechten Prognose vergesellschaftet (CUMMINS & CUMMINS, 1987; RICCHIUTI et al., 1998b; ADAMS, 1999).

### 2.4.2.1. Anwendung beim Hund

Bei gesunden Hunden sind die cTn nicht oder nur in geringen Mengen in der Zirkulation nachweisbar (O'BRIEN et al., 1997a; SCHOBER et al., 1999; SLEEPER et al., 2001; DEFRANCESCO et al., 2002). Dagegen können kardiale sowie diverse extrakardiale Erkrankungen mit einer myokardialen Zellschädigung assoziiert sein und folglich zu einem Konzentrationsanstieg der cTn in der Zirkulation führen. Obwohl die diagnostische Aussagekraft der cTn praktisch gleichzusetzen ist, konnte in einer Metaanalyse von SCHOBER und Mitarbeitern nachgewiesen werden, dass das cTnI im Vergleich zu dem cTnT, zu einem früheren Zeitpunkt und frequenter ansteigt (SCHOBER et al., 2002b). Die für dieses Phänomen zugrundeliegende Ursache ist derzeit noch weitgehend ungeklärt. Allerdings wird eine stärkere strukturelle Bindung zwischen dem cTnT und dem Tropomyosin vermutet (PROSEK & ETTINGER, 2010). Des Weiteren weist cTnT eine etwas geringere Spezifität als das cTnI auf, da eine Niereninsuffizienz mit einem unspezifischen cTnT-Konzentrationsanstieg assoziiert ist. Außerdem kann unter bestimmten Bedingungen cTnT in der Skelettmuskulatur gebildet werden, wobei die cTnT-Assays der zweiten und dritten Generation allerdings in der Lage sind kardiales cTnT von Skelettmuskelisformen zu differenzieren (WILLGING et al., 1998; ADAMS, 1999).

Für die Bestimmung des caninen cTnI kamen aufgrund der fehlenden Standardisierung diverse Assays aus der Humanmedizin zum Einsatz. Bei dem in vorliegender Dissertation für den Dobermann zu evaluierenden ADVIA Centaur® TnI-Ultra handelt es sich um einen hs cTnI-Assay der Firma Siemens Healthcare Diagnostics (Eschborn, Deutschland).

Nach Wissen des Autors wurde der ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay bis dato lediglich in zwei veröffentlichten Studien beim Hund angewendet. APPLE und Mitarbeiter führten cTn-Analysen bei verschiedenen Spezies unter Anwendung von diversen kommerziell erhältlichen cTn-Immunoassays durch. In dieser Studie konnte anhand von cTnI-Messungen aus Serumproben von Beagle Hunden mittels des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays eine gute Immunoreaktivität ermittelt werden. Die analytische Impräzision ergab einen VK < 20 % (APPLE et al., 2008a). In einer kürzlich von Serra und Mitarbeitern durchgeführten Studie wurde ebenfalls die Anwendung von verschiedenen cTn-Assays, inklusive dem ADVIA

Centaur® TnI-Ultra, bei Hunden, Katzen, Pferden, Milchvieh, Ratten und Kaninchen evaluiert. Eine Detektion erhöhter cTnI-Konzentrationen bedingt durch eine primäre (kardiale Erkrankungen oder Applikation von kardiotoxischen Substanzen) oder sekundäre (extrakardiale Erkrankungen) myokardiale Zellschädigung konnten mit Hilfe des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays bei allen Spezies nachgewiesen werden. Dagegen wiesen gesunde Hunde, Katzen und Milchkühe cTnI-Konzentrationen  $\leq 0,052$  ng/ml und gesunde Pferde sogar sechsfach niedrigere cTnI-Konzentrationen als die erstgenannten drei Spezies auf (SERRA et al., 2010).

#### **2.4.2.1.1. Kardial bedingter Troponin-Konzentrationsanstieg**

Im Vergleich zum Menschen, bei dem die häufigste Ursache für einen Myokardinfarkt eine Arteriosklerose darstellt, tritt dieses Krankheitsbild beim Hund äußerst selten auf. Bei dieser Spezies wird dagegen ein Myokardinfarkt meist durch eine septische Embolie einer Koronararterie sekundär zu einer bakteriellen Endokarditis verursacht (KITTLESON, 1998). Anhand von experimentell induzierten Myokardinfarkten bei Hunden konnte ermittelt werden, dass etwa drei bis vier Stunden nach Induktion die cTn in der Zirkulation ansteigen. Dabei erreichten das cTnI eingipflig, nach zwölf bis 16 Stunden und das cTnT zweigipflig, nach 24 und 120 Stunden ihre Maximalspiegel (VOSS et al., 1995; RICCHIUTI et al., 1998b). Anschließend kam es zu einer allmählichen Reduktion der cTn-Blutkonzentrationen. Physiologische Werte der cTnI-Konzentration wurden nach acht bis zehn Tagen und der cTnT-Konzentration nach zehn bis 14 Tagen erreicht. Des Weiteren wurde eine positive Korrelation zwischen den absoluten cTn-Serumspiegeln und der Infarktgröße nachgewiesen (CUMMINS & CUMMINS, 1987; VOSS et al., 1995; O'BRIEN et al., 1997a; RICCHIUTI et al., 1998b). Die von Hunden gezeigte zeitliche cTn-Kinetik sowie das Ausmaß des Konzentrationsanstiegs ist mit der des Menschen vergleichbar (MAIR et al., 1995a; MAIR et al., 1995b). Hunde, die an einer Mitralklappenendokardiose (ME), DCM oder Subaortenstenose (SAS) erkrankt waren, konnten anhand der cTn-Konzentrationen identifiziert werden. Dabei schien das Ausmaß des Konzentrationsanstiegs mit dem Schweregrad der Erkrankung sowie der Prognose zu korrelieren (DEFRANCESCO et al., 2002; OYAMA & SISSON, 2004; TARDUCCI et al., 2004; SPRATT et al., 2005). SPRATT und Mitarbeiter untersuchten den diagnostischen Wert von cTnI sowohl

bei erworbenen (Perikarderguss (PE), ME, DCM) als auch bei angeborenen (persistierender Ductus Arteriosus Botalli (PDA), Ventrikelseptumdefekt (VSD), Pulmonalstenose (PS), SAS) Herzerkrankungen. Im Vergleich zu den herzgesunden Kontrolltieren wiesen die Hunde mit erworbenen Herzkrankheiten signifikant höhere cTnI-Konzentrationen auf, wobei Tiere mit klinischen Symptomen eines CHF die höchsten Werte erreichten (SPRATT et al., 2005). Im Gegensatz dazu konnte bei Hunden mit angeborenen Herzerkrankungen kein signifikanter cTn-Konzentrationsanstieg nachgewiesen werden, was mit Untersuchungsergebnissen von pädiatrischen Patienten in der Humanmedizin übereinstimmt (TAGGART et al., 1996; HIRSCH et al., 1997; LIPSHULTZ et al., 1997). Konträre Resultate ergab allerdings eine weitere Studie, in der bei sieben von 23 (30,4 %) Hunden mit hochgradiger PS, cTnI-Werte oberhalb des Referenzbereichs sowie eine positive Korrelation zwischen dem cTnI-Serumspiegel und dem maximalen Druckgradienten über der Pulmonalklappe nachgewiesen werden konnte (SAUNDERS et al., 2009). Des Weiteren wurde die vorherig genannte Studienpopulation von SPRATT und Mitarbeitern gemäß der International Small Animal Cardiac Health Council's (ISACHC) Klassifikation (Anhang Tabelle 21) unterteilt. Hunde in Klasse II und IIIA wiesen signifikant höhere cTnI-Blutkonzentrationen auf als herzgesunde Patienten oder solche in Klasse IA und IB. Unter Verwendung eines cTnI Cut-off-Wertes von 0,095 ng/ml konnten mit einer Sensitivität von 96 % und einer Spezifität von 88 % Patienten ab der ISACHC Klasse II identifiziert werden (SPRATT et al., 2005). OYAMA und SISSON konnten ebenfalls einen signifikanten Unterschied in der cTnI-Blutkonzentration bei Hunde mit kardialen Erkrankungen (ME, DCM, SAS) und gesunden Kontrolltieren feststellen, wobei 47 % von 93 herzkranken Patienten erhöhte cTnI-Werte aufwiesen (OYAMA & SISSON, 2004). Im Gegensatz zu der vorherig genannten Studie war das Vorliegen einer SAS mit einem signifikanten cTnI-Konzentrationsanstieg assoziiert, was mit der größeren Patientenanzahl (30 versus zwei) in Verbindung gebracht werden kann (OYAMA & SISSON, 2004; SPRATT et al., 2005). Eine mäßige aber signifikante Korrelation bestand bei Hunden mit einer ME, DCM oder SAS zwischen der kardialen Hypertrophie (exzentrisch oder konzentrisch) und der cTnI-Konzentration. Des Weiteren korrelierte die cTnI-Konzentration, im Falle einer ME oder DCM mit der linksventrikulären systolischen Funktion. Unter Anwendung eines cTnI Cut-off-Wertes von 0,2 ng/ml konnte eine prognostische



Signifikanz bei Hunden, die an einer DCM erkrankt waren, ermittelt werden. Patienten mit cTnI-Konzentrationen oberhalb dieses Grenzwertes wiesen eine mediane Überlebenszeit von 112 Tagen auf, wohingegen ein cTnI-Wert unter 0,2 ng/ml mit einer deutlich längeren Überlebenszeit (357 Tagen) vergesellschaftet war (OYAMA & SISSON, 2004). LJUNGVALL und Mitarbeiter konnten mit ihren Untersuchungen ebenfalls einen cTnI-Konzentrationsanstieg mit zunehmenden Schweregrad der ME bestätigen. Nachweisbare cTnI-Konzentrationen konnten bei 67 % der gesamten Studienpopulation (81 Hunde) festgestellt werden, wobei ein signifikanter Unterschied in der cTnI-Konzentration zwischen allen vier Studiengruppen (gesund: Verhältnis zwischen dem linken Atrium (LA) und der Aorta (Ao)  $< 1,5$ , keine Mitralklappeninsuffizienz (MI); milde ME:  $La/Ao \leq 1,5$ ,  $MI-Jet < 30 \%$ ; moderate ME:  $La/Ao < 1,8$ ,  $MI-Jet < 50 \%$ ; schwerwiegende ME:  $La/Ao \geq 1,8$ ,  $MI-Jet > 50 \%$ ) ermittelt werden konnte. Patienten, die an einer moderaten oder schwerwiegenden ME erkrankt waren, wiesen signifikant höhere cTnI-Resultate auf als herzgesunden Hunde. Außerdem war eine hochgradige ME, im Vergleich zu den mild und moderat erkrankten Hunden, mit signifikant höheren cTnI-Konzentrationen assoziiert (LJUNGVALL et al., 2010). Untersuchungsergebnisse von GUGLIELMINI und Mitarbeitern stimmten mit vorherig genannten Erkenntnissen überein. Hunde mit dekompensierter ME und nachweisbarer pulmonaler Hypertension (PH) zeigten signifikant höhere cTnI-Konzentrationen als Patienten mit kompensierter ME (mit oder ohne PH) oder herzgesunde Kontrolltiere. Der Vergleich zwischen den dekompensierten Hunden mit und ohne PH ergab keinen signifikanten cTnI-Konzentrationsunterschied. Des Weiteren konnte kein signifikanter Unterschied in der cTnI-Konzentration zwischen Patienten mit präkapillärer PH und jenen mit dekompensierter ME (mit oder ohne PH) ermittelt werden. Eine mäßige, aber signifikante Korrelation wurde bei Hunden mit PH zwischen der Höhe des cTnI-Serumspiegels und dem kalkulierten systolischen Druck in der Pulmonalarterie gefunden. Bei Hunden mit ME (mit oder ohne PH) korrelierte die cTnI-Konzentration außerdem mit folgenden echokardiographischen Parametern:  $LA/Ao$ ,  $LVIDd/Ao$  und  $LVIDs/Ao$ . Kein Zusammenhang konnte dagegen mit der Verkürzungsfraction (Fractional Shortening = FS) ermittelt werden (GUGLIELMINI et al., 2010).

Hunde im okkulten Stadium einer DCM zeigten, im Vergleich zu herzgesunden Patienten ebenfalls signifikant höhere cTnI-Serumspiegel. Für die Identifikation solcher Patienten wies das cTnI in einer Studie allerdings nur eine relativ niedrige prädiktive Aussagekraft auf. Unter Verwendung eines Cut-off-Wertes von 0,03 ng/ml betrug die Sensitivität 88,9 %, die Spezifität dagegen nur 41,8 %, wodurch überwiegend falsch-positive Testergebnisse entstanden (OYAMA et al., 2007). In einer aus 336 Dobermännern bestehenden Studienpopulation konnte anhand von insgesamt 653 cTnI-Analysen ein signifikanter cTnI-Konzentrationsanstieg bei an der DoCM erkrankten Hunden, im Vergleich zu herzgesunden Dobermännern, detektiert werden. Innerhalb der drei verschiedenen Subgruppen des okkulten Krankheitsstadiums (ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen, Kombination aus VES und echokardiographischen Veränderungen) lag kein signifikanter Unterschied in der cTnI-Konzentration vor. Dagegen wiesen die symptomatischen, dekompensierten Patienten, im Vergleich zu jenen im okkulten Stadium, signifikant höhere cTnI-Serumspiegel auf. Sogar klinisch unauffällige Dobermänner, die zum Untersuchungszeitpunkt mittels des diagnostischen Goldstandards als herzgesund beurteilt wurden, aber in der Folgeuntersuchung (maximaler Zeitabstand von 18 Monaten) Abnormalitäten im 24-Stunden-EKG und/oder der echokardiographischen Untersuchung aufwiesen, zeigten einen signifikant erhöhten cTnI-Serumspiegel. Anhand eines Cut-off-Wertes von 0,22 ng/ml konnten mit einer Sensitivität von 78,9 % und einer Spezifität von 87,3 % alle der oben genannten Krankheitsgruppen sowie die Patienten mit einer beginnenden, aber mit dem diagnostischen Goldstandard noch nicht nachweisbarer DoCM, ermittelt werden. Demnach konnten mithilfe dieses Grenzwertes echokardiographische (Sensitivität 86,6 %, Spezifität 87,3 %) sowie elektrokardiographische (Sensitivität 70,5 %, Spezifität 87,3 %) Abnormalitäten vorhergesagt werden. Kein Zusammenhang konnte zwischen der cTnI-Konzentration und der Anzahl an VES innerhalb 24 Stunden detektiert werden. Diesen Studienergebnissen zufolge stellt die cTnI-Analyse vor allem in der frühen, mit dem diagnostischen Goldstandard noch nicht nachweisbaren Phase der DoCM, ein nützlicher zusätzlicher Screening-Test dar (WESS et al., 2010b). Untersuchungen bei Boxern, die an einer Arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) erkrankt waren, ergaben ebenfalls einen signifikanten Anstieg der cTnI-Konzentration gegenüber gesunden Boxern. Allerdings konnte

hier eine signifikante Korrelation zwischen der cTnI-Konzentration und der Anzahl an VES in 24 Stunden identifiziert werden. Außerdem bestand ein Zusammenhang zwischen dem cTnI-Spiegel und der Komplexität der ventrikulären Arrhythmien (BAUMWART et al., 2007).

Erkrankungen des Perikards stellten sich als eine weitere kardiale Ursache für einen Anstieg der cTnI-Konzentration heraus. Hunde mit PE zeigten im Vergleich zu herzgesunden Kontrolltieren signifikant höhere cTnI-Serumspiegel (SHAW et al., 2004; LINDE et al., 2006). Für cTnT konnte dagegen kein Konzentrationsunterschied detektiert werden. Im Gegensatz zu einem idiopathischen PE war ein kardiales Hämangiosarkom als zugrundeliegende Ursache mit signifikant höheren cTnI-Werten assoziiert. Zwischen den beiden letztgenannten Gruppen konnte ebenfalls keine Differenz in der cTnT-Konzentration festgestellt werden. Des Weiteren bestand keine Korrelation zwischen der gemessenen Größe des Hämangiosarkoms und dem cTnI-Serumspiegel (SHAW et al., 2004). Eine retrospektive Studie von LINDE und Mitarbeitern konnte allerdings die diagnostische Anwendbarkeit von cTnI zur Differenzierung der zugrundeliegenden Ätiologie eines PE nicht bestätigen. Hunde mit idiopathischem PE wiesen im Vergleich zu Patienten mit einem neoplastisch (unter anderem Hämangiosarkom) bedingten PE, keinen signifikanten Unterschied in der mittleren cTnI-Konzentration auf (LINDE et al., 2006). CHUN und Mitarbeiter stellten einen Vergleich zwischen den cTnI-Konzentrationen von Hunden mit kardialem Hämangiosarkom, extrakardialem Hämangiosarkom, nicht durch ein Hämangiosarkom bedingter PE (idiopathischer PE, Perikarditis, Melanom, Mesotheliom, Chemodektom) und Hunden mit anderen extrakardialen Neoplasien als ein Hämangiosarkom auf. Die cTnI-Analysen bei Hunde mit kardialem Hämangiosarkom waren gegenüber den anderen drei Gruppen mit einer signifikant erhöhten mittleren cTnI-Plasmakonzentration assoziiert, was wiederum mit den vorherig genannten Resultaten von SHAW und Mitarbeitern übereinstimmt. Zwischen den drei übrigen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der cTnI-Konzentration detektiert werden. Des Weiteren wurde ein Cut-off-Wert zur Differenzierung der zugrundeliegenden Ätiologie eines PE ermittelt. Anhand von cTnI-Resultaten, die eine Konzentration von 0,25 ng/ml überschritten, konnten mit einer Sensitivität von 81 % und einer Spezifität von 100 % Hunde mit einem durch ein

Hämangiosarkom bedingten PE identifiziert werden. cTnI-Plasmakonzentrationen von 2,45 ng/ml oder höher (Sensitivität von 44 % und Spezifität von 100 %), wiesen dagegen bei Patienten mit extrakardialen Hämangiosarkom auf eine kardiale Beteiligung hin (CHUN et al., 2010).

In einer von FONFARA und Mitarbeitern durchgeführten Studie erwies sich das cTnI ebenfalls als ein nützlicher Biomarker sowohl zur Beurteilung des Schweregrads als auch der Prognose einer Herzerkrankung. Hunde deren cTnI-Analysen Werte unter 0,15 ng/ml ergaben wurden entweder als herzgesund beurteilt oder wiesen stabile Herzkrankheiten (kongenital oder erworben) in einem frühen Krankheitsstadium auf. Außerdem waren derartig niedrige cTnI-Serumspiegel mit den längsten Überlebenszeiten vergesellschaftet. cTnI-Konzentrationen über 0,15 ng/ml waren dagegen mit einem weiter fortgeschrittenen kardialen Krankheitsstadium und einer signifikanten Reduktion der Überlebenszeit verbunden. Patienten mit cTnI-Konzentrationen zwischen 0,151 und 1,0 ng/ml überlebten im Durchschnitt 24 Monate, wohingegen eine cTnI-Konzentration über 1,01 ng/ml mit einer medianen Überlebenszeit von drei Monaten assoziiert war. Bei Hunden mit Serumkonzentrationen über 1,01 ng/ml konnte anhand einer einmalig durchgeführten cTnI-Messung keine Differenzierung zwischen Patienten, die überlebten und solchen die verstarben, erfolgen. Überlebende Patienten zeigten allerdings in einer Folgeuntersuchung nach maximal zwei Monaten eine signifikante Reduktion der cTnI-Konzentration, im Vergleich zu jenen Hunden, die verstarben. Diesen Untersuchungsergebnissen zufolge konnten anhand von seriellen cTnI-Analysen sowohl die Progression einer kardialen Erkrankung als auch das Ansprechen auf eine kardiale Therapie evaluiert werden. Hierbei stellten cTnI-Serumspiegel, die den Wert von 1,0 ng/ml überschritten sowie ein persistenter Anstieg der cTnI-Konzentration Indikatoren einer schlechten Prognose dar (FONFARA et al., 2010b).

SCHÖBER und Mitarbeiter konnten bei fünf von sieben Hunden mit bakterieller Endokarditis erhöhte cTn-Serumspiegel ermitteln (cTnI bis maximal 131,2 ng/ml und cTnT bis 1,60 ng/ml). Bei weiteren 13 Hunden bestand der Verdacht auf eine Myokarditis aufgrund von elektrokardiographisch erhobenen Befunden. Mittels wiederholten cTn-Analysen konnte bei vier Patienten diese Verdachtsdiagnose bestätigt werden (cTnI maximal 420,4 ng/ml und cTnT bis 2,39 ng/ml). Positive histopathologische Resultate lagen zusätzlich bei zwei Hunden vor. Dagegen

konnte bei acht Hunden anhand der seriellen cTn-Messungen eine Myokarditis ausgeschlossen werden (SCHOBER et al., 2002b).

Des Weiteren wurde der Effekt von kardiovaskulären Katheterisationen auf die canine cTnI-Konzentration untersucht. Ein signifikanter Anstieg der cTnI-Konzentration konnte 24 – 240 Stunden nach einer Ballonvalvuloplastie sowie einer Schrittmacherimplantation detektiert werden. Eine solche statistische Signifikanz konnte dagegen nach einer transarteriellen Coilembolisation zum Verschluss eines PDA nicht ermittelt werden. Patienten deren Intervention mit einem größeren Zeitaufwand verbunden war, wiesen dabei signifikant höhere cTnI-Werte auf. Demnach sind diese einem höheren Risiko, eine myokardiale Zellschädigung zu erleiden ausgesetzt. Kein Zusammenhang konnte zwischen der cTnI-Konzentration und perioperativen Komplikationen oder dem Kurzzeit-Outcome (zehn Tage) beobachtet werden (SAUNDERS et al., 2009; SHIH et al., 2009).

In verschiedenen Studien konnten erhöhte cTnI-Werte bei Hunden mit Bradyarrhythmien (kompletter atrioventrikulärer (AV)-Block, AV-Block zweiten Grades Typ High Grade, Sick Sinus Syndrome, Vorhofstillstand) detektiert werden (CHURCH et al., 2007; SHIH et al., 2009; FONFARA et al., 2010a; TRAFNY et al., 2010). Zum Vorstellungszeitpunkt wiesen Hunde mit Bradyarrhythmien, unabhängig von deren zugrundeliegender Ätiologie, signifikant erhöhte cTnI-Serumspiegel auf. Eine Schrittmacherimplantation war zwar mit einer signifikanten Reduktion der cTnI-Konzentrationen vergesellschaftet, allerdings lagen diese bei 64 - 82 % auch post-interventionell oberhalb des Referenzbereiches (SHIH et al., 2009; FONFARA et al., 2010a; TRAFNY et al., 2010).

Bedauerlicherweise ist der Nutzen dieser Untersuchungsergebnisse aufgrund der fehlenden Standardisierung der cTnI-Assays limitiert, da ein Vergleich von cTnI-Werten, die von unterschiedlichen Geräten analysiert wurden nicht stattfinden kann (ADIN et al., 2006). Ähnliche Studien, die unter Anwendung von cTnT-Assays durchgeführt wurden, konnten bei etwa 30 % der Hunde mit erworbenen Herzerkrankungen gesteigerte cTnT-Serumspiegel nachweisen. Diese Resultate stehen im Einklang mit jenen Untersuchungen, die zeigen konnten, dass das cTnI im Vergleich zu dem cTnT eine höhere Sensitivität aufweist (DEFRANCESCO et al., 2002; TARDUCCI et al., 2004).

#### **2.4.2.1.2. Extrakardial bedingter Troponinkonzentrationsanstieg**

Neben kardialen Krankheiten existieren diverse extrakardiale Ursachen, die zu einer sekundären myokardialen Zellschädigung und folglich zu einem Anstieg des cTnI-Serumspiegels führen. Sowohl bei gesunden Menschen als auch bei gesunden Hunden stellte sich das Alter als physiologischer Einflussfaktor auf die cTnI-Konzentration heraus, wobei ein höheres Lebensalter mit einem signifikanten Anstieg dieser assoziiert war (OYAMA & SISSON, 2004; O'BRIEN et al., 2006; CLERICO et al., 2008; SAUNDERS et al., 2009; LJUNGVALL et al., 2010; SERRA et al., 2010; WESS et al., 2010b). Demgegenüber konnte beim Hund keine Korrelation zwischen der cTnI-Konzentration und dem Geschlecht festgestellt werden (WESS et al., 2010b). Ein Zusammenhang zwischen dem cTnI-Blutspiegel und dem Körpergewicht wird dagegen kontrovers diskutiert (SAUNDERS et al., 2009; SERRA et al., 2010; WESS et al., 2010b).

Des Weiteren wurde der Einfluss von körperlicher Belastung auf den cTnI-Serumspiegel untersucht. Schlittenhunde, die an zwei aufeinanderfolgenden Tagen an einem Kurzstreckenrennen (25,7 Kilometer (km) in 52 – 60 Minuten) teilnahmen, zeigten unmittelbar nach beiden Rennen einen geringen aber signifikanten Konzentrationsanstieg. Hierbei wurde der obere Referenzbereich allerdings nicht überschritten (WAKSHLAG et al., 2010). Im Gegensatz dazu konnten signifikant erhöhte und den Referenzwert überschreitende cTnI-Konzentrationen bei Schlittenhunden während eines fünftägigen Langstreckenrennens (160 km pro Tag) nachgewiesen werden (MCKENZIE et al., 2007). Untersuchungen an gesunden Racing Greyhounds, die nicht an einem Rennen teilgenommen hatten, konnten im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren anderer Hunderassen eine signifikant höhere mittlere cTnI-Konzentration (0,10 ng/ml versus 0,02 ng/ml) eruieren (LAVECCHIO et al., 2009).

In zwei Studien an Hunden, die ein stumpfes Thoraxtrauma und folglich eine Myokardkontusion erlitten, wurde in 55 % (SCHOBER et al., 1999) und 75 % (BURGENER et al., 2006) der Fälle serologisch erhöhte cTnI-Konzentrationen nachgewiesen, wobei die posttraumatischen Maximalkonzentrationen nach zwölf bis 24 Stunden erreicht waren.

Kardiovaskuläre Komplikationen (myokardiale Degeneration und Nekrose) konnten auch im Zusammenhang mit einem Magentorsion-Volvulus-Komplex festgestellt werden. Von 85 Hunden mit diagnostizierter Magendrehung konnten

bei 87 % erhöhte cTnI- und bei 51 % erhöhte cTnT-Konzentrationen nachgewiesen werden, wobei die höchsten Werte 48 bis 72 Stunden nach chirurgischer Versorgung detektiert wurden. Des Weiteren bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß des Konzentrationsanstiegs und dem Schweregrad der elektrokardiographischen Abnormalitäten, der Prognose sowie den histopathologischen Befunden. Durch das Erstellen von Cut-Off-Werten für cTnI (4,05 ng/ml) und cTnT (0,030 ng/ml) konnte mit einer Sensitivität von 67 – 100 % und einer Spezifität von 72 – 87 % ein letaler Ausgang prognostiziert werden (SCHOBER et al., 2002a). Untersuchungen von BURGNER und Mitarbeitern zur selben Thematik ergaben ähnliche Resultate. 93 % der Patienten mit Magentorsion wiesen erhöhte cTnI-Werte auf, wobei ein Anstieg der cTnT-Konzentration nur in 57 % der Fälle stattfand. Maximalspiegel wurden allerdings bereits 24 – 48 Stunden nach der chirurgischen Versorgung detektiert (BURGENER et al., 2006).

Nierenversagen stellt eine weitere extrakardiale Ursache für einen cTnI-Konzentrationsanstieg dar. 70 – 80 % der Hunde mit diagnostizierter Niereninsuffizienz wiesen, im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren ohne eine kardiale oder weitere systemische Erkrankung, einen signifikant erhöhten cTnI-Serumspiegel auf (PORCIELLO et al., 2008; SHARKEY et al., 2009). Keine Korrelation konnte zwischen der cTnI-Konzentration und dem Schweregrad der Azotämie sowie einer Hypertension festgestellt werden (PORCIELLO et al., 2008).

cTnI-Analysen zur Differenzierung zwischen Hunden mit Dyspnoe aufgrund von CHF und jenen Patienten mit extrakardial bedingter Atemnot erwiesen sich als nicht hilfreich. Ein Nachweis von erhöhten cTnI-Serumspiegeln fand in beiden Patientengruppen statt, allerdings ohne signifikanten Konzentrationsunterschied (PROSEK et al., 2007).

Des Weiteren war sowohl eine präkapilläre als auch eine postkapilläre PH mit einem signifikanten Anstieg der cTnI-Konzentration verbunden (siehe auch Punkt 2.4.2.1.1). Eine mäßige, aber signifikante Korrelation konnte zwischen der cTnI-Konzentration und dem Schweregrad einer PH nachgewiesen werden (GUGLIELMINI et al., 2010).

Studien an Hündinnen, die aufgrund einer Pyometra vorstellig wurden, konnten bei 12 % und 28 % der Patienten erhöhte cTnI-Konzentrationen nachweisen. Ein signifikanter Unterschied in dem cTnI-Serumspiegel konnte allerdings gegenüber der gesunden Kontrollgruppe nicht ermittelt werden. Patienten mit erhöhten cTnI-Konzentrationen tendierten zu einer gesteigerten Mortalität (HAGMAN et al., 2007). Eine Korrelation zwischen der cTnI-Konzentration und dem Vorliegen eines *Systemic Inflammatory Response Syndrome* wird kontrovers diskutiert (HAGMAN et al., 2007; DINIZ et al., 2008). Ein Anstieg des postoperativen cTnI-Serumspiegels wurde bei 39 % der Hündinnen detektiert. Laut den Autoren ist der klinische Nutzen dieser Resultate aber ungewiss (PELANDER et al., 2008).

SCHOBBER und Mitarbeiter konnten bei elf septischen Hunden zum Teil massiv erhöhte cTn-Serumspiegel (bis 475,4 ng/ml für cTnI und 4,61 ng/ml für cTnT) nachweisen. Eine cTnI-Konzentration von über 40 ng/ml war mit einem letalen Ausgang vergesellschaftet (SCHOBBER et al., 2002b).

Eine Infektion mit *Ehrlichia canis* war ebenfalls mit einer gesteigerten cTnI-Konzentration assoziiert, wobei eine akute Infektion die höchsten cTnI-Werte ergab. 33 % der infizierten Hunde wiesen echokardiographisch linksventrikuläre Abnormalitäten (Volumenüberladung, systolische Dysfunktion, Hypertrophie) auf (DINIZ et al., 2008). Bei Hunden, die an einer klinisch komplizierten Babesiose erkrankt waren, konnten ebenfalls erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden cTn detektiert werden. Des Weiteren wurde eine Assoziation zwischen der cTnI-Konzentration und histologischen Myokardveränderungen, dem Schweregrad der klinischen Symptome sowie der Mortalität festgestellt. Kein Zusammenhang konnte dagegen mit dem Auftreten von EKG-Veränderungen detektiert werden. Eine Ausnahme stellten hierbei VES dar, die mit hohen cTnI-Serumspiegeln vergesellschaftet waren (LOBETTI et al., 2002). Das cTnI erwies sich bei caninen Infektionen mit *Leptospira interrogans* (Serovar: australis) als potentieller prognostischer Marker. Bei elf von 16 infizierten Hunden konnte ein gesteigerter cTnI-Serumspiegel (0,4 – 60,1 ng/ml) eruiert werden. Patienten, die an den Folgen der Leptospirose verstarben, zeigten signifikant höhere cTnI-Konzentrationen, als jene die überlebten (MASTRORILLI et al., 2007).

Eine retrospektive Studie zeigte, dass 73 % der Hunde bei denen aufgrund eines Lymphoms oder eines Osteosarkoms eine Therapie mit Doxorubicin durchgeführt



wurde erhöhte cTnI-Serumspiegel aufwiesen. Anhand der cTnI-Konzentration konnten keine prädiktiven Aussagen über die Entwicklung einer Doxorubicin induzierten Kardiomyopathie getroffen werden. Jene Patienten, bei denen echokardiographisch eine Doxorubicin induzierten Kardiomyopathie diagnostiziert wurde, wiesen allerdings bereits vor der Ausbildung von klinischen Symptomen erhöhte cTnI-Serumspiegel auf (SELTING et al., 2004).

Zwei Studien untersuchten die Auswirkungen von Schlangenbissen auf den cTn-Serumspiegel. PELANDER und Mitarbeiter konnten bei 33,5 % von insgesamt 24 Hunden, die aufgrund eines Kreuzotter (*Vipera berus*)-Bisses vorstellig wurden, erhöhte cTnI-Konzentrationen entweder mit oder ohne EKG-Veränderungen nachweisen. Es bestand keine Korrelation zwischen der Höhe der cTnI-Konzentration und dem Auftreten von EKG-Abnormalitäten (PELANDER et al., 2010). Untersuchungen an Hunden, die eine *Vipera palaestinae* Vergiftung erlitten, konnten einen Anstieg der cTn-Konzentration während ihres stationären Aufenthaltes bestätigen (cTnT in 25 % und cTnI in 65 % der Fälle). Außerdem konnte eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Arrhythmien und der cTnT-Konzentration detektiert werden, welche für cTnI nicht nachweisbar war. Des Weiteren war ein erhöhter cTnT-Spiegel mit einer gesteigerten Herzfrequenz in den ersten 24 Stunden nach Einlieferung und mit einem längeren Klinikaufenthalt verbunden (SEGEV et al., 2008).

Ein Anstieg der cTn-Konzentration wurde ebenfalls bei steroidresponsiver Meningitis-Arteritis (SNYDER et al., 2010), intrakraniellm Meningiom (KENT et al., 2010), Rhabdomyolyse (WELLS et al., 2009), Hitzschlag (MELLOR et al., 2006), Anämie, Lymphom, viszerale Neoplasien, Pankreatitis, unkontrolliertem Hypo- und Hyperadrenokortizismus sowie signifikanten Gewichtsverlust nachgewiesen (SERRA et al., 2010).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Patienten**

Die Patientenpopulation umfasste 341 reinrassige Dobermänner (170 Hündinnen und 171 Rüden), die im Rahmen einer prospektiven Langzeitstudie über die DoCM in der kardiologischen Abteilung der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München im Zeitraum zwischen Juni 2004 und Januar 2011, vorgestellt wurden. Von diesen liegen eine oder mehrere vollständige kardiologische Folgeuntersuchungen vor, weshalb insgesamt 524 Untersuchungen von 341 Dobermännern in die Datenanalyse aufgenommen werden konnten.

#### **2. Ein- und Ausschlusskriterien**

Der Einschluss in die Studie erfolgte ausschließlich bei Hunden, die phänotypisch dem Bild eines reinrassigen Dobermanns entsprachen. In die Studie wurden gesunde, definitiv an der DoCM erkrankte Hunde oder Patienten aufgenommen, bei denen der Verdacht auf eine bestehende DoCM aufgrund von erhöhten kardialen Biomarkern in der Zirkulation bestand. Zum Ausschluss aus der Studie führten anamnestische oder klinische Hinweise auf eine bestehende systemische Erkrankung sowie das gleichzeitige Vorliegen einer anderen kardialen Krankheit (angeboren oder erworben), außer einer DoCM. Des Weiteren wurden Hunde aus der Studie ausgeschlossen, welche nicht eindeutig in eine der sechs verschiedenen Patientengruppen (siehe Kapitel III Punkt 5.1. – 5.4.) zugeordnet werden konnten.

#### **3. Untersuchungen**

Bei jedem Dobermann wurde sowohl bei Erstvorstellung als auch bei den Folgeuntersuchungen eine ausführliche Anamnese erhoben sowie eine gründliche klinische und kardiovaskuläre Untersuchung durchgeführt, um das klinische Bild zu beurteilen und andere systemische Krankheiten weitgehend ausschließen zu können. Des Weiteren wurden die Patienten einer sorgfältigen echokardiographischen und elektrokardiographischen (Kurzzeit-EKG und Langzeit-EKG über 24 Stunden) Untersuchung unterzogen. Außerdem erfolgte bei jedem Studienpatienten eine Blutentnahme für die Bestimmung von kardialen

Biomarkern, unter anderem des cTnI. Folgeuntersuchungen fanden bei als herzgesund beurteilten Patienten mindestens einmal jährlich statt, während erkrankte Dobermänner sowie Hunde, bei denen der Verdacht auf eine beginnende DoCM bestand, in kürzeren Zeitabständen (nach drei bis sechs Monaten) einer Kontrolluntersuchung unterzogen wurden.

### **3.1. Signalement und Anamnese**

Zuerst wurde das phänotypische Erscheinungsbild nach dem Standard des Dobermann-Vereins beurteilt, um Hybriden aus der Studienpopulation ausschließen zu können. Bei dem Großteil der Studienteilnehmer konnte die Reinrassigkeit anhand von Stammbäumen oder Zuchtpapieren nachgewiesen werden. Durch die Anamnese wurde das genaue Alter, Geschlecht und Gewicht ermittelt. Des Weiteren wurde eine ausführliche Befragung über bisherige Erkrankungen, derzeitige Pharmakotherapien sowie über das Auftreten von kardialen Symptomen, wie Leistungsintoleranz, Synkopen, Tachypnoe, Dyspnoe, Husten oder Zyanose durchgeführt.

### **3.2. Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung**

Alle Patienten wurden sorgfältig klinisch untersucht. Bei der kardiovaskulären Untersuchung waren insbesondere Herzauskultation bei gleichzeitiger Palpation des arteriellen Pulses sowie die Beurteilung der Schleimhautfarbe, der kapillären Füllungszeit und der Jugularvenen (Jugularvenenpuls beziehungsweise Stauung der Jugularvenen) von Bedeutung.

### **3.3. Elektrokardiographie**

Zur Feststellung von möglichen Arrhythmien wurden sowohl ein Kurzzeit- als auch ein Langzeit-EKG über 24 Stunden angefertigt.

#### **3.3.1. Kurzzeit-Elektrokardiographie**

Das Kurzzeit-EKG wurde in rechter Seitenlage mit dem Gerät Cardiovit<sup>®</sup> AT - 10 der Firma Schiller Medizintechnik GmbH (Ottobrunn, Deutschland) durchgeführt. Es wurde sowohl ein Ausdruck der drei Standardableitungen nach Einthoven (Ableitung I, II und III) und Goldberger (aVR, aVL, aVF) sowie einer Brustwandableitung auf Höhe des Herzspitzenstoßes über zehn Sekunden als auch ein Ausdruck der Ableitung II nach Einthoven über 5 Minuten angefertigt.

### **3.3.2. Langzeit-Elektrokardiographie**

Neben der echokardiographischen Untersuchung gilt das 24-Stunden-EKG (Holter-EKG) als Goldstandard für die Diagnose einer DoCM (CALVERT & BROWN, 1986; CALVERT et al., 2000a), weshalb bei jedem Patienten ein solches angefertigt wurde. Des Weiteren ist ein Holter-EKG hilfreich bei der Entscheidung, ob eine antiarrhythmische Therapie indiziert ist sowie zur Therapiekontrolle bei bestehender Antiarrhythmikaapplikation. Es wurde eine kontinuierliche EKG-Registrierung über 24 Stunden digital aufgezeichnet und gespeichert, wobei die Hunde ihrem üblichen Tagesablauf in gewohnter Umgebung nachgehen sollten. Zum Einsatz kamen die Geräte Custo Flash<sup>®</sup> 200 und 220 der Firma Arcon Systems GmbH (Starnberg, Deutschland) sowie das Gerät Amedtec ECGpro<sup>®</sup> der Firma Amedtec Medizintechnik Aue GmbH (Aue, Deutschland). Zur kutanen Befestigung der selbstklebenden EKG-Elektroden wurden an der rechten seitlichen Brustwand drei und an der linken seitlichen Brustwand zwei kleine Stellen freigeschoren. Diese waren beidseits vertikal untereinander und hinter dem Schulterblatt angeordnet und wurden mit 70%igem Alkohol entfettet. Die Elektroden wurden anschließend mit dem entsprechenden Holter-Gerät verbunden und mit einer speziellen Holtertasche oder -weste auf dem Rücken des Patienten befestigt. Die über 24 Stunden digital gespeicherte EKG-Aufzeichnung wurde im Anschluss offline mit dem entsprechenden Softwareprogramm (Custo Tera oder Amedtec) automatisch analysiert. Bei dieser automatischen Datenanalyse traten oftmals Fehler auf, da beide Holter-Geräte aus der Humanmedizin stammen. Aus diesem Grund wurde immer eine nachträgliche manuelle Überprüfung und Bearbeitung der Daten durchgeführt.

### **3.4. Echokardiographie**

Die echokardiographische Untersuchung erfolgte bei jedem Patienten mit dem Ultraschallgerät Vivid<sup>®</sup> 7 der Firma General Electric Medical Systems (Horten, Norwegen). Der verwendete Ultraschallkopf wies eine Frequenz von 2,0/4,3 Megahertz auf. Die Fokusposition, die Tiefeneinstellung und die Gain wurden so gewählt, dass ein optimales zweidimensionales Graubild erzielt werden konnte. Gleichzeitig wurde ein einkanaliges EKG während der gesamten echokardiographischen Untersuchung abgeleitet, das sowohl zur Feststellung möglicher Arrhythmien als auch der offline Datenanalyse diente. Alle Dobermänner wurden im unsedierten Zustand auf einem speziellen

kardiologischen Untersuchungstisch in rechter und linker Seitenlage echokardiographisch untersucht. Um ausreichend Kontakt zwischen dem Schallkopf und der Thoraxwand zu erhalten wurde diese zunächst mit medizinischem Alkohol vorbereitet und anschließend ausreichend Ultraschallkontaktgel verwendet. Dadurch konnte auf eine Rasur verzichtet werden. Während der Echokardiographie wurden von allen Patienten Aufnahmen der zweidimensionalen Standard- und M-Mode-Untersuchungen sowie Blutfluss- und Gewebedoppleraufnahmen digital gespeichert.

#### **3.4.1. Zweidimensionale und M-Mode Echokardiographie**

In rechter Seitenlage wurden die rechtsparasternale Längs- und Kurzachse dargestellt. Zunächst erfolgte eine subjektive Beurteilung der rechtsparasternalen Längsachse im Vierkammerblick bezüglich der ventrikulären und atrialen Dimensionen, der myokardialen Kontraktilität sowie der Morphologie und Motilität der AV-Klappen. Um eine objektive Aussage über die LVIDd und LVIDs treffen zu können, wurden M-Mode-Aufnahmen angefertigt. Hierbei wurde der Cursor des M-Modus senkrecht zur Längsachse des LV und apikal der maximalen Mitralklappenöffnung positioniert. Die subjektive Evaluierung der Morphologie des linksventrikulären Ausflusstrakts sowie der Aortenklappe wurde im rechtsparasternalen Fünfkammerblick durchgeführt. Die Aufnahmen der rechtsparasternalen Kurzachse erfolgten auf Höhe der Papillarmuskeln, der Herzbasis, sowie des Apex. Erstgenannte Schnittebene ließ eine weitere subjektive Beurteilung der linksventrikulären Dimensionen (LVIDd, LVIDs) und der myokardialen Kontraktilität zu. Für die objektive Messung der Dimensionen wurde erneut der M-Mode genutzt, wobei der Cursor durch die Mitte des LV gelegt wurde. Dadurch sollten zwei symmetrische Herzhälften entstehen, um eine Unter- oder Überschätzung der Messwerte zu vermeiden. In der rechtsparasternalen Kurzachse auf Höhe der Herzbasis, wurde neben der subjektiven Beurteilung des rechtsventrikulären Ausflusstrakts und der Pulmonalklappe, der Durchmesser der Ao und des LA bestimmt. Im linksapikalen Vierkammerblick erfolgte erneut die subjektive Evaluierung der Vorhof- und Ventrikeldimensionen, der myokardialen Kontraktilität sowie der AV-Klappen. Zusätzlich wurde der linksventrikuläre Ausflusstrakt im linksapikalen Fünfkammerblick beurteilt.

### **3.4.2. Blutflussdoppler**

Es wurden sowohl von rechtsparasternal als auch von linksapikal die AV- und Semilunarklappen mit Hilfe des Farbdopplers gründlich auf das Vorhandensein von Turbulenzen, Insuffizienzen oder Stenosen untersucht. Außerdem kam der Blutflussdoppler zum Einsatz um angeborene Herzerkrankungen, wie einen Atriumseptumdefekt, VSD oder PDA ausschließen zu können. Des Weiteren wurden mit dem gepulsten und dem kontinuierlichen Spektraldoppler die Einflussprofile über den AV-Klappen angefertigt und die Blutflussgeschwindigkeiten in der Ao, der Pulmonalarterie und von Klappeninsuffizienzen, falls vorhanden, gemessen.

### **3.4.3. Simpson-Scheibchensummationsmethode**

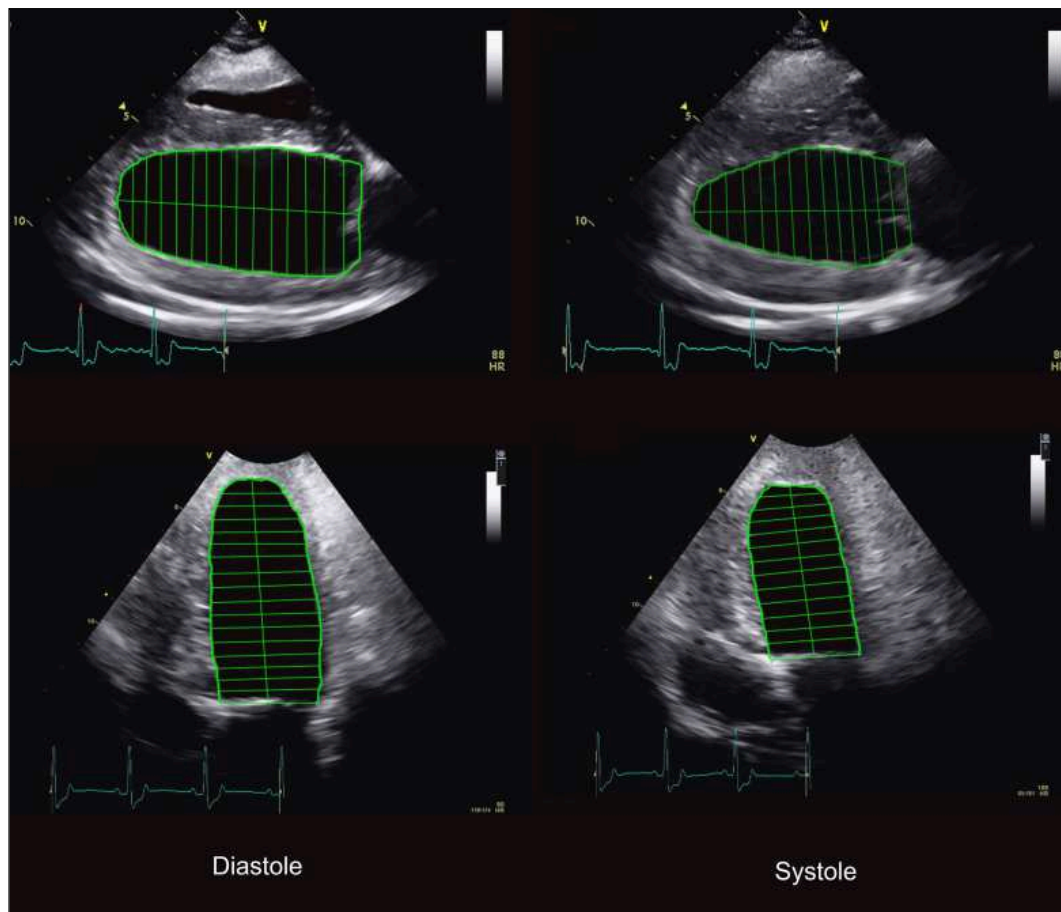
Die Ermittlung des linksventrikulären EDV und ESV erfolgte mit Hilfe der SSSM. Diese wurde sowohl in dem rechtsparasternalen als auch in dem linksapikalen Vierkammerblick angewendet. Voraussetzungen für die Anwendung der SSSM sind ein optimaler Anschallwinkel, um eine Unter- oder Überschätzung des LV zu vermeiden sowie die vollständige Darstellung des LV.

## **4. Offline-Datenanalyse**

Die Analyse der digital gespeicherten Aufnahmen (zweidimensionale Standard- und M-Mode-Untersuchungen, Blutflussdopplerstudien) fand im Anschluss der echokardiographischen Untersuchung offline mit Hilfe der EchoPac<sup>®</sup> Software der Firma General Electric Medical Systems (Horten, Norwegen) statt.

### **4.1. Linksventrikuläre Volumina**

Die objektive Ermittlung der linksventrikulären Volumina erfolgte in der rechtsparasternalen sowie in der linksapikalen Längsachse, jeweils im Vierkammerblick, anhand der SSSM (Abbildung 3).



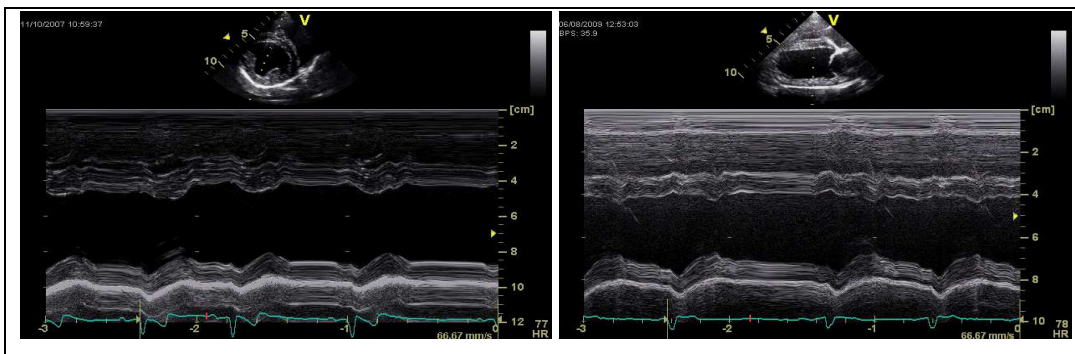
**Abbildung 3:** Echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels und Messung des enddiastolischen sowie des endsystolischen Volumens anhand der Scheibchensummationsmethode nach Simpson, im rechtsparasternalen (oben) und linksapikalen (unten) Vierkammerblick. Links im Bild erfolgt die Messung in der Enddiastole, rechts dagegen in der Endsystole (WESS et al., 2010e).

Es wurde sowohl das linksventrikuläre EDV als auch das ESV bestimmt. Aufnahmen bei denen der LV subjektiv zu klein erschien (Unterschätzung durch einen falschen Anschallwinkel) oder im Schallfenster nicht vollständig dargestellt werden konnte, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Die Bestimmung der Enddiastole und der Endsystole erfolgte anhand des mitlaufenden EKG sowie mit Hilfe der Mitralklappenmotilität (Klappenöffnung beziehungsweise –schluss) im zweidimensionalen Bild. Das EDV wurde nach dem Mitralklappenschluss zum Zeitpunkt der isovolumetrischen Kontraktionszeit gemessen, wobei die Bestimmung des ESV bei maximaler Kontraktion des LV kurz vor der Öffnung der Mitralklappe, während der isovolumetrischen Relaxationszeit, erfolgte. Zur Messung der Simpson-Scheibchensummation wurde die innere Kontur des linksventrikulären Endokards, beginnend und endend an dem Mitralklappenannulus, mit einer fortlaufenden Linie umrandet. Anschließend

erstellte die Auswertungssoftware automatisch eine Verbindungslinie zwischen den Insertionsstellen des anterioren und posterioren Mitralklappensegels. Senkrecht zu dieser wurde im Anschluss eine weitere Linie, ausgehend von der Mitte dieser Verbindungslinie bis zum Endokard der Herzspitze halbautomatisch gezogen, wodurch die Bestimmung des linksventrikulären Längsachsendurchmessers erfolgte. In einem nächsten Schritt fand eine automatische Unterteilung des markierten linksventrikulären Volumens in gleichgroße Scheibchen statt, wodurch das EDV sowie das ESV des LV rechnergestützt berechnet werden konnte. Eine Normalisierung auf die Patienten- und somit auf die Herzgröße erfolgte anhand der Körperoberfläche (Body Surface Area = BSA) in  $m^2$ .

#### 4.2. Linksventrikuläre Durchmesser und Verkürzungsfraction

Die objektive Bestimmung der linksventrikulären Durchmesser sowie der FS erfolgte in der rechtspasternalen Längs- und Kurzachse mit Hilfe der digital gespeicherten M-Mode-Aufnahmen (Abbildung 4). Hierbei wurden folgende Messwerte des LV ermittelt: LVIDd, LVIDs, Stärke der linksventrikulären freien Wand in der Diastole (LVFWd) und Systole (LVFWs), Stärke des interventrikulären Septums in der Diastole (IVSd) und Systole (IVSs).



**Abbildung 4:** M-Mode-Aufnahmen des linken Ventrikels in der rechtspasternalen Kurzachse (links) sowie in der rechtspasternalen Längsachse (rechts).

Aus dem ermittelten LVIDd und LVIDs wurde die FS berechnet, die ein Maß der systolischen Funktion des LV darstellt. Falls in den gespeicherten M-Mode-Aufnahmen keine korrekte Positionierung des M-Mode-Cursors stattgefunden hat, wurde während der offline Analyse der anatomische M-Mode in der richtigen Position durch ein zweidimensionales Bild gelegt, um eine Unter- oder



Überschätzung der linksventrikulären Dimensionen zu vermeiden.

### **4.3. Durchmesser des linken Atriums und der Aorta**

Um eine objektive Aussage über die Größe des LA treffen zu können, wurde in der zweidimensionalen rechtsparasternalen Kurzachse auf Höhe der Herzbasis, der Durchmesser der Ao sowie des LA gemessen und ins Verhältnis (LA/Ao) gesetzt. Die Dimension des LA galt als physiologisch, wenn LA/Ao den Wert von 1,5 nicht überschritten hat (HANSSON et al., 2002).

## **5. Einteilung in Patientengruppen**

Die Einteilung der Studienpopulation erfolgte anhand der echo- und elektrokardiographisch erhobenen Untersuchungsbefunde in herzgesund, last normal, okkult und dekompensiert.

### **5.1. Herzgesund**

Als herzgesund wurden asymptomatische Patienten beurteilt, die sowohl in der Anamnese als auch in der klinischen kardiovaskulären Untersuchung keine Auffälligkeiten zeigten. In der echokardiographischen Untersuchung waren außer trivialen Klappeninsuffizienzen keine pathologischen Veränderungen erlaubt. Die Messwerte des EDV durften maximal  $95 \text{ ml/m}^2$  betragen, die des ESV maximal  $55 \text{ ml/m}^2$ . LA/Ao durfte den Wert von 1,5 nicht überschreiten. In der elektrokardiographischen Untersuchung musste ein regelmäßiger Sinusrhythmus oder eine respiratorische Sinusarrhythmie vorliegen. Eine Anzahl von  $< 50$  VES in 24 Stunden wurde als physiologischer Befund erachtet. Eine bestehende Verabreichung von Medikamenten mit Wirkung auf das kardiovaskuläre System war nicht erlaubt.

### **5.2. Last normal**

Als „last normal“ wird die letzte elektro- und echokardiographisch unauffällige Untersuchung eines Patienten bezeichnet, der im Rahmen einer Folgeuntersuchung innerhalb der folgenden 18 Monate pathologische Veränderungen im Sinne einer DoCM entwickelte. Demnach wurde die letzte elektro- und echokardiographisch unauffällige Untersuchung jener Patienten retrospektiv der Studiengruppe „last normal“ zugeordnet, bei denen innerhalb der folgenden 18 Monate  $> 100$  VES in 24 Stunden und/oder echokardiographische Abnormalitäten nachgewiesen werden konnten.

### **5.3. Okkult**

Hunde, die in das okkulte Stadium der DoCM eingeteilt wurden zeigten keine klinischen Symptome einer Herzerkrankung. Demnach lieferte die Anamnese keine Hinweise auf das Vorliegen einer DoCM und musste unauffällig sein. In der klinischen kardiovaskulären Untersuchung durften diese Dobermänner pathologische Veränderungen aufweisen, die auf eine bestehende DoCM zurückgeführt werden konnten. Abhängig von den erhobenen elektro- und echokardiographischen Befunden, wurden solche Patienten in drei verschiedene Untergruppen eingeteilt (ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen oder eine Kombination aus VES und echokardiographischen Veränderungen). Ab dem okkulten Stadium galt eine Vorbehandlung mit Antiarrhythmika, ACE-Inhibitoren, positiv inotropen Medikamenten oder eine Kombination aus diesen nicht als Ausschlusskriterium.

#### **5.3.1. Ausschließlich ventrikuläre Extrasystolen**

Im 24-Stunden-EKG lagen bei diesen Hunden > 100 VES vor, wobei die echokardiographische Untersuchung den Kriterien eines herzgesunden Dobermanns entsprach. Supraventrikuläre Extrasystolen, supraventrikuläre Tachyarrhythmien sowie Abweichungen der mittleren elektrischen Herzachse und der EKG-Morphologie (P-Welle, QRS-Komplex) waren ebenfalls erlaubt. Um eine mögliche extrakardiale Ursache für die Entstehung von VES weitgehend ausschließen zu können wurde bei Patienten, die erstmalig eine Anzahl zwischen 50 und 300 VES in 24 Stunden und eine unauffällige Echokardiographie aufwiesen, eine vollständige Kontrolluntersuchung nach drei Monaten durchgeführt. Erst wenn in dieser > 100 VES bei einer unauffälligen echokardiographischen Untersuchung vorlagen, wurden die betroffenen Patienten in dieses Krankheitsstadium (ausschließlich VES) eingeordnet. Als fraglicher Befund galt eine Anzahl an VES zwischen 50 und 100 in 24 Stunden, weshalb solche Patienten aus der Studie ausgeschlossen wurden, falls keine Folgeuntersuchung vorlag oder diese keine eindeutige Zuordnung in eines der Stadien zugelassen hat.

### **5.3.2. Ausschließlich echokardiographische Veränderungen**

In der Echokardiographie wiesen diese Patienten eine eindeutige linksventrikuläre systolische Dysfunktion ( $ESV > 55 \text{ ml/m}^2$ ) mit oder ohne einhergehender Volumenüberladung des LV ( $EDV > 95 \text{ ml/m}^2$ ) auf. Die elektrokardiographische Untersuchung dagegen erfüllte die Kriterien eines herzgesunden Dobermanns ( $< 50 \text{ VES}$  in 24 Stunden). Zusätzlich konnte bei diesen Tieren eine sekundäre MI (MI mit zentralem Jetverlauf, aufgrund einer linksventrikuläre Volumenüberladung) und daraus resultierender Vergrößerung des LA ( $LA/Ao > 1,5$ ) vorliegen.

### **5.3.3. Ventrikuläre Extrasystolen und echokardiographische Veränderungen**

Dieser Untergruppe wurden Dobermänner zugeordnet, die sowohl elektrokardiographische als auch echokardiographische Veränderungen, wie unter 5.3.1. und 5.3.2. erläutert, aufwiesen.

### **5.4. Dekompensiert**

Hunde im dekompensierten Stadium mussten entweder zum Zeitpunkt der Vorstellung oder in der Vergangenheit vor Beginn mit einer kardialen Therapie, kardiale Symptome eines CHF, wie Tachypnoe, Dyspnoe oder Husten, aufweisen. Waren die Hunde nicht bereits durch den Haustierarzt vorbehandelt, wurde umgehend mit einer, dem jeweiligen Patienten angepasster Therapie (Diuretika, ACE-Inhibitoren, positiv inotrope Medikamente, Antiarrhythmika oder eine Kombination aus diesen), begonnen. Diese Patienten zeigten echokardiographische Veränderungen entweder mit oder ohne das zusätzliche Vorliegen von Arrhythmien, entsprechend den Kriterien, die auch für das okkulte Stadium galten (Kapitel III Punkt 5.3.). Zusätzlich musste bei den dekompensierten Patienten das Verhältnis zwischen LA und Ao den Wert von 1,5 überschreiten.

## **6. Analyse des kardialen Troponin I**

Zur Bestimmung der cTnI-Blutkonzentration kamen zwei verschiedene Tests aus der Humanmedizin zum Einsatz. Es wurden sowohl Ethylendiamintetraessigsäure- (EDTA)-Plasmaproben als auch Serumproben für die Analyse verwendet.

### **6.1. Blutprobengewinnung, Verarbeitung und Lagerung**

Die Entnahme von 20 ml Blut erfolgte überwiegend aus einer der beiden *Venae jugulares* mit einer sterilen Butterfly-Kanüle und einer 20 ml Spritze. Das gewonnene Blut wurde anschließend sofort in Serumröhrchen sowie in mit EDTA als Antikoagulanzen beschichtete Röhrchen überführt. Für die Gewinnung von EDTA-Plasma erfolgte unmittelbar im Anschluss eine zehnmünütige Zentrifugation bei 4 °C und 3500 Umdrehungen pro Minute. Die Serumproben wurden dagegen erst nach ausreichender Gerinnung für 15 - 20 Minuten bei 25 °C und 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das erhaltene EDTA-Plasma sowie das Serum wurden schließlich in Polystyrol-Röhrchen abpipettiert, in multiple Aliquote unterteilt und bis zur Probenanalyse bei -80 °C gelagert. Ein Serum-Aliquot wurde allerdings nicht tiefgefroren, sondern für die cTnI-Analyse anhand des Immulite® 2000 Troponin I-Tests (Firma Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland) am selben Tag an das zuständige Fremdlabor (IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Deutschland) versandt. Des Weiteren erfolgte ein Sammelversand der bei -80 °C tiefgefrorenen Proben auf Trockeneis zu IDEXX Laboratories, wo eine weitere cTnI-Analyse unter Verwendung eines neuen hs cTnI-Assays durchgeführt wurde. Die Lagerung dieser bei -80 °C tiefgefrorenen Proben betrug unterschiedlich lange Zeiträume (maximal fünf Jahre und 77 Tage), die von den jeweiligen Zeitpunkten der Blutprobenentnahmen abhängig waren.

### **6.2. Beschreibung der Testverfahren**

Für die Analysen der cTnI-Konzentration kamen zwei, für die Humanmedizin entwickelte, cTnI-Assays der Firma Siemens Healthcare Diagnostics (Eschborn, Deutschland) zum Einsatz. Bei dem Immulite® 2000 Troponin I-Test handelt es sich um einen konventionellen Test, bei dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay dagegen um einen hs Assay. Alle cTnI-Analysen wurden von dem Fremdlabor IDEXX Laboratories nach den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt.

### 6.2.1. ADVIA Centaur® TnI-Ultra

Bei dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Test handelt es sich um einen Sandwich-Immunoassay, der mit drei verschiedenen AK und direkter Chemilumineszenz (CL) arbeitet (SIEMENS, 2008a). Die CL stellt ein Prozess dar, bei dem durch eine chemische Reaktion elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts emittiert wird (FAN et al., 2009). Das Test-Reagenz enthält einen polyklonalen Ziege-Anti-TnI-AK (Signal-AK), der mit Acridiniumester markiert ist sowie zwei biotinylierte monoklonale Maus-Anti-TnI-AK (Capture-AK). Die zwei von den monoklonalen Capture-AK erkannten Epitope (AS-Sequenzen 87 – 91 und 41 – 49) sind innerhalb der stabilen Core-Region des cTnI lokalisiert. Der Signal-AK bindet dagegen an die AS 27 - 39. Das Festphasenreagenz enthält magnetische Latexpartikel, die mit Streptavidin konjugiert sind. Mit Hilfe eines Zusatzreagenzes werden nicht-spezifische Bindungen minimiert. Durch Bindung dieser drei AK an das in der Probe enthaltene cTnI kommt es zur Entstehung eines Immunkomplexes (AK-Antigen-Komplex), der sich anschließend über Biotin mit den streptavidin-markierten magnetischen Partikeln der Festphase verbindet (CASALS et al., 2007; SIEMENS, 2008a). Die Auslösung der CL-Reaktion erfolgt durch die Zugabe von zwei weiteren Reagenzien (Reagenz A und B), wodurch das Acridiniumester zerfällt und Energie in Form von Licht freigesetzt wird (RONALD & STIMSON, 1998; SIEMENS, 2008a). Diese Lichtemission (CL) wird mit Hilfe eines Detektors in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Dabei ist die Intensität der CL direkt proportional zu der in der Probe enthaltenen cTnI-Konzentration (CASALS et al., 2007; FAN et al., 2009). Der Hersteller empfiehlt für die Testdurchführung die Verwendung von Serum-, heparinisierten Plasma- oder EDTA-Plasmaproben, wobei allerdings die Messung heparinisierter und EDTA-Plasmaproben gegenüber Serum um 1 % und 4 % niedrigere Konzentrationswerte ergibt. Das für diesen Test benötigte Probenvolumen beträgt 100 Mikroliter ( $\mu\text{l}$ ). Laut Herstellerangaben wurde der Test für die Anwendung von humanem cTnI wie folgt evaluiert: Das Detektions-Limit liegt bei 0,006 ng/ml ( $\mu\text{g/l}$ ), der Messbereich zwischen 0,006 und 50 ng/ml (Konzentrationen die 50 ng/ml übersteigen müssen verdünnt und erneut analysiert werden). Als Cut-Off-Wert für die Diagnose eines AMI ergab sich eine cTnI-Konzentration von 0,04 ng/ml (99. Perzentile einer gesunden Referenzpopulation), mit einem Range von 0,02 bis 0,06 ng/ml für die ADVIA Centaur® Systemfamilie, abhängig von dem jeweiligen Probenotyp, dem Gerät

sowie der Reagenzcharge. Außerdem wurde die von der ESC/ACC empfohlene Messpräzision von  $\leq 10\%$  am Referenzwert der 99. Perzentile erreicht (Gesamt-VK von  $10\%$  bei  $0.03\text{ ng/ml}$ ) (SIEMENS, 2008a).

### **6.2.2. Immulite® 2000 Troponin I**

Der Immulite® 2000 Troponin I stellt ein Festphasen enzymmarkierter CL immunometrischer Assay dar. Die Festphase (Kugel) ist mit einem monoklonalem Maus-Anti-TnI-AK (Capture-AK) beschichtet. Die Flüssigphase enthält einen polyklonalen Ziege-Anti-TnI-AK (Signal-AK), der an alkalische Phosphatase (Rinderkalbsdarm) konjugiert ist. Das in der zu untersuchenden Probe enthaltende cTnI bildet mit dem Maus-Anti-TnI-AK der Kugel und dem enzymkonjugierten Ziege-Anti-TnI-AK des Reagenz einen AK-Sandwich-Komplex (Immunkomplex) (SIEMENS, 2008b). Beide AK erkennen zwischen AS 33 und 110 gelegene Epitope des humanen cTnI (SCHARNHORST et al., 2002). Durch einen Zentrifugal-Waschschritt werden die ungebundene Patientenprobe sowie das ungebundene Enzymkonjugat entfernt. Nach Zusatz des CL-Substrats zur Kugel kommt es zur Bildung des Messsignals proportional zu der Menge des gebundenen Enzyms. Zur Testdurchführung kann nach Herstellerangaben sowohl Serum als auch Heparin- und EDTA-Plasma verwendet werden, wobei die Anwendung von EDTA-Plasma, im Vergleich zu Serumproben, mit niedrigeren Konzentrationswerten assoziiert ist. Das erforderliche Probenvolumen beträgt  $100\ \mu\text{l}$ . Die untere Nachweisgrenze (analytische Sensitivität) liegt bei  $0,2\text{ ng/ml}$  und der Messbereich zwischen  $0,2$  und  $180\text{ ng/ml}$  (SIEMENS, 2008b). Der Immulite® 2000 Troponin I-Assay wurde bereits von O'Brien und Mitarbeiter für die Anwendung von caninen Blutproben validiert (O'BRIEN et al., 2006). Der von IDEXX Laboratories für den Hund erstellte obere Referenzwert liegt bei  $0,5\text{ ng/ml}$ . Dagegen ermittelten WESS und Mitarbeiter einen Cut-off-Wert von  $0,22\text{ ng/ml}$  zur Differenzierung zwischen herzgesunden und an der DoCM erkrankten Dobermännern (WESS et al., 2010b).

### **6.3. Untersuchung der *in vitro* Langzeitstabilität**

Um die *in vitro* Langzeitstabilität des cTnI zu überprüfen wurden Serumproben von Dobermännern mit nachweisbar erhöhten cTnI-Konzentrationen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Die erste cTnI-Bestimmung erfolgte zum

Probeentnahmezeitpunkt (Untersuchungszeitraum), eine weitere nach unterschiedlich langer Lagerung (maximal fünf Jahre und 77 Tage) bei -80 °C. Die cTnI-Analysen wurden jeweils mit dem gleichen Messgerät (Immulate® 2000 Troponin I) von dem Fremdlabor IDEXX Laboratories nach den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt.

#### **6.4. Testpräzision des ADVIA Centaur® TnI-Ultra**

Für die Evaluierung der Testpräzision des hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays wurden die Schwankungen eines Messwertes innerhalb einer Testreihe (Intra-Assay) sowie die Schwankungen eines Messwertes zwischen unterschiedlichen Testreihen an verschiedenen Tagen (Inter-Assay) ermittelt. Zur Beurteilung der Intra-Assay Varianz wurden zwei Seren mit unterschiedlicher cTnI-Konzentration unter Anwendung eines Testkits, jeweils zehnmal in Folge innerhalb eines Messdurchlaufs analysiert. Die Bestimmung der Inter-Assay Varianz wurde anhand von drei Serumproben mit unterschiedlicher cTnI-Konzentration durchgeführt. Zwei von diesen Proben wurden jeweils einmal an zehn aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Bei der dritten Probe wurde die cTnI-Konzentration aufgrund des niedrigen Probenvolumens dagegen nur an sieben aufeinanderfolgenden Tagen analysiert.

#### **6.5. Vergleich zweier Probentypen mit dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra**

Unter Anwendung des hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays wurde die cTnI-Analyse bei Dobermännern mit nachweisbar erhöhten cTnI-Konzentrationen sowohl aus Serum- als auch aus EDTA-Plasmaproben durchgeführt und die ermittelten Resultate auf Konzentrationsabweichungen überprüft.

#### **6.6. Testvergleich**

Es erfolgte ein analytischer sowie ein klinischer Testvergleich zwischen dem hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay und dem konventionellen Immulate® 2000 Troponin I-Test. Hierfür kamen cTnI-Resultate von Proben zum Einsatz, die sowohl mit dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay als auch mit dem Immulate® 2000 Troponin I-Test analysiert wurden. cTnI-Bestimmungen mittels des Immulate® 2000 Troponin I-Tests wurden aus Serumproben zum Probeentnahmezeitpunkt durchgeführt. Messungen anhand des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays erfolgten dagegen aus EDTA-Plasmaproben nach

unterschiedlich langer Lagerung (maximal fünf Jahre und 77 Tage) bei -80 °C.

## 7. Follow-up-Studie

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit bestand aus der Durchführung einer Follow-up-Studie. In einer vorherigen Studie wurde das cTnI beim Dobermann unter Anwendung eines konventionellen cTnI-Assays (Immulite® 2000 Troponin I) klinisch evaluiert. Für die Differenzierung zwischen herzgesunden und an der DoCM erkrankten Hunden wurde in dieser ein Cut-off-Wert von 0,22 ng/ml ermittelt (WESS et al., 2010b). Hierbei fielen einige Hunde auf, die anhand der elektro- sowie der echokardiographischen Untersuchung als herzgesund beurteilt wurden, aber eine cTnI-Konzentration  $> 0,22$  ng/ml aufwiesen. Anhand von einer oder mehreren Follow-up-Untersuchungen wurde der weitere Verlauf der cTnI-Konzentration dieser Dobermänner beobachtet und eruiert, ob die cTnI-Konzentration korrekterweise aufgrund einer bestehenden DoCM (Stadium I) erhöht war, die Erkrankung aber erst zu einem späteren Zeitpunkt mittels Elektro- und Echokardiographie diagnostiziert werden konnte oder ob eine extrakardiale Ursache für den Anstieg der cTnI-Konzentration verantwortlich war. Bis zur Durchführung der ersten Follow-up-Untersuchung musste ein Zeitabstand von mindestens sechs Monaten vergangen sein. Des Weiteren wurden jene Dobermänner einer oder mehrerer Follow-up-Untersuchungen unterzogen, die an der DoCM erkrankt waren, allerdings eine cTnI-Konzentration  $< 0,22$  ng/ml aufzeigten.

## 8. Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Anwendung der Programme SPSS® (Statistical Package for the Social Science) Version 18 für Windows und MedCalc® Statistical Software Version 11.5.0.0. Als Signifikanzniveau wurde  $p = 0,05$  definiert. Die Daten wurden virtuell oder visuell sowie anhand des Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung überprüft.

### 8.1. *In vitro* Langzeitstabilität des kardialen Troponin I

Die *in vitro* Stabilität des cTnI wurde mit Hilfe des t-Tests sowie der Bland-Altman-Analyse (BLAND & ALTMAN, 1986) untersucht.



## **8.2. ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay**

Die Validierung des hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays erfolgte anhand einer Intra- und Inter-Assay Varianzanalyse. Des Weiteren wurde auf mögliche Konzentrationsabweichungen, die aus der Anwendung von zwei verschiedenen Blutprobentypen resultieren können, geprüft. Nach der Berechnung von verschiedenen Cut-off-Werten zur Differenzierung zwischen herzgesunden und an der DoCM erkrankten Individuen, wurde anhand der ermittelten cTnI-Konzentrationen ein Vergleich der sechs Studiengruppen (gesund, last normal, ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen, eine Kombination aus elektro- und echokardiographischen Abnormalitäten und dekompensiert) untereinander durchgeführt.

### **8.2.1. Testpräzision**

Die Beurteilung der Testpräzision erfolgte anhand einer Intra- und Inter-Assay Varianzanalyse unter Berechnung der VK ( $VK (\%) = SD / \text{Mittelwert} \times 100$ ).

### **8.2.2. Vergleich von Serum- und EDTA-Plasmaproben**

Mit Hilfe der Bland-Altman-Analyse sowie des Mann-Whitney-U-Tests wurden die cTnI-Resultate von zwei verschiedenen Blutprobentypen, Serum und EDTA-Plasma, miteinander verglichen und auf mögliche Abweichungen der cTnI-Konzentration überprüft.

### **8.2.3. Einfluss des Alters auf die cTnI-Konzentration**

Mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse wurde der Einfluss des Alters auf die cTnI-Konzentration anhand der herzgesunden Kontrolltiere untersucht. Außerdem wurden die mittleren cTnI-Konzentrationen von drei verschiedenen Altersgruppen unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests auf das Vorliegen einer statistischen Signifikanz überprüft.

### **8.2.4. Vergleich der verschiedenen Krankheitsstadien**

Anhand des ANOVA-Tests und anschließendem Mehrfachvergleich nach Tamhane wurden die mittleren cTnI-Konzentrationen der verschiedenen Studiengruppen untersucht und auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft.

### **8.2.5. Cut-off-Werte**

Um an der DoCM erkrankte Patienten von der gesunden Kontrollgruppe differenzieren zu können, wurden mit Hilfe des statistischen Auswertungsprogramms MedCalc Receiver-Operator-Curves (ROC-Kurven) erstellt und verschiedene Cut-off-Werte berechnet. Für die bessere Beurteilung des Unterscheidungspotentials des cTnI wurden außerdem die Flächen unter den Kurven (Area under Curve = AUC) herangezogen. Des Weiteren wurden die ermittelten Cut-off-Werte hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität untersucht. Für die Differenzierung zwischen herzgesunden und an der DoCM erkrankten Patienten wurden Cut-off-Werte gewählt, die eine hohe Sensitivität sowie eine hohe Spezifität aufweisen.

### **8.2.6. Korrelation mit der Anzahl an ventrikulären Extrasystolen**

Mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse wurde auf eine mögliche Korrelation zwischen der cTnI-Konzentration und der Anzahl an VES in 24 Stunden geprüft.

## **8.3. Testvergleich**

Es erfolgte ein Testvergleich zwischen dem hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay und dem konventionellen Immulite® 2000 Troponin I-Test.

### **8.3.1. Analytischer Vergleich**

Mittels der Bland-Altman-Analyse und des Mann-Whitney-U-Tests fand ein Vergleich zwischen den cTnI-Resultaten des hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay und dem konventionellen Immulite® 2000 Troponin I-Test statt.

### **8.3.2. Klinischer Vergleich**

Die Evaluierung der klinischen Konkordanz des hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays und des konventionellen Immulite® 2000 Troponin I-Tests erfolgte anhand von ROC-Kurven sowie deren AUC.

## **IV. ERGEBNISSE**

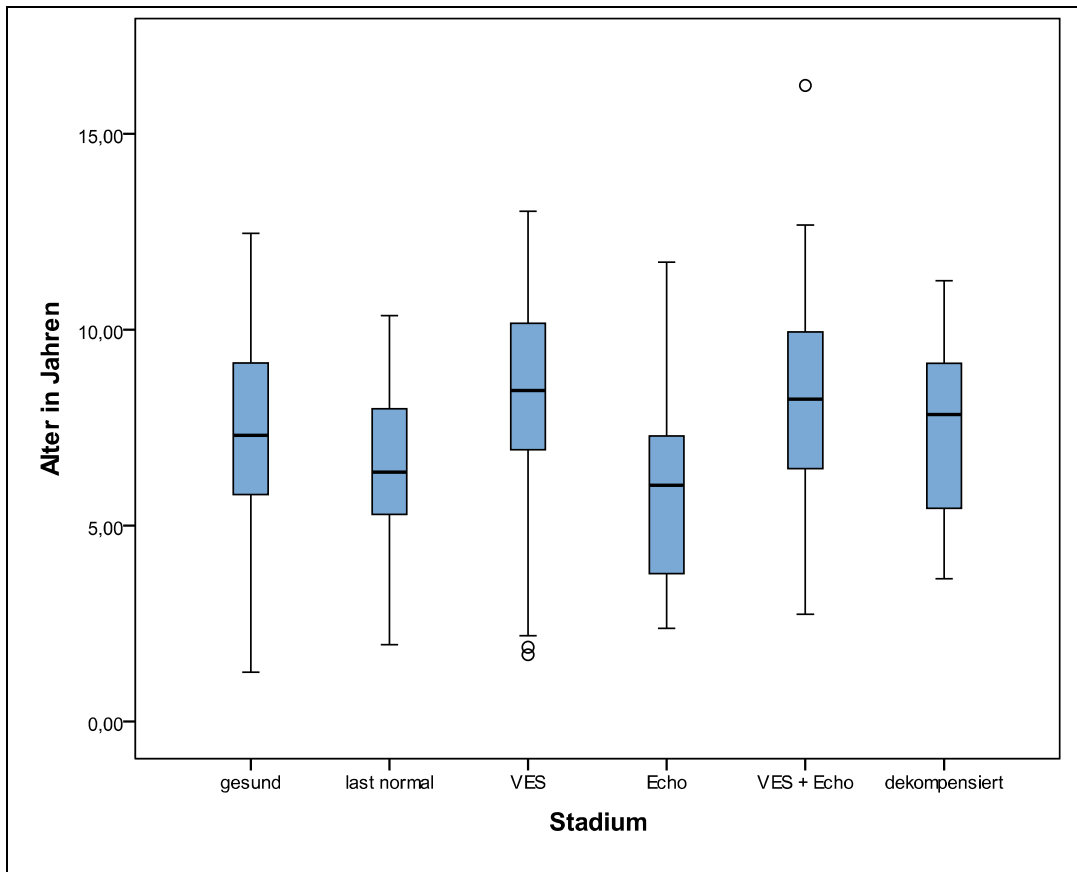
### **1. Charakterisierung der Studienpopulation**

Unter Anwendung des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays erfolgten cTnI-Analysen bei insgesamt 341 Dobermännern (170 Hündinnen und 171 Rüden). Die Studienpopulation setzte sich aus 179 herzgesunden Kontrolltieren (101 Hündinnen und 78 Rüden) und 162 an der DoCM erkrankten Hunden (69 Hündinnen und 93 Rüden) zusammen. Von den herzgesunden Kontrolltieren wurde jeweils nur die aktuellste Untersuchung pro Tier in die Datenanalyse aufgenommen. Dagegen gingen von den erkrankten Dobermännern alle Untersuchungen (345 Untersuchungen) in die Auswertung ein. Das mittlere Alter der Studienpopulation betrug 7,6 Jahre (Median 7,6 Jahre; Minimum 1,3 Jahre; Maximum 16,2 Jahre), das mittlere Gewicht 35,8 Kilogramm (kg) (Median 36,0 kg; Minimum 23,4 kg; Maximum 49,2 kg). Die an der DoCM erkrankten Patienten wurden anhand der unter Kapitel III Punkt 5 erläuterten Kriterien in folgende Stadien unterteilt: last normal, okkult und dekompensiert. Eine weitere Unterteilung des okkulten Stadiums erfolgte in Patienten mit ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen und einer Kombination aus VES und echokardiographischen Veränderungen. In Tabelle 4 sind die Anzahl der Studientiere, die Anzahl der Untersuchungen sowie die Verteilung der physiologischen Parameter (Geschlecht, Alter und Gewicht) innerhalb der einzelnen Gruppen dargestellt. Die Daten der physiologischen Parameter beziehen sich hierbei auf alle Untersuchungen, die innerhalb der einzelnen Gruppen durchgeführt wurden.

**Tabelle 4:** Darstellung der Anzahl der Einzeltiere, der Anzahl der durchgeführten Untersuchungen sowie der Verteilung von Alter in Jahren, Gewicht in Kilogramm und Geschlecht. Die Daten der physiologischen Parameter beziehen sich auf alle, innerhalb der einzelnen Studiengruppen, durchgeführten Untersuchungen (VES = ventrikuläre Extrasystolen, Echo = echokardiographische Veränderungen, dekomp. = dekompensiert, US = Untersuchungen, Mean = Mittelwert).

		gesund	last normal	VES	Echo	VES + Echo	dekomp.
Anzahl der Einzeltiere		179	29	45	24	41	23
Anzahl der US		179	29	119	61	100	36
Geschlecht	Weiblich	101	11	29	9	13	7
	männlich	78	18	15	15	29	16
Alter	Mean	7,5	6,3	8,3	6,1	8,2	7,5
	Median	7,3	6,7	8,4	6,0	8,2	7,8
	Minimum	1,3	2,0	1,7	2,4	2,7	3,6
	Maximum	12,5	10,4	13,0	11,7	16,2	11,3
Gewicht	Mean	35,2	37,9	35,1	35,6	37,2	36,1
	Median	35,0	39,0	34,4	35,8	37,0	37,0
	Minimum	23,4	25,0	23,6	25,0	24,4	26,0
	Maximum	48,0	48,0	48,5	45,0	49,2	47,4

Bezüglich des Alters lag innerhalb aller Stadien eine Normalverteilung vor. Im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren, den Patienten mit ausschließlich echokardiographischen Veränderungen und dem Stadium last normal, wiesen Dobermänner mit ausschließlich VES ein signifikant höheres Lebensalter auf. Gegenüber den Kontrolltieren, den Patienten mit ausschließlich VES und den Dobermännern, die sowohl VES als auch echokardiographische Veränderungen zeigten, waren jene Hunde mit ausschließlich echokardiographischen Abnormalitäten signifikant jünger. Des Weiteren wies das Stadium last normal, im Gegensatz zu den Patienten mit einer Kombination aus VES und echokardiographischen Veränderungen, ein signifikant niedrigeres Lebensalter auf. Kein signifikanter Altersunterschied lag zwischen den dekompensierten Patienten und den restlichen Stadien vor. In Abbildung 5 ist die Verteilung des Alters graphisch dargestellt.



**Abbildung 5:** Boxplot zur Darstellung der Altersverteilung (in Jahren) der einzelnen Stadien. Die Daten beziehen sich auf alle, innerhalb einer Gruppe, durchgeführten Untersuchungen (VES = ventrikuläre Extrasystolen, Echo = echokardiographische Veränderungen).

Ein Überblick über die erhobenen Befunde der elektrokardiographischen sowie der echokardiographischen Untersuchungen ist in Tabelle 5 gegeben.

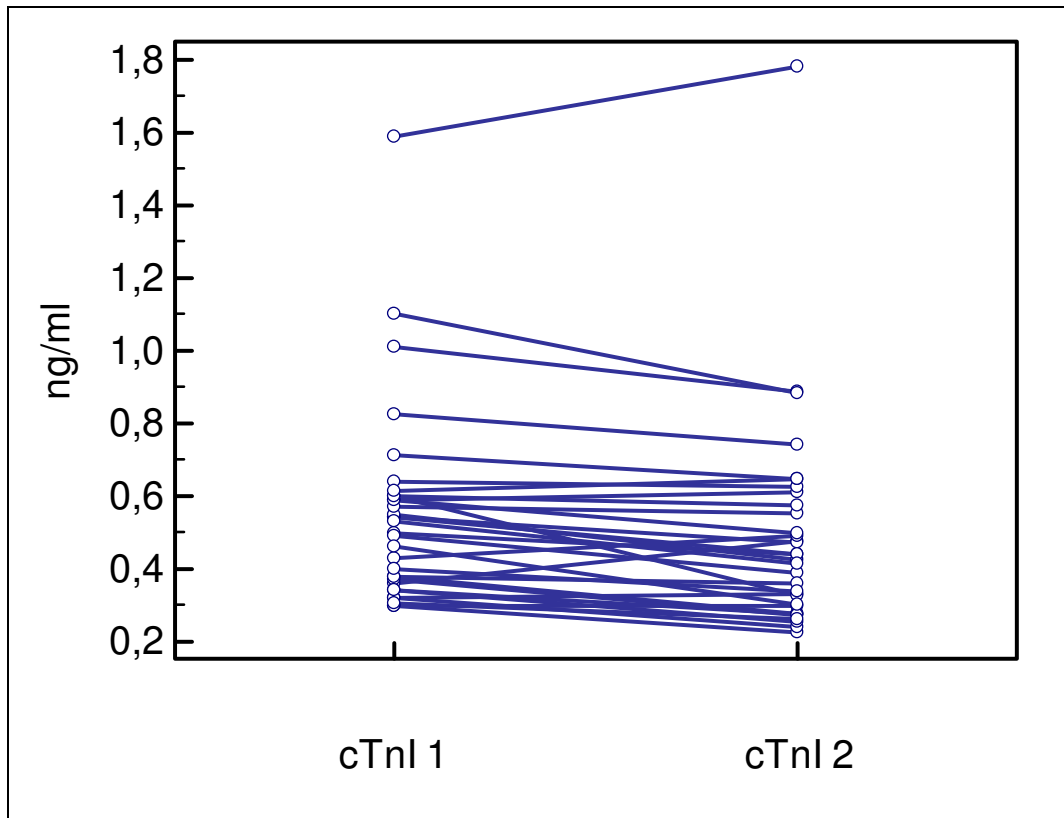
**Tabelle 5:** Darstellung der Anzahl an ventrikulären Extrasystolen, der rechtsparasternalen linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Volumina in Milliliter pro Quadratmeter, den rechtsparasternalen linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Dimensionen in Zentimetern sowie dem Verhältnis zwischen linken Atrium und Aorta der einzelnen Studiengruppen (VES = ventrikuläre Extrasystolen, Echo = echokardiographische Veränderungen, dekomp. = dekompensiert, EDV = rechtsparasternales linksventrikuläres enddiastolisches Volumen, ESV = rechtsparasternales linksventrikuläres endsystolisches Volumen, LVIDd = linksventrikuläre innere Dimension in der Diastole, LVIDs = linksventrikuläre innere Dimension in der Systole, LA/Ao = Verhältnis zwischen linken Atrium und Aorta, Mean = Mittelwert, Min. = Minimum, Max. = Maximum, ml/m<sup>2</sup> = Milliliter pro Quadratmeter, cm = Zentimeter, n = Anzahl der Untersuchungen).

Stadien		gesund	last normal	VES	Echo	VES + Echo	dekomp.
n		179	29	119	61	100	36
VES	Mean	8,3	12,9	3332,7	18,3	5564,0	3748,6
	Median	4,0	6,0	1018,0	11,0	1371,5	318,0
	Min.	0	0	102	0	101	4
	Max.	49	47	45521	49	100000	31741
EDV in ml/m <sup>2</sup>	Mean	74,2	76,6	79,1	114,2	114,8	159,3
	Median	75,1	77,4	79,6	106,6	109,0	138,0
	Min.	27,5	61,9	48,7	89,0	81,8	95,9
	Max.	94,7	94,2	94,9	201,4	162,0	267,5
ESV in ml/m <sup>2</sup>	Mean	37,8	40,1	41,2	73,5	72,3	111,2
	Median	37,7	39,4	41,7	69,1	66,8	98,1
	Min.	20,6	25,2	22,5	55,5	55,8	56,0
	Max.	54,6	54,9	54,8	160,0	117,7	212,3
LVIDd in cm	Mean	4,0	4,2	4,2	4,9	5,0	5,9
	Median	4,0	4,3	4,3	4,9	5,0	5,6
	Min.	3,1	3,6	3,3	4,8	4,1	4,6
	Max.	4,7	4,8	4,8	6,5	6,5	7,5
LVIDs in cm	Mean	2,9	3,1	3,2	3,9	4,0	5,0
	Median	2,9	3,0	3,1	4,0	4,0	4,8
	Min.	2,2	2,4	2,5	3,6	3,6	3,7
	Max.	3,6	3,7	3,7	5,9	5,6	7,4

<b>LA/Ao</b>	Mean	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	2,1
	Median	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	2,0
	Min.	0,8	1,0	1,0	1,0	0,9	1,6
	Max.	1,5	1,5	1,5	3,1	2,1	3,5

## 2. *In vitro* Langzeitstabilität des kardialen Troponin I

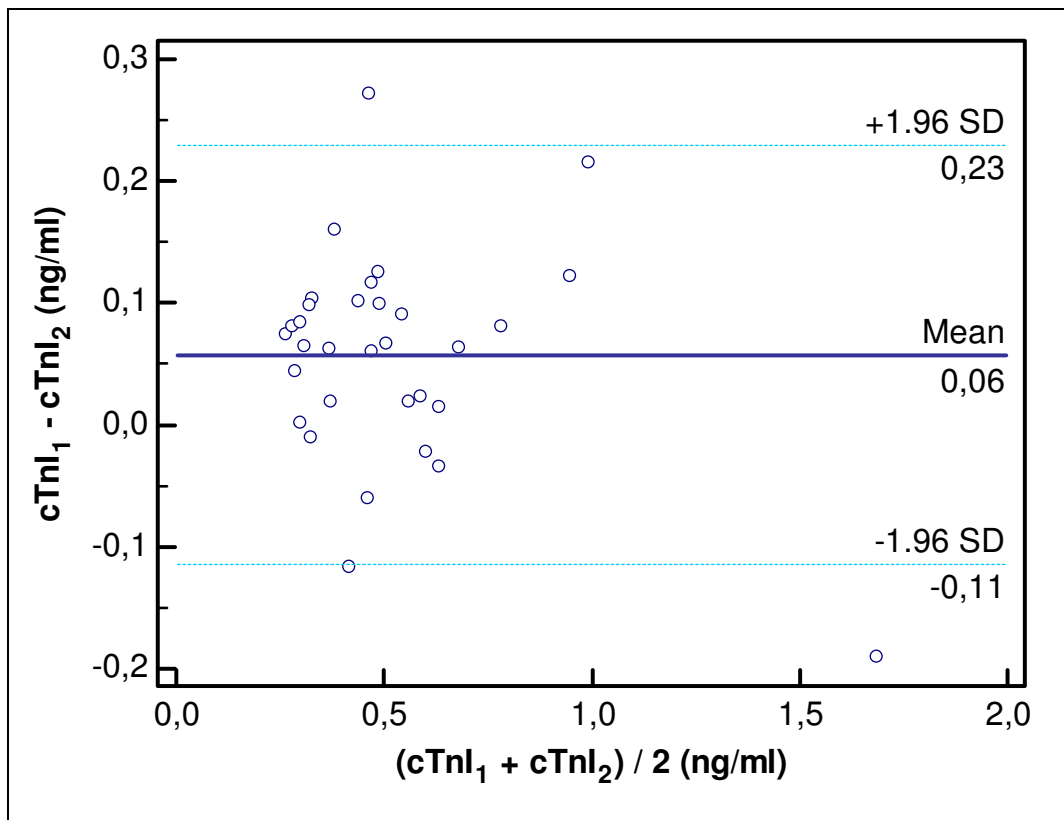
Die Untersuchung der *in vitro* Langzeitstabilität des cTnI erfolgte anhand von 64 gepaarten Serumproben von 32 Dobermännern. Die erste cTnI-Messung fand im Zeitraum der Blutprobenentnahme (Untersuchungszeitraum) statt, eine weitere nach unterschiedlich langer Lagerung bei -80 °C. Die cTnI-Analysen wurden jeweils mit dem gleichen Messgerät (Immulite® 2000 Troponin I) durch das Fremdlabor durchgeführt. Die maximale Lagerungsdauer betrug fünf Jahre und 77 Tage, die minimale Lagerungsdauer nahm einen Zeitraum von zwei Jahren und acht Monaten ein. Abbildung 6 zeigt ein Dot & Line-Diagramm, indem die cTnI-Konzentrationen der jeweiligen Serumpaare zum Probeentnahmezeitpunkt (cTnI<sub>1</sub>) sowie nach Lagerung bei -80 °C über maximal fünf Jahre und 77 Tage (cTnI<sub>2</sub>), graphisch dargestellt sind.



**Abbildung 6:** Dot & Line-Diagramm zur Darstellung der kardialen Troponin I-Konzentrationen (in Nanogramm pro Milliliter) der jeweiligen Serumpaare zum Probenentnahmezeitpunkt sowie nach Lagerung bei -80 °C über maximal fünf Jahre und 77 Tage. (cTnI 1 = kardiale Troponin I-Konzentration zum Probenentnahmezeitpunkt, cTnI 2 = kardiale Troponin I-Konzentration nach Lagerung bei -80 Grad Celsius, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter).

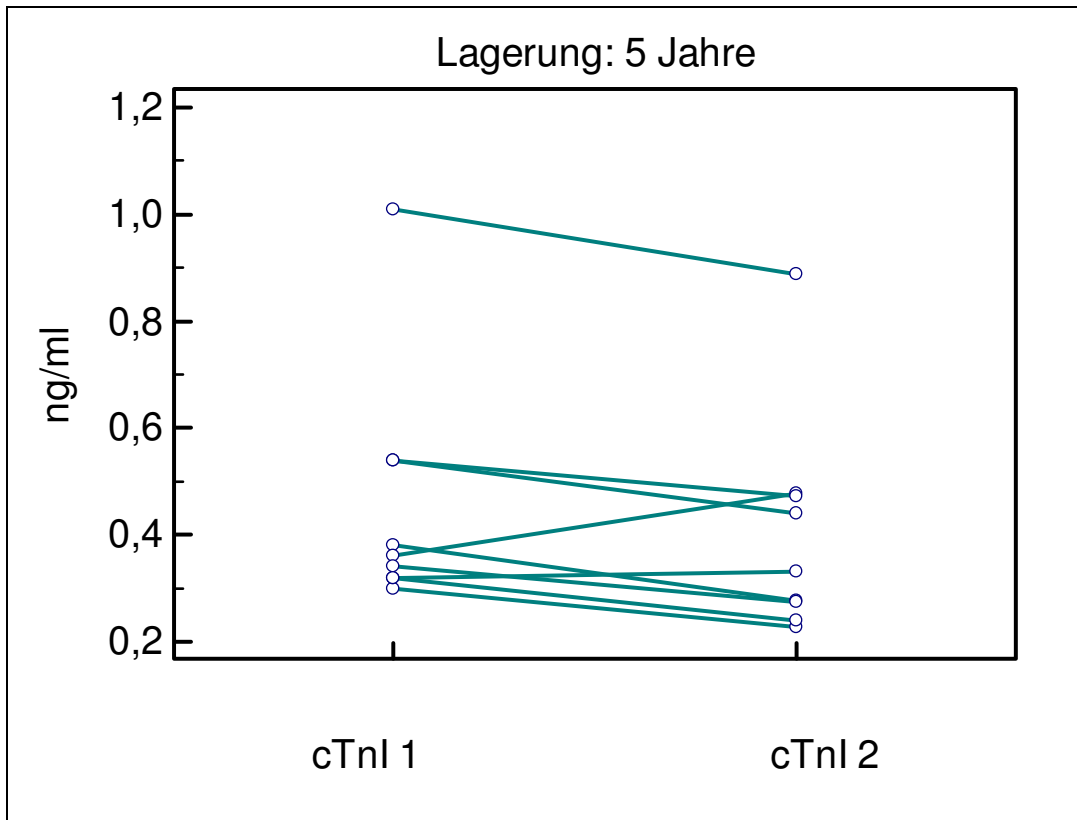
Zwischen den beiden Messzeitpunkten ergab sich eine minimale Differenz von 0,002 ng/ml und eine maximale Differenz von 0,272 ng/ml. Die Bland-Altman-Analyse (Abbildung 7) resultierte in einer mittleren Differenz (Mittelwert der Differenzen) von 0,06 ng/ml für die gepaarten cTnI-Konzentrationen. Die Standardabweichung der Differenzen betrug  $\pm 0,09$  ng/ml. Das 95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert lag bei 0,03 ng/ml (Untergrenze) respektive 0,09 ng/ml (Obergrenze). Die untere Übereinstimmungsgrenze (Mittelwert der Differenzen - 1,96 x Standardabweichung der Differenzen) nahm den Wert von -0,11 ng/ml ein, die obere Übereinstimmungsgrenze (Mittelwert der Differenzen + 1,96 x Standardabweichung der Differenzen) lag bei 0,23 ng/ml. Eine mittlere Differenz von + 0,06 ng/ml (13,9 %) spiegelt die Tendenz einer lagerungsbedingten Reduktion der cTnI-Konzentration wieder, welche allerdings keine statistische Signifikanz erreichte ( $p = 0,4221$ ).



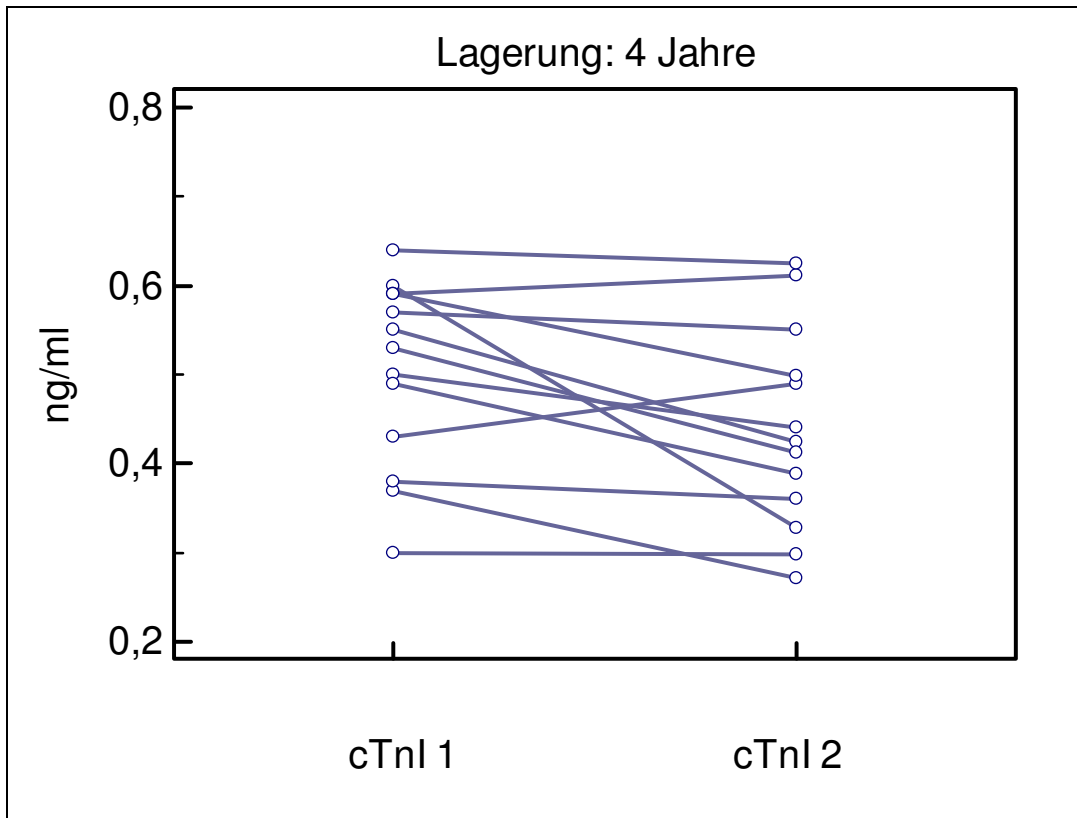


**Abbildung 7:** Bland-Altman-Plot zur Darstellung der Differenzen zwischen der kardialen Troponin I-Konzentration zum Probeentnahmezeitpunkt ( $cTnI_1$ ) und nach Lagerung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  ( $cTnI_2$ ). Die Differenzen der Troponin I-Konzentrationen ( $cTnI_1 - cTnI_2$ ) werden jeweils gegen die Mittelwerte der entsprechenden Troponin I-Konzentrationen ( $(cTnI_1 + cTnI_2) / 2$ ) aufgetragen. Der Mittelwert der Differenzen sowie die Übereinstimmungsgrenzen (Mittelwert  $\pm 1,96 \times$  Standardabweichung der Differenzen) sind anhand von drei zusätzlichen Linien dargestellt ( $cTnI_1$  = kardiale Troponin I-Konzentration zum Probeentnahmezeitpunkt,  $cTnI_2$  = kardiale Troponin I-Konzentration nach Lagerung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, SD = Standardabweichung der Differenzen, Mean = Mittelwert der Differenzen).

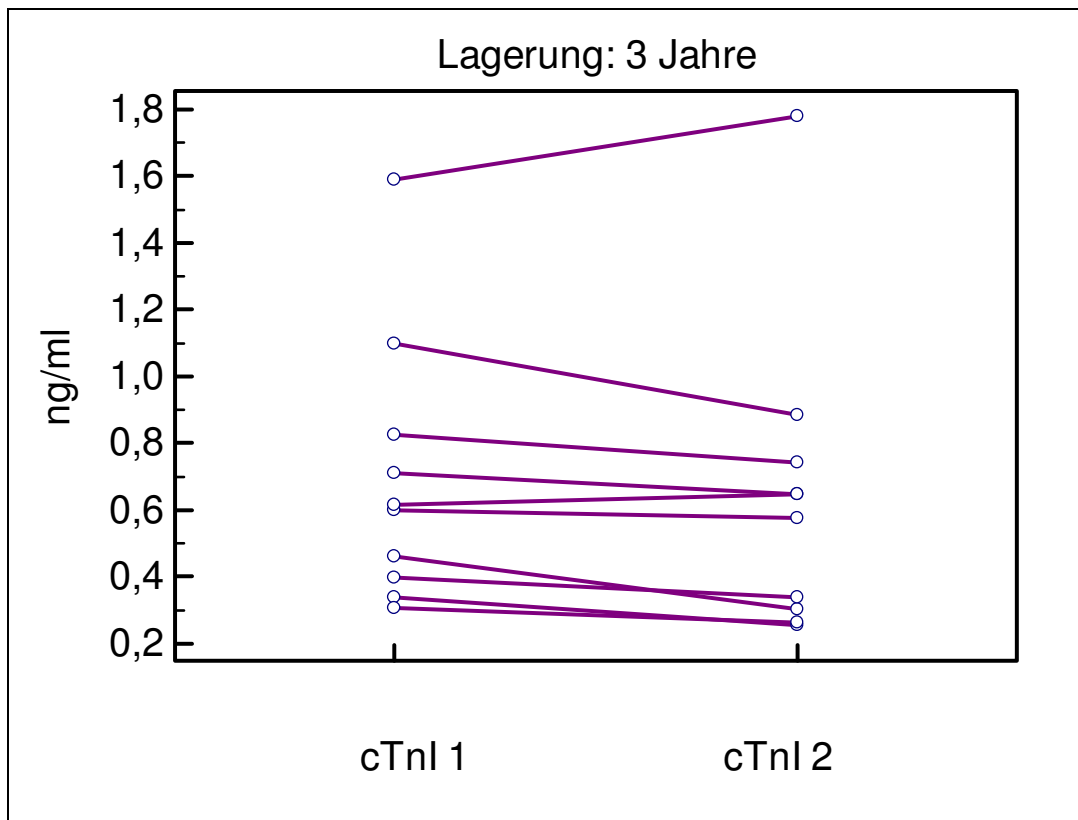
In den Dot & Line-Diagrammen 8 – 10 sind die  $cTnI$ -Konzentrationen der jeweiligen Serumpaare zum Probeentnahmezeitpunkt ( $cTnI_1$ ) sowie nach fünfjähriger, vierjähriger und dreijähriger Lagerung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  ( $cTnI_2$ ) graphisch dargestellt.



**Abbildung 8:** Dot & Line-Diagramm zur Darstellung der kardialen Troponin I-Konzentrationen (in Nanogramm pro Milliliter) der jeweiligen Serumpaare zum Probenentnahmezeitpunkt sowie nach einer Lagerungsdauer von fünf Jahren (cTnI 1 = kardiale Troponin I-Konzentration zum Probenentnahmezeitpunkt, cTnI 2 = kardiale Troponin I-Konzentration nach einer Lagerungsdauer von fünf Jahren bei -80 Grad Celsius, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter).



**Abbildung 9:** Dot & Line-Diagramm zur Darstellung der kardialen Troponin I-Konzentrationen (in Nanogramm pro Milliliter) der jeweiligen Serumpaare zum Probenentnahmezeitpunkt sowie nach einer Lagerungsdauer von vier Jahren (cTnI 1 = kardiale Troponin I-Konzentration zum Probenentnahmezeitpunkt, cTnI 2 = kardiale Troponin I-Konzentration nach einer Lagerungsdauer von vier Jahren bei -80 Grad Celsius, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter).



**Abbildung 10:** Dot & Line-Diagramm zur Darstellung der kardialen Troponin I-Konzentrationen (in Nanogramm pro Milliliter) der jeweiligen Serumpaare zum Probenentnahmezeitpunkt sowie nach einer Lagerungsdauer von drei Jahren (cTnI 1 = kardiale Troponin I-Konzentration zum Probenentnahmezeitpunkt, cTnI 2 = kardiale Troponin I-Konzentration nach einer Lagerungsdauer von drei Jahren bei -80 Grad Celsius, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter).

Eine Lagerung der Serumproben bei -80 °C für drei ( $p = 0,7929$ ), vier ( $p = 0,1437$ ) oder fünf ( $p = 0,6049$ ) Jahre war mit einer mittleren Konzentrationsabnahme von 0,05 ng/ml, 0,06 ng/ml und 0,05 ng/ml assoziiert. Keine dieser lagerungsbedingten Reduktionen der cTnI-Konzentration erreichte eine statistische Signifikanz.

### 3. ADVIA Centaur® TnI-Ultra

Neben der Validierung des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays mittels Überprüfung der Testpräzision (Intra- und Inter-Assay Varianz), wurde die Anwendung von Serum- und EDTA-Plasmaproben auf mögliche Abweichungen der cTnI-Konzentration untersucht. Außerdem wurde anhand der gesunden Kontrollgruppe der Einfluss des Alters auf die cTnI-Konzentration eruiert, die cTnI-Konzentrationen der verschiedenen Stadien untereinander verglichen und Cut-off-Werte zur Differenzierung zwischen herzgesunden und an der DoCM

erkrankten Hunden erstellt. Des Weiteren fand ein analytischer sowie klinischer Testvergleich zwischen dem hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra- und dem konventionellen Immulite® 2000 Troponin I-Assay statt.

### 3.1. Intra- und Inter-Assay Varianz

Die Berechnung der Intra-Assay Varianz (Tabelle 6) erfolgte anhand von zwei Serumproben unterschiedlicher cTnI-Konzentration, die innerhalb eines Messdurchlaufs jeweils zehnmal in Folge analysiert wurden.

**Tabelle 6:** Darstellung der Mittelwerte sowie der Variationskoeffizienten der Intra-Assay Varianz (ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient in Prozent).

Intra-Assay Varianz			
Serumprobe	Mittelwert (ng/ml)	SD	VK (%)
1	0,98	0,02	2,3
2	0,24	0,01	3,3

Die Bestimmung der Inter-Assay Varianz (Tabelle 7) wurde anhand von drei Serumproben unterschiedlicher cTnI-Konzentration durchgeführt. Zwei dieser Proben wurden jeweils einmal an zehn aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Dagegen erfolgte die Analyse der dritten Probe aufgrund des geringen Probenvolumens nur an sieben aufeinanderfolgenden Tagen.

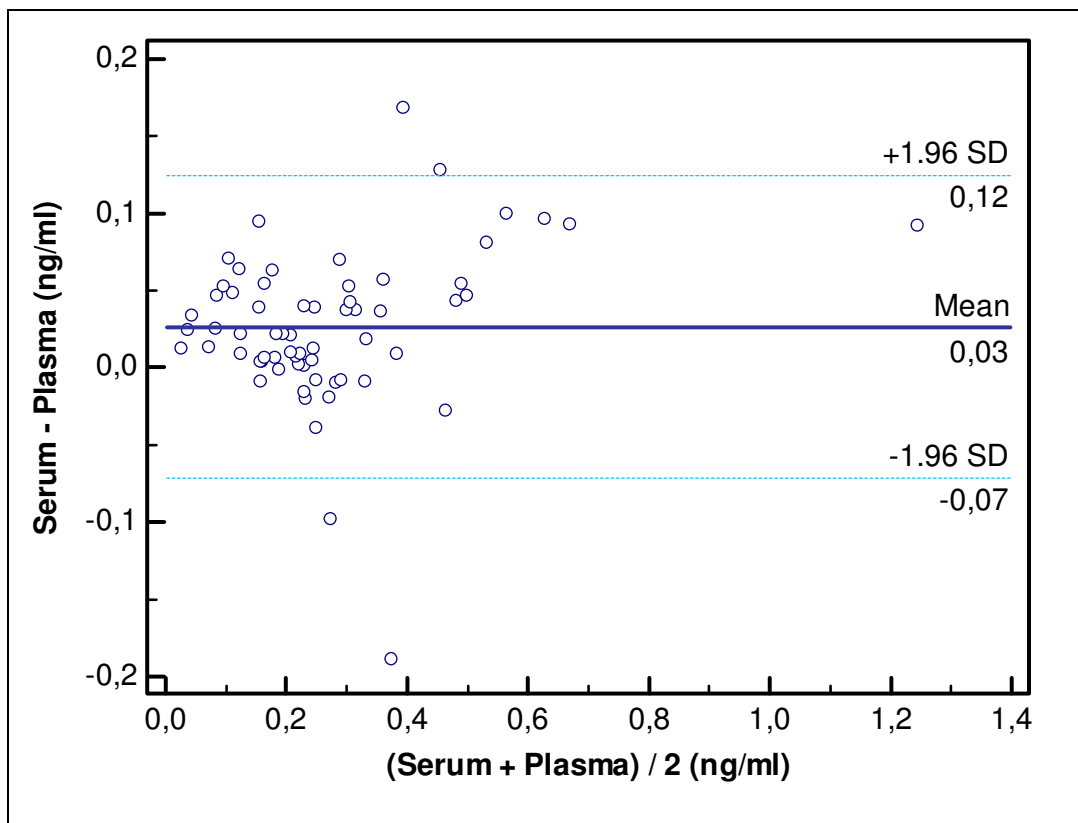
**Tabelle 7:** Darstellung der Mittelwerte sowie der Variationskoeffizienten der Inter-Assay Varianz (ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient in Prozent).

Inter-Assay Varianz				
Serumprobe	Anzahl der Messungen	Mittelwert (ng/ml)	SD	VK (%)
1	10	0,94	0,05	5,8
2	10	0,22	0,01	5,2
3	7	0,17	0,01	5,6

Die mittleren VK des Intra-Assays (2,8 %) sowie des Inter-Assays (5,5 %) erreichten somit einen Wert < 10 %, was eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse widerspiegelt.

### 3.2. Vergleich von Serum- und EDTA-Plasmaproben

Der analytische Vergleich der cTnI-Konzentrationen aus Serum- und EDTA-Plasmaproben erfolgte an 128 gepaarten Blutproben von 64 Dobermännern (64 Serum- und 64 EDTA-Plasmaproben). Unter Anwendung des hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays wurde die cTnI-Analyse bei jedem Hund sowohl aus Serum- als auch aus EDTA-Plasmaproben durchgeführt und die ermittelten Resultate auf Konzentrationsabweichungen überprüft. Mit Hilfe der Bland-Altman-Analyse (Abbildung 11) wurden die beiden Blutprobentypen, Serum und EDTA-Plasma, auf Übereinstimmung der analysierten cTnI-Konzentrationen geprüft.

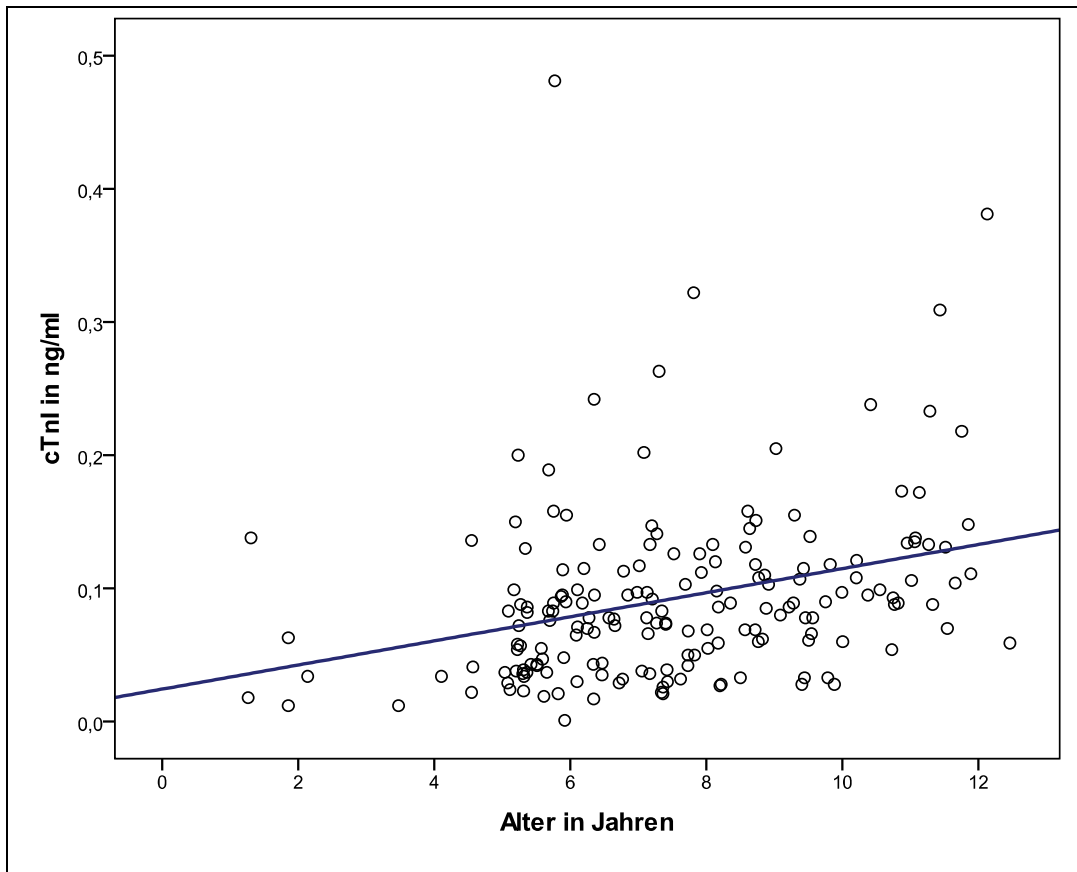


**Abbildung 11:** Bland-Altman-Plot zur Darstellung der Differenzen zwischen den ermittelten kardialen Troponin I-Konzentrationen aus Serum- und EDTA-Plasmaproben. Die Differenzen der Troponin I-Konzentrationen (Serum – Plasma) werden jeweils gegen den Mittelwert der entsprechenden Troponin I-Konzentrationen ((Serum + Plasma) / 2) aufgetragen. Der Mittelwert der Differenzen sowie die Übereinstimmungsgrenzen (Mittelwert  $\pm$  1,96 x Standardabweichung der Differenzen) werden anhand von drei zusätzlichen Linien dargestellt (ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, SD = Standardabweichung der Differenzen, Mean = Mittelwert der Differenzen).

Die mittlere cTnI-Konzentration der Serumproben betrug 0,29 ng/ml, die der EDTA-Plasmaproben 0,26 ng/ml. Die mittlere Differenz (Mittelwert der Differenzen) der gepaarten cTnI-Konzentrationen betrug 0,03 ng/ml (14,4 %), die Standardabweichung der Differenzen  $\pm 0,05$  ng/ml. Das 95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert lag bei 0,01 ng/ml (Untergrenze) respektive 0,04 ng/ml (Obergrenze). Zwischen den beiden Blutprobentypen ergab sich eine minimale Differenz von 0,001 ng/ml und eine maximale Differenz von 0,189 ng/ml. Die untere Übereinstimmungsgrenze (Mittelwert der Differenzen  $- 1,96 \times$  Standardabweichung der Differenzen) nahm den Wert von -0,07 ng/ml ein, die obere Übereinstimmungsgrenze (Mittelwert der Differenzen  $+ 1,96 \times$  Standardabweichung der Differenzen) lag bei 0,12 ng/ml. Im Durchschnitt ergaben die cTnI-Messungen aus Serumproben, im Vergleich zu jenen aus EDTA-Plasmaproben, um 0,03 ng/ml höhere Konzentrationen. Diese Konzentrationsabweichung war mit keiner statistischen Signifikanz assoziiert ( $p = 0,4645$ ).

### **3.3. Einfluss des Alters auf die cTnI-Konzentration**

Der Einfluss des Lebensalters auf die cTnI-Konzentration wurde anhand der gesunden Kontrollgruppe untersucht. Abbildung 12 zeigt ein Streudiagramm in dem die cTnI-Konzentration in ng/ml gegen das Alter in Jahren aufgetragen wurde. Wie bereits optisch zu erkennen ist weist das Lebensalter, trotz der schwachen Korrelation ( $R^2 = \text{Determinationskoeffizient} = 0.095$ ), einen statistisch signifikanten Einfluss auf die cTnI-Konzentration auf ( $p = 0,000$ ). Mit zunehmendem Alter konnte ein signifikanter Anstieg der cTnI-Konzentration nachgewiesen werden.



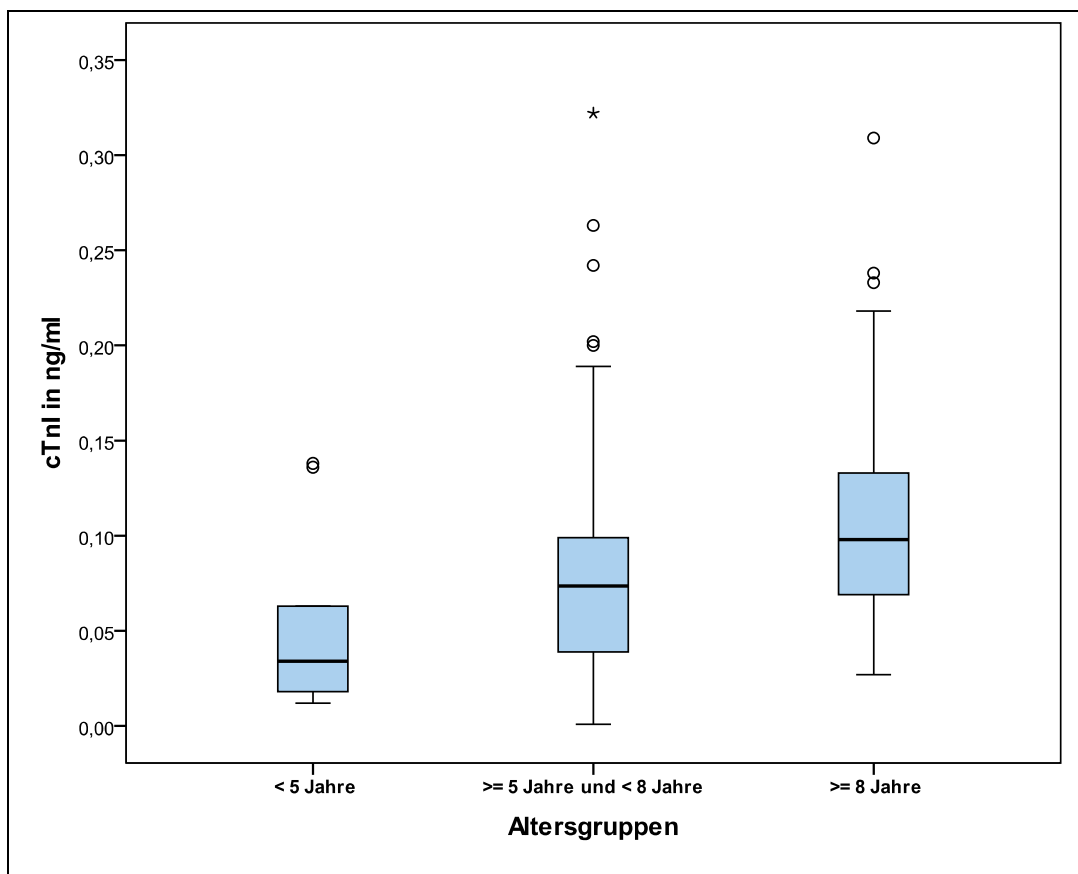
**Abbildung 12:** Darstellung der kardialen Troponin I-Konzentration in Nanogramm pro Milliliter gegen das Alter der gesunden Kontrolltiere. Die eingezeichnete blaue Linie stellt die Regressionsgerade dar (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter).

Die Unterteilung der Kontrollgruppe in drei verschiedene Altersgruppen (jünger als fünf Jahre, zwischen fünf und acht Jahren und älter als acht Jahre) ergab zwischen allen Altersgruppen signifikante Unterschiede in den mittleren cTnI-Konzentrationen (Tabelle 8 und Abbildung 13).



**Tabelle 8:** Mittlere kardiale Troponin I-Konzentrationen in Nanogramm pro Milliliter von herzgesunden Dobermännern drei verschiedener Altersgruppen (n = Anzahl der Kontrolltiere, SD = Standardabweichung, Min. = Minimum, Max. = Maximum)

Alter in Jahren	n	Mean	SD	Min.	Max.
< 5	10	0,051	0,048	0,012	0,138
≥ 5 und < 8	98	0,085	0,068	0,001	0,481
≥ 8	71	0,109	0,062	0,027	0,381
<b>Insgesamt</b>	179	0,092	0,066	0,001	0,481



**Abbildung 13:** Boxplot zur Darstellung der kardialen Troponin I-Konzentration in Nanogramm pro Milliliter der gesunden Kontrolltiere in Abhängigkeit des Lebensalters (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter).

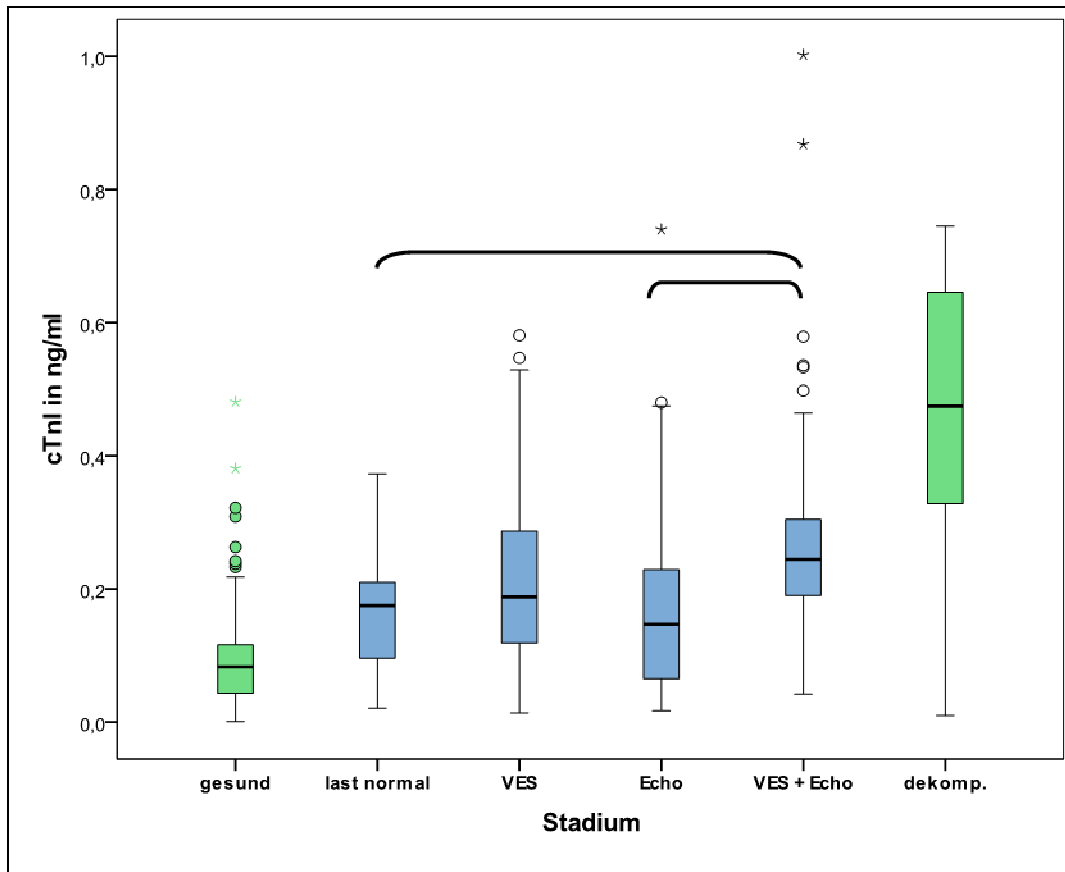
### 3.4. Vergleich der verschiedenen Krankheitsstadien

CTnI-Analysen wurden in allen Studiengruppen (gesund, last normal, ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen, elektro- und echokardiographische Abnormalitäten, dekompensiert) durchgeführt. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen sowie die Medianwerte, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9:** Darstellung der cTnI-Konzentrationen in Nanogramm pro Milliliter der einzelnen Studiengruppen (Mean = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min. = Minimum, Max. = Maximum, VES = ventrikuläre Extrasystolen, Echo = echokardiographische Veränderungen, n = Anzahl der Untersuchungen)

	Mean	Median	SD	Min.	Max.	n
<b>gesund</b>	0,092	0,083	0,066	0,001	0,481	179
<b>last normal</b>	0,168	0,175	0,091	0,021	0,373	29
<b>VES</b>	0,211	0,188	0,130	0,014	0,581	119
<b>Echo</b>	0,173	0,147	0,135	0,017	0,740	61
<b>VES + Echo</b>	0,296	0,244	0,277	0,042	2,497	100
<b>dekompensiert</b>	0,593	0,475	0,479	0,010	2,537	36

Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen wurden untereinander mit Hilfe des Mehrfachvergleichs nach Tamhane untersucht, wodurch folgende statistisch signifikante Unterschiede in der mittleren cTnI-Konzentration ermittelt werden konnten (Abbildung 14): Im Vergleich zu allen Krankheitsstadien (ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen, elektro- und echokardiographische Abnormalitäten, dekompensiert), wies die gesunde Kontrollgruppe mit 0,092 ng/ml eine statistisch signifikant niedrigere mittlere cTnI-Konzentration auf. Ebenso lag ein signifikanter cTnI-Konzentrationsunterschied zwischen den herzgesunden Kontrolltieren und dem Stadium last normal vor, für welches eine mittlere cTnI-Konzentration von 0,168 ng/ml ermittelt wurde.



**Abbildung 14:** Boxplot zur Darstellung der Troponin I-Konzentrationen der verschiedenen Studiengruppen. Die mittlere Troponin I-Konzentration der gesunden Kontrollgruppe (grün) sowie des dekompensierten Stadiums (grün) zeigten einen statistisch signifikanten Konzentrationsunterschied im Vergleich zu allen anderen Stadien. Weitere statistisch signifikante Konzentrationsunterschiede sind durch die Verbindungsbalken gekennzeichnet. (VES = ausschließlich ventrikuläre Extrasystolen, Echo = echokardiographische Veränderungen, dekomp. = dekompensiert, cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter).

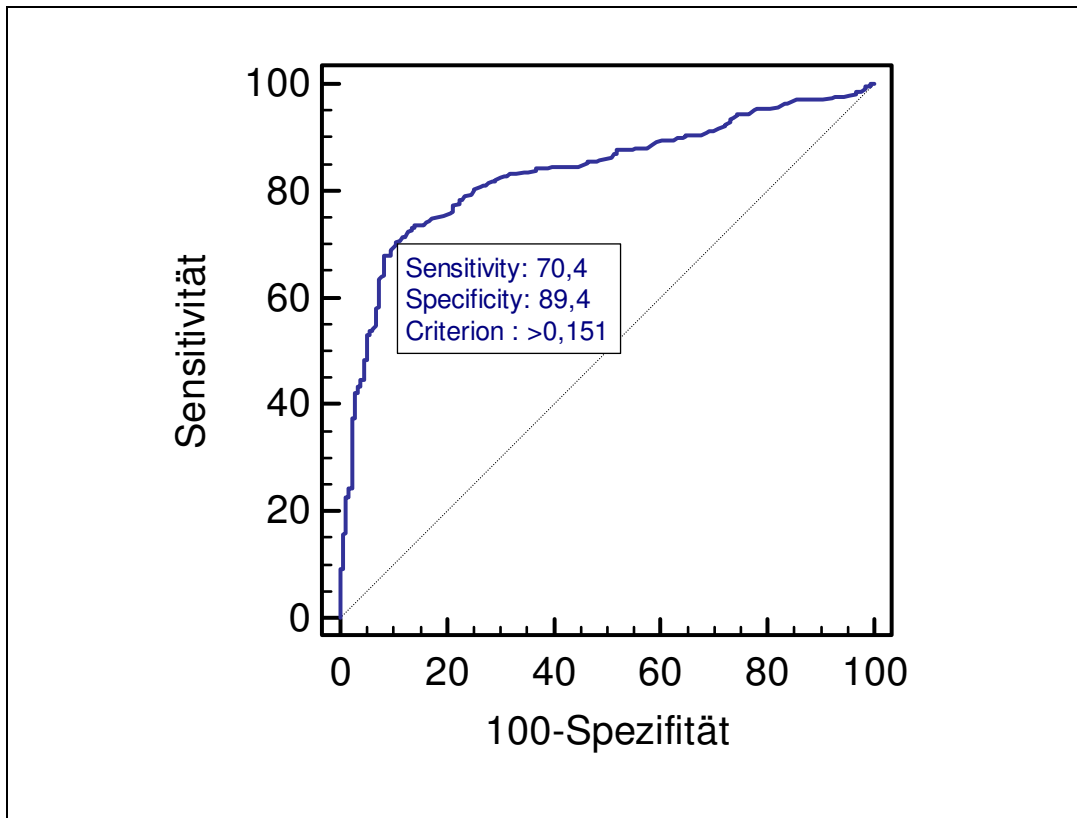
Unterschiede in der mittleren cTnI-Konzentration, die eine statistische Signifikanz erreichten, konnten auch zwischen den Gruppen der erkrankten Dobermänner nachgewiesen werden. Die Patienten die sowohl elektro- als auch echokardiographische Veränderungen zeigten (Mittelwert = 0,296 ng/ml), wiesen gegenüber allen anderen Stadien, außer jenem mit ausschließlich VES (Mittelwert = 0,211 ng/ml), einen statistisch signifikanten Konzentrationsunterschied auf. Wie bereits optisch in Abbildung 14 zu erkennen ist, lagen weitere statistisch signifikante Unterschiede in der mittleren cTnI-Konzentration zwischen den dekompensierten Patienten (Mittelwert = 0,593 ng/ml) und den restlichen Stadien (gesund, last normal, ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen, Kombination aus elektro- und echokardiographischen

Abnormalitäten) vor. Die Gruppe last normal zeigte keinen signifikanten cTnI-Konzentrationsunterschied gegenüber den Tieren, die ausschließlich VES oder ausschließlich echokardiographische Veränderungen (Mittelwert = 0,173 ng/ml) aufwiesen. Außerdem konnte keine signifikante Differenz in der cTnI-Konzentration zwischen den Patienten mit ausschließlich echokardiographischen Abnormalitäten, einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, dem Stadium last normal und der Gruppe mit ausschließlich VES festgestellt werden.

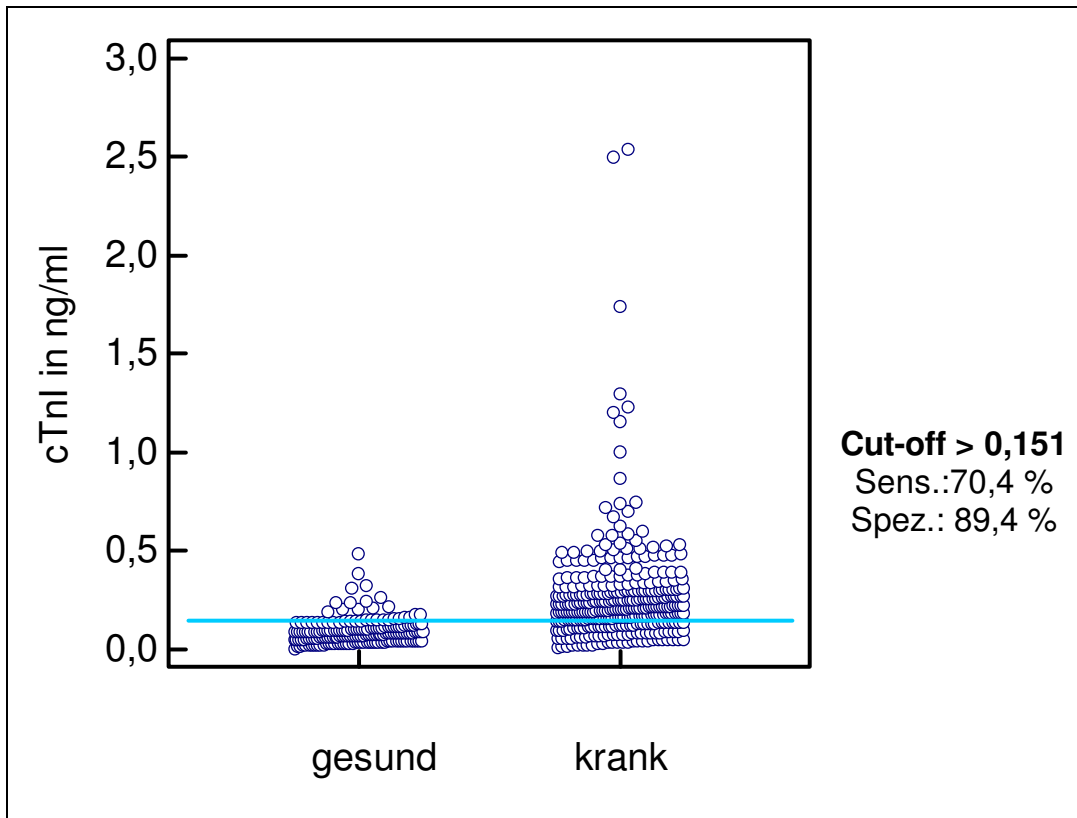
### **3.5. Cut-off-Werte**

Mit Hilfe von ROC-Kurven wurden die Sensitivität sowie die Spezifität verschiedener Cut-off-Werte zur Differenzierung zwischen den herzgesunden Kontrolltieren und den verschiedenen Krankheitsstadien berechnet. Außerdem wurde anhand der ermittelten AUC das Unterscheidungspotential des cTnI beurteilt.

Der von dem Statistikprogramm MedCalc als optimal berechneter Cut-off-Wert zur Differenzierung zwischen jeglichen Krankheitsstadien der DoCM (last normal, ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen, Kombination aus VES und echokardiographischen Abnormalitäten, dekompensiert) und den herzgesunden Kontrolltieren ergab eine cTnI-Konzentration von  $> 0,151$  ng/ml. Mit diesem Cut-off-Wert (0,151 ng/ml) konnten alle an der DoCM erkrankten Patienten inklusive der Gruppe last normal mit einer Sensitivität von 70,4 % und einer Spezifität von 89,4 % von den herzgesunden Kontrolltieren differenziert werden. Dabei wies die ROC-Kurve eine AUC von 0,835 auf (Abbildung 15 und 16).



**Abbildung 15:** ROC-Kurve zur Differenzierung zwischen herzgesunden Kontrolltieren und den an der Dobermann-Kardiomyopathie erkrankten Patienten (last normal, ausschließlich ventrikuläre Extrasystolen, ausschließlich echokardiographische Veränderungen, Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, dekompensiert) anhand der kardialen Troponin I-Konzentration. Auf der x-Achse ist die Spezifität, auf der y-Achse die Sensitivität in Prozent dargestellt. AUC = 0,835.



**Abbildung 16:** Dot-Diagramm zur Darstellung individueller Troponin I-Konzentrationen von herzgesunden und an der Dobermann-Kardiomyopathie erkrankten Patienten (last normal, ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen, Kombination aus VES und echokardiographischen Abnormalitäten, dekompensiert). Der als optimal berechnete Cut-off-Wert von 0,151 Nanogramm pro Milliliter ist als blaue Linie eingezeichnet, wodurch sowohl falsch positive (Troponin I-Konzentrationen oberhalb des Cut-off-Wertes innerhalb der gesunden Kontrollgruppe) als auch falsch negative Resultate (Troponin I-Konzentrationen unterhalb des Cut-off-Wertes innerhalb der Krankheitsstadien) dargestellt werden (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität).

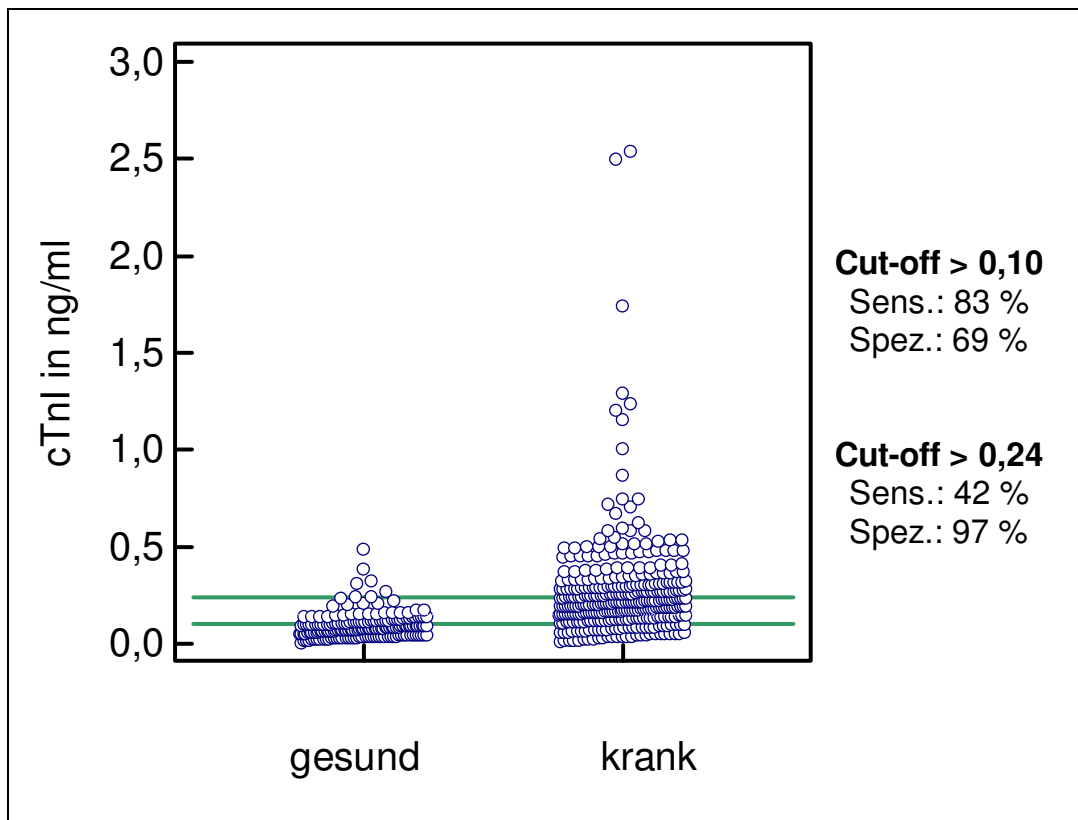
Im Folgenden wurden weitere Cut-off-Werte (0,104 ng/ml, 0,202 ng/ml und 0,242 ng/ml), zur Differenzierung zwischen herzgesunden Kontrolltieren und an der DoCM erkrankten Patienten, bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität untersucht. In Tabelle 10 sind sowohl die Sensitivitäten als auch die Spezifitäten der oben genannten Cut-off-Werte aufgelistet.

**Tabelle 10:** Darstellung der Sensitivität sowie der Spezifität in Prozent von den einzelnen kardialen Troponin I-Cut-off-Werten in Nanogramm pro Milliliter.

Cut-off	Sensitivität	Spezifität
0,104	82,9	68,7
0,151	70,4	89,4
0,202	53,9	94,4
0,242	42,3	97,2

Anhand der in Tabelle 10 aufgeführten Sensitivitäten und Spezifitäten wurden die beiden Cut-off-Werte von 0,104 ng/ml und 0,242 ng/ml für die Differenzierung zwischen herzgesunden und an der DoCM erkrankten Patienten ausgewählt. Übersteigt die cTnI-Konzentration den Wert von 0,104 ng/ml liegt aufgrund der hohen Sensitivität von 82,9 % und der relativ niedrigen Spezifität von 68,7 % der Verdacht auf eine bestehende DoCM vor. Bei cTnI-Konzentrationen > 0,242 ng/ml ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Patient an der DoCM erkrankt ist dagegen sehr hoch (Spezifität von 97,2 %).

Abbildung 17 zeigt ein Dot-Diagramm in dem die beiden ausgewählte Cut-off-Werte von 0,104 ng/ml und 0,242 ng/ml als grüne Linien eingezeichnet sind.



**Abbildung 17:** Dot-Diagramm zur Darstellung individueller Troponin I-Konzentrationen von herzgesunden und an der Dobermann-Kardiomyopathie erkrankten Patienten (last normal, ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen, Kombination aus VES und echokardiographischen Abnormalitäten, dekompensiert). Die Cut-off-Werte von 0,104 und 0,242 Nanogramm pro Milliliter sind als grüne Linien eingezeichnet, wodurch sowohl falsch positive (Troponin I-Konzentrationen oberhalb der Cut-off-Werte innerhalb der gesunden Kontrollgruppe) als auch falsch negative Resultate (Troponin I-Konzentrationen unterhalb der Cut-off-Werte innerhalb der Krankheitsstadien) dargestellt werden (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität).

In Tabelle 11 sind sowohl die prozentualen Anteile der falsch positiven (gesunde Dobermänner mit cTnI-Konzentrationen, die den Cut-off-Wert überschreiten) als auch der falsch negativen Resultate (an der DoCM erkrankte Patienten deren cTnI-Konzentrationen unterhalb des Cut-off-Wertes liegen) für den jeweiligen Cut-off-Wert von 0,104 und 0,242 ng/ml aufgelistet.



**Tabelle 11:** Auflistung der falsch positiven und der falsch negativen sowie der richtig positiven und richtig negativen Testresultate, unter Verwendung von zwei verschiedenen Cut-off-Werten (0,104 und 0,242 Nanogramm pro Milliliter). Angegeben sind zum einen die absolute Anzahl der Hunde und zum anderen der prozentuale Anteil. Die Gesamtanzahl der gesunden Kontrolltiere (falsch positiv und richtig negativ) beträgt 179 Patienten, die der an der Dobermann-Kardiomyopathie erkrankten Hunde (richtig positiv und falsch negativ) 345 (Falsch pos. = falsch positiv = gesunde Hunde mit kardialen Troponin I-Konzentrationen oberhalb des Cut-off-Wertes, Richtig neg. = richtig negativ = gesunde Hunde mit kardialen Troponin I-Konzentrationen unterhalb des Cut-off-Wertes, Falsch neg. = falsch negativ = kranke Patienten mit kardialen Troponin I-Konzentrationen unterhalb des Cut-off-Wertes, Richtig pos. = richtig positiv = kranke Patienten mit kardialen Troponin I-Konzentrationen oberhalb des Cut-off-Wertes,  $n_1$  = Anzahl der gesunden Kontrolltiere,  $n_2$  = Anzahl der an der Dobermann-Kardiomyopathie erkrankten Patienten).

Cut-off	Falsch pos.	Richtig neg.	Falsch neg.	Richtig pos.
	$n_1 = 179$	$n_1 = 179$	$n_2 = 345$	$n_2 = 345$
> 0,104	59	120	58	287
	33 %	67 %	17 %	83 %
> 0,242	6	173	197	148
	3 %	97 %	57 %	43 %

Unter Verwendung des Cut-off-Wertes von 0,104 ng/ml konnten von den insgesamt 179 gesunden Kontrolltieren 120 (67 %) korrekterweise als herzgesund erkannt werden. Dagegen wurden 59 (33 %) gesunde Tiere fälschlicherweise als krank identifiziert. Wählt man den höheren Cut-off-Wert von 0,242 ng/ml liegt die Rate der falsch positiven Resultate lediglich bei 3 %.

Bei einem Cut-off-Wert von 0,104 ng/ml stellten sich von den insgesamt 345 cTnI-Ergebnissen der kranken Patientenpopulation 58 Resultate als falsch negativ heraus. Demnach blieben 17 % der an der DoCM erkrankten Patienten unerkannt. Dieser prozentuale Anteil stieg unter Verwendung des höheren Cut-off-Wertes von 0,242 ng/ml auf 57 % (197 Testergebnisse) an.

Die Anzahl der falsch negativen cTnI-Resultate, die bei der Anwendung des Cut-off-Wertes von 0,104 ng/ml entstanden sind, werden in Tabelle 12 für die jeweiligen Krankheitsstadien aufgeführt.

**Tabelle 12:** Auflistung der falsch negativen kardialen Troponin I-Testresultate innerhalb der einzelnen Krankheitsstadien unter Anwendung des Cut-off-Wertes von 0,104 Nanogramm pro Milliliter. Angegeben sind sowohl die absoluten sowie die prozentualen Zahlen der falsch negativen Resultate (VES = Patienten mit ausschließlich ventrikulären Extrasystolen und einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, Echo = Patienten mit ausschließlich echokardiographischen Abnormalitäten sowie einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, VES + Echo = Patienten mit einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, dekomp. = dekompensierte Patienten, n = gesamte Patientenanzahl innerhalb des entsprechenden Krankheitsstadiums).

Stadium		last normal	VES	Echo	VES + Echo	dekomp.
<b>n</b>	Absolut	29	219	161	100	36
<b>Falsch negativ</b>	Absolut	8	27	27	5	1
	prozentual	27,6	12,3	16,8	5	2,8

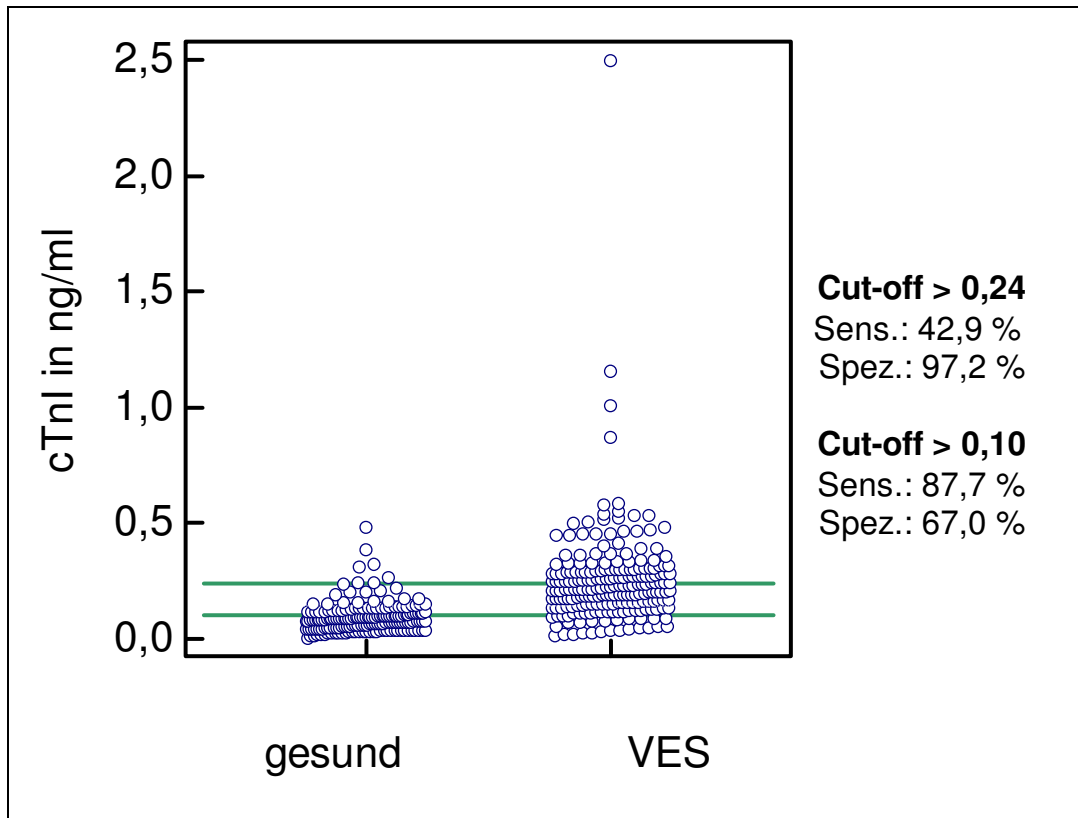
Bei alleiniger Betrachtung der cTnI-Konzentrationen (Cut-off > 0,104 ng/ml) wurden demnach 27,6 % der Patienten des Stadiums last normal, 12,3 % der Dobermänner mit ventrikulären Arrhythmien, 16,8 % der Patienten mit echokardiographischen Veränderungen, 5 % der Tiere, die sowohl elektro- als auch echokardiographische Abnormalitäten zeigten und 2,8 % im dekompensierten Stadium, nicht als an der DoCM erkrankt identifiziert.

Das Vorhersagepotential des cTnI für Patienten mit VES (ausschließlich VES und eine Kombination aus VES und echokardiographischen Veränderungen) sowie für Patienten mit echokardiographischen Abnormalitäten (ausschließlich echokardiographische Veränderungen und eine Kombination aus VES und echokardiographischen Veränderungen) hat sich mit einer AUC von 0,862 versus einer AUC von 0,838 als ähnlich erwiesen. In Tabelle 13 sind die Sensitivitäten sowie die Spezifitäten der verschiedenen Cut-off-Werte zur Differenzierung zwischen herzgesunden Kontrolltieren und Patienten mit VES sowie zur Differenzierung zwischen herzgesunden Kontrolltieren und Patienten mit echokardiographischen Veränderungen aufgelistet.

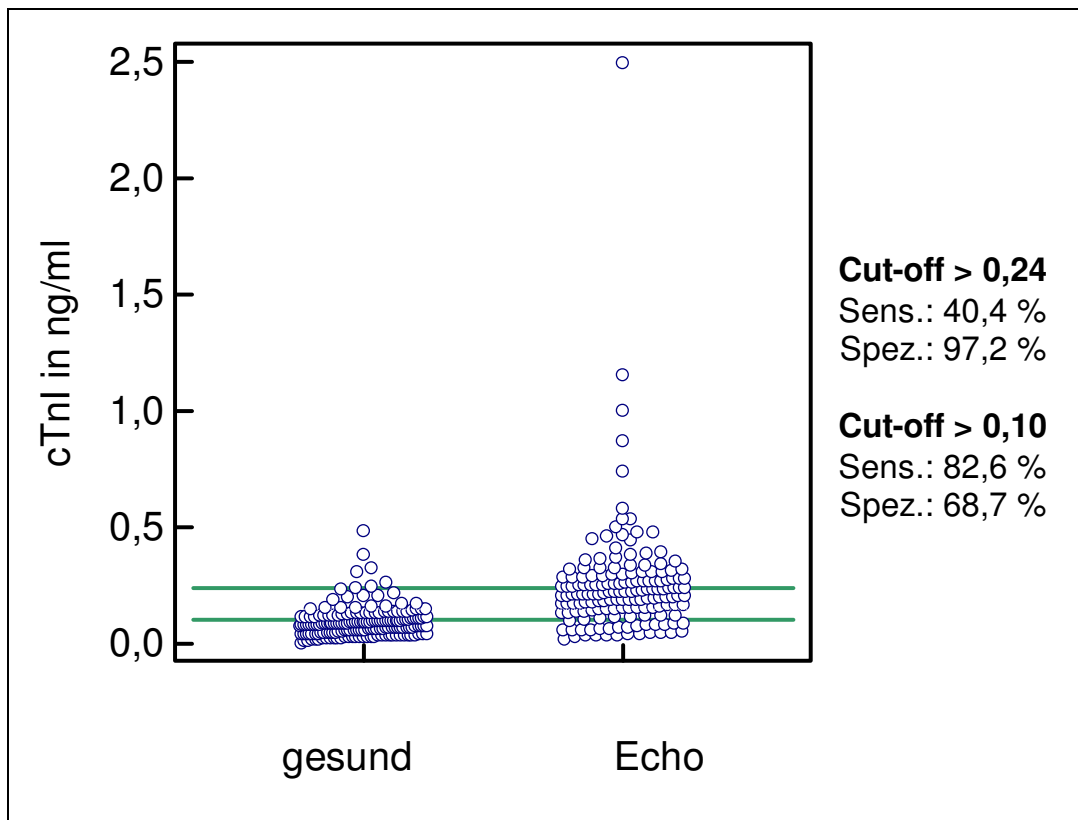
**Tabelle 13:** Auflistung der Sensitivität sowie der Spezifität zwei verschiedener Troponin I-Cut-off-Werte in Nanogramm pro Milliliter zur Unterscheidung zwischen herzgesunden Kontrolltieren und Patienten mit ventrikulären Extrasystolen sowie zur Differenzierung zwischen herzgesunden Kontrolltieren und Patienten mit echokardiographischen Veränderungen (VES = Patienten mit ausschließlich ventrikulären Extrasystolen oder einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, Echo = Patienten mit ausschließlich echokardiographischen Abnormalitäten oder einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen).

Cut-off		Gesund versus VES	Gesund versus Echo
<b>&gt;0,104</b>	Sensitivität	87,7 %	82,6 %
	Spezifität	67,0 %	68,7 %
<b>&gt;0,242</b>	Sensitivität	42,9 %	40,4 %
	Spezifität	97,2 %	97,2 %

Abbildung 18 und 19 zeigt ein Dot-Diagramm, in dem die individuellen cTnI-Konzentrationen von herzgesunden Dobermännern und Patienten mit VES beziehungsweise echokardiographischen Veränderungen abgebildet sind. Außerdem werden die Cut-off-Werte von 0,104 und 0,242 ng/ml durch zwei grüne Linien dargestellt.



**Abbildung 18:** Dot-Diagramm zur Darstellung individueller Troponin I-Konzentrationen von herzgesunden Dobermännern und Patienten mit ventrikulären Extrasystolen. Die Cut-off-Werte von 0,104 und 0,242 Nanogramm pro Milliliter sind als grüne Linien eingezeichnet, wodurch sowohl falsch positive (Troponin I-Konzentrationen oberhalb der Cut-off-Werte innerhalb der gesunden Kontrollgruppe) als auch falsch negative Resultate (Troponin I-Konzentrationen unterhalb der Cut-off-Werte innerhalb des Krankheitsstadiums) dargestellt werden (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, VES = Patienten mit ventrikulären Extrasystolen oder einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität).



**Abbildung 19:** Dot-Diagramm zur Darstellung individueller Troponin I-Konzentrationen von herzgesunden Dobermännern und Patienten mit echokardiographischen Veränderungen. Die Cut-off-Werte von 0,104 und 0,242 Nanogramm pro Milliliter sind als grüne Linien eingezeichnet, wodurch sowohl falsch positive (Troponin I-Konzentrationen oberhalb der Cut-off-Werte innerhalb der gesunden Kontrollgruppe) als auch falsch negative Resultate (Troponin I-Konzentrationen unterhalb der Cut-off-Werte innerhalb des Krankheitsstadiums) dargestellt werden (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, Echo = Patienten mit echokardiographischen Abnormalitäten oder einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität).

Sowohl für die Gruppe der Dobermänner mit VES als auch für jene mit echokardiographischen Veränderungen sind die falsch negativen cTnI-Resultate für die Cut-off-Werte von 0,104 und 0,242 ng/ml in Tabelle 14 dargestellt.

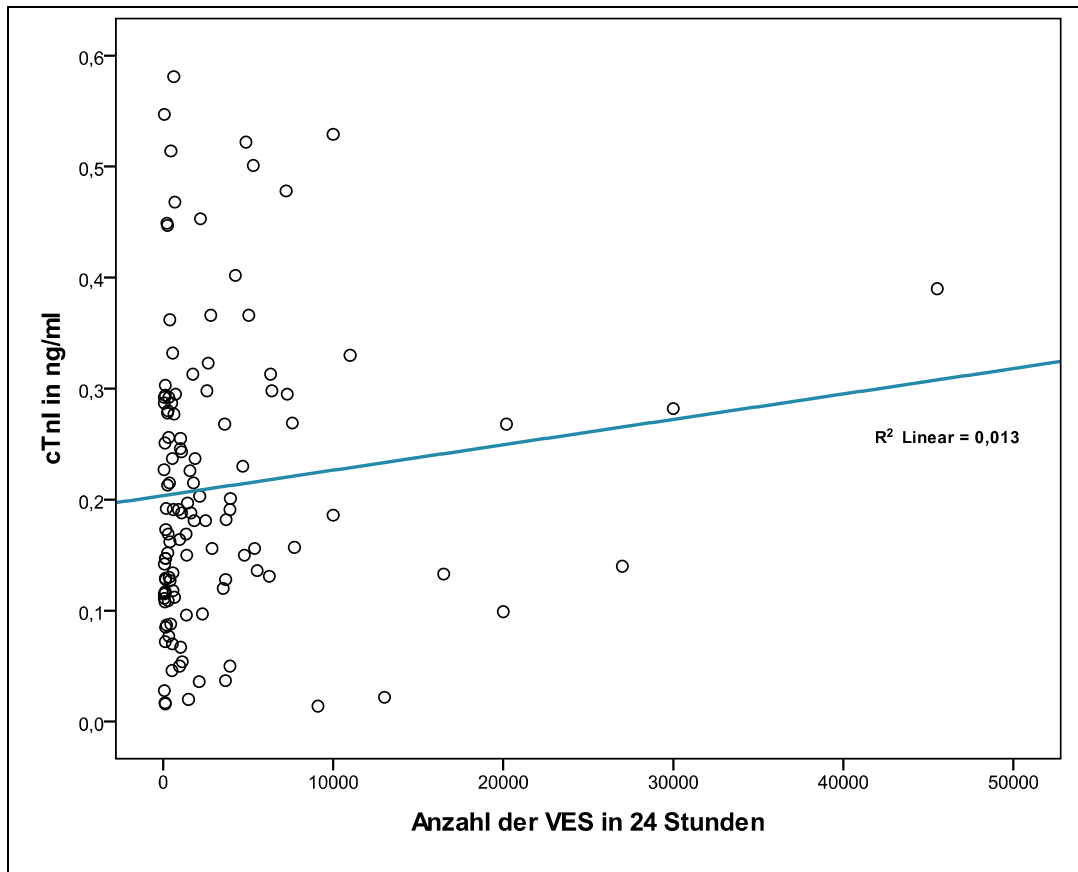
**Tabelle 14:** Auflistung der falsch negativen Troponin I-Testresultate der Patienten mit ventrikulären Extrasystolen sowie der Patienten mit echokardiographischen Veränderungen, unter Verwendung zwei verschiedener Cut-off-Werte (0,104 und 0,242 Nanogramm pro Milliliter). Angegeben sind zum einen die absolute Anzahl der Hunde und zum anderen der prozentuale Anteil (VES = Patienten mit ventrikulären Extrasystolen oder einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, Echo = Patienten mit echokardiographischen Abnormalitäten oder einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, n = Anzahl der Untersuchungen).

Cut-off		VES n = 219	Echo n = 161
> 0,104	absolut	27	27
	prozentual	12,3 %	16,8 %
> 0,242	absolut	124	94
	prozentual	56,6 %	58,4 %

Von den insgesamt 219 Patienten mit ventrikulären Arrhythmien wurden bei Verwendung eines Cut-off-Wertes von 0,104 ng/ml 27 (12,3 %) Tiere fälschlicherweise als herzgesund eingestuft. Dagegen war der Cut-off-Wert von 0,242 ng/ml bei diesen Patienten mit 124 (56,6 %) falsch negativen cTnI-Resultaten assoziiert. Der Cut-off-Wert von 0,104 ng/ml war bei den 161 Patienten mit echokardiographischen Veränderungen mit 27 (16,8 %) falsch negativen cTnI-Ergebnissen vergesellschaftet. Wählt man den höheren Cut-off-Wert von 0,242 ng/ml liegt die Rate der falsch negativen Resultate innerhalb dieser Patientengruppe bei 58,4 % (94).

### 3.6. Einfluss der Anzahl an ventrikulären Extrasystolen

Abbildung 20 zeigt ein Streudiagramm in dem die cTnI-Konzentrationen in ng/ml gegen die Anzahl an VES in 24 Stunden aufgetragen sind. In die statistische Auswertung gingen hierbei die Daten jener Dobermänner ein, die ausschließlich VES (> 100 VES in 24 Stunden) aufwiesen.



**Abbildung 20:** Darstellung der kardialen Troponin I-Konzentration von Patienten mit ausschließlich ventrikulären Extrasystolen, gegen die von diesen gezeigte Anzahl an ventrikulären Extrasystolen in 24 Stunden. Die eingezeichnete Linie stellt die Regressionsgerade dar (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, VES = ventrikuläre Extrasystolen,  $R^2$  = standardisierter Regressionskoeffizient im Quadrat).

Zwischen der cTnI-Konzentration und der Anzahl an VES in 24 Stunden konnte keine statistisch signifikante Korrelation ( $R^2$  = Determinationskoeffizient = 0,013,  $p = 0,224$ ) ermittelt werden.

### 3.7. Testvergleich

Im Folgendem wurde ein analytischer sowie ein klinischer Vergleich zwischen dem hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay und dem konventionellen Immulite® 2000 Troponin I-Test durchgeführt.

#### 3.7.1. Analytischer Vergleich

Für den Vergleich der von den beiden cTnI-Tests erhaltenen Resultate wurden Untersuchungsergebnisse von Dobermännern aus der Studienpopulation verwendet, bei denen cTnI-Ergebnisse von beiden der oben genannten Tests vorlagen. Resultate, die unterhalb des Detektionslimits des jeweiligen cTnI-

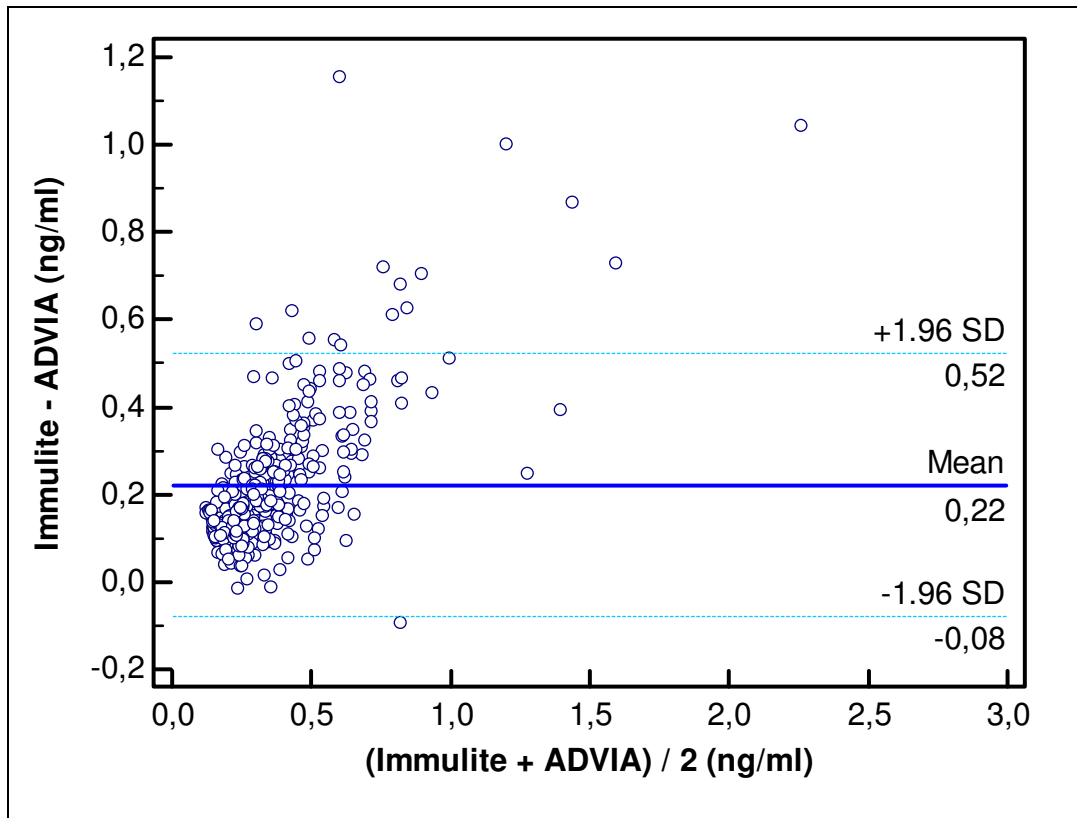
Assays lagen, wurden für den Vergleich der cTnI-Resultate ausgeschlossen. Insgesamt konnten cTnI-Konzentrationen von 372 Proben, die sowohl mit dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay als auch mit dem Immulite® 2000 Troponin I-Test analysiert wurden, verglichen werden. In Tabelle 15 ist der Mittelwert, der Median, der Minimal- sowie der Maximalwert des jeweiligen cTnI-Test aufgeführt.

**Tabelle 15:** Darstellung des Mittelwertes, des Medians, des Minimal- sowie des Maximalwertes der kardialen Troponin I-Konzentration in Nanogramm pro Milliliter von zwei verschiedenen Troponin I-Assays (cTnI = kardiales Troponin I, n = Anzahl der analysierten Proben, Min. = Minimum, Max. = Maximum).

<b>cTnI-Analyse</b> n = 372	<b>Mean</b>	<b>Median</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
ADVIA	0,26	0,21	0,010	2,537
Immulite	0,49	0,40	0,20	5,19

Abbildung 21 zeigt ein Bland-Altman-Plot in dem die Differenzen zwischen den cTnI-Resultaten des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays und des Immulite® 2000 Troponin I-Tests (Immulite – ADVIA) der jeweiligen Proben gegen den Mittelwert der entsprechenden cTnI-Konzentrationsdifferenz ((Immulite – ADVIA) / 2) aufgetragen sind. Hierbei ergab sich eine mittlere Differenz von 0,22 ng/ml (64,5 %). Die Standardabweichung der Differenzen betrug  $\pm 0,15$  ng/ml. Das 95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert lag bei 0,21 ng/ml (Untergrenze) respektive 0,24 ng/ml (Obergrenze). Die untere Übereinstimmungsgrenze (Mittelwert der Differenzen – 1,96 x Standardabweichung der Differenzen) nahm den Wert von -0,08 ng/ml ein, die obere Übereinstimmungsgrenze (Mittelwert der Differenzen + 1,96 x Standardabweichung der Differenzen) lag bei 0,52 ng/ml. Im Vergleich zu den cTnI-Resultaten des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays ergaben die Messungen mittels des Immulite® 2000 Troponin I-Tests im Durchschnitt um 0,22 ng/ml höhere cTnI-Ergebnisse. Die von den zwei verschiedenen cTnI-Assays ermittelten cTnI-Konzentrationen unterscheiden sich statistisch signifikant voneinander ( $p < 0,0001$ ). Des Weiteren ist ersichtlich, dass mit ansteigender cTnI-Konzentration auch die Differenz zwischen den analysierten Resultaten zunimmt.





**Abbildung 21:** Bland-Altman-Plot zur Darstellung der Differenzen zwischen den kardialen Troponin I-Resultaten des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays und des Immulite® 2000 Troponin I-Tests (Immulite – ADVIA). Die Differenzen der kardialen Troponin I-Konzentrationen werden jeweils gegen den Mittelwerte der entsprechenden Troponin I-Konzentrationsdifferenz ((Immulite – ADVIA) / 2) aufgetragen. Der Mittelwert der Differenzen (dunkelblau) sowie die Übereinstimmungsgrenzen (Mittelwert  $\pm$  1,96 x Standardabweichung der Differenzen) werden anhand von drei zusätzlichen Linien dargestellt (ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, SD = Standardabweichung der Differenzen, Mean = Mittelwert der Differenzen).

### 3.7.2. Klinischer Vergleich

Um die klinische Konkordanz des hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays und des konventionellen Immulite® 2000 Troponin I-Tests evaluieren zu können, wurden insgesamt 507 Proben der Studienpopulation herangezogen. Die cTnI-Analysen der einzelnen Proben erfolgten hierbei sowohl mit dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay als auch mit dem Immulite® 2000 Troponin I-Test. CTnI-Resultate unterhalb des Detektionslimits gingen hierbei ebenfalls in die Datenanalyse ein.

Die insgesamt 507 gepaarten cTnI-Resultate stammten von 174 herzgesunden Dobermännern und 333 Untersuchungen von an der DoCM erkrankten Patienten. In Tabelle 16 sind die Anzahl der Studientiere, die Anzahl der Untersuchungen

sowie die Verteilung der physiologischen Parameter (Geschlecht, Alter und Gewicht) innerhalb der einzelnen Gruppen dargestellt. Die Daten der physiologischen Parameter beziehen sich hierbei auf alle Untersuchungen, die innerhalb der einzelnen Gruppen durchgeführt wurden.

**Tabelle 16:** Darstellung der Anzahl der Einzeltiere, der Anzahl der durchgeführten Untersuchungen sowie der Verteilung von Alter in Jahren, Gewicht in Kilogramm und Geschlecht innerhalb der einzelnen Stadien. Die Daten der physiologischen Parameter beziehen sich auf alle, innerhalb der einzelnen Studiengruppen, durchgeführten Untersuchungen (VES = ventrikuläre Extrasystolen, Echo = echokardiographische Veränderungen, dekomp. = dekompensiert, US = Untersuchungen, Mean = Mittelwert).

		gesund	last normal	VES	Echo	VES + Echo	dekomp
Anzahl der Einzeltiere		174	28	45	24	41	20
Anzahl der US		174	28	114	60	98	33
Geschlecht	Weiblich	97	11	31	9	11	6
	männlich	77	17	14	15	30	14
Alter	Mean	7,51	6,31	8,36	6,08	8,19	7,32
	Median	7,29	6,33	8,45	6,06	8,21	7,80
	Minimum	1,26	1,96	1,71	2,38	2,74	3,64
	Maximum	12,46	10,36	13,0	11,73	16,24	11,25
Gewicht	Mean	35,24	37,86	35,1	35,50	37,68	36,02
	Median	35,00	39,00	34,3	35,70	37,20	37,00
	Minimum	23,40	25,00	23,6	25,00	24,40	26,00
	Maximum	48,00	48,00	48,5	45,00	49,20	47,40

Zur Differenzierung zwischen herzgesunden und an der DoCM erkrankten Patienten wurde für den ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay der unter Punkt 3.5. dieses Kapitels, ermittelte Cut-off-Wert von 0,104 ng/ml herangezogen, für den Immulite® 2000 Troponin I-Test der von WESS und Mitarbeitern ermittelte Cut-off-Wert von 0,22 ng/ml (WESS et al., 2010b).

In Tabelle 17 sind unter anderem die für den jeweiligen cTnI-Assay eruierten Sensitivitäten, Spezifitäten und AUC aufgelistet. Außerdem ist die Anzahl der falsch positiven sowie der falsch negativen cTnI-Resultate angegeben.

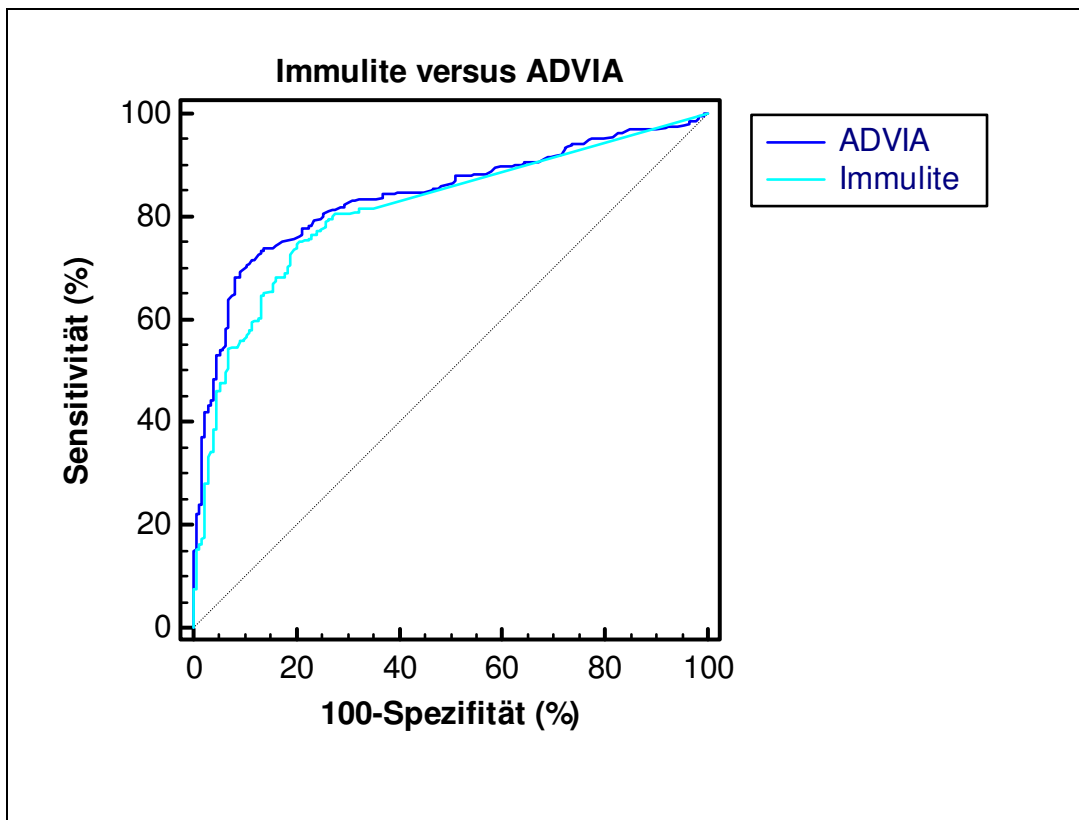
**Tabelle 17:** Darstellung verschiedener Daten für den Vergleich zwischen dem hochsensitiven ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay und dem konventionellen Immulite® 2000 Troponin I-Test (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, Sens. = Sensitivität in Prozent, Spez. = Spezifität in Prozent, AUC = Area under Curve,  $n_1$  = Anzahl der gesunden Kontrolltiere,  $n_2$  = Anzahl der Untersuchungen von an der Dobermann-Kardiomyopathie erkrankten Patienten)

<b>cTnI-Test</b>	<b>ADVIA</b>	<b>Immulite</b>
<b>Detektionslimit (ng/ml)</b>	0,006	0,20
<b>Cut-off (ng/ml)</b>	0,104	0,220
<b>Sens. (%)</b>	83,2	80,2
<b>Spez. (%)</b>	68,4	73,0
<b>AUC</b>	0,83	0,81
<b>Falsch positiv (<math>n_1 = 174</math>)</b>	58	48
<b>Falsch negativ (<math>n_2 = 333</math>)</b>	55	65

Im Vergleich zu dem Immulite® 2000 Troponin I-Tests ergab die Anwendung des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays zehn falsch positive Testresultate mehr, was mit einer Spezifität von 68,4 % für den ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay versus 73,0 % für den Immulite® 2000 Troponin I-Test assoziiert war. Dagegen wurden von dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay zehn kranke Patienten weniger verpasst, was in einer Sensitivität von 83,2 % für den ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay versus 80,2 % für den Immulite® 2000 Troponin I-Test resultierte.

Bezüglich des Stadiums last normal ( $n = 28$ ) führte der Immulite® 2000 Troponin I-Test zu zehn und der ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay zu 8 falsch negativen Resultaten. Demnach wurden mit dem Immulite® 2000 Troponin I-Test zwei (7,1 %) Patienten mehr verpasst und somit nicht als an der DoCM erkrankt identifiziert, als mit dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay.

Der Vergleich der ROC-Kurven beider cTnI-Assays ist in Abbildung 22 dargestellt.



**Abbildung 22:** Receiver Operating Characteristic–Kurven des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays (dunkelblau) sowie des Immulite® 2000 Troponin I-Tests (hellblau).

Für den ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay ergab sich eine AUC von 0,839, für den Immulite® 2000 Troponin I-Test dagegen eine AUC von 0,813, was mit einem statistisch signifikanten Unterschied verbunden war ( $p = 0,04$ ).

## 4. Follow-up

Eine oder mehrere Follow-up-Untersuchungen wurden zum einen bei jenen Dobermännern durchgeführt, die in einer vorherigen Studie elektro- und echokardiographisch als herzgesund beurteilt wurden, aber eine cTnI-Konzentration  $> 0,22$  ng/ml aufwiesen und zum anderen bei an der DoCM erkrankten Patienten mit einer cTnI-Konzentration  $< 0,22$  ng/ml. Insgesamt wurden 49 Dobermänner in die Follow-up-Studie eingeschlossen.

### 4.1. Herzgesunde Patienten mit erhöhten cTnI-Konzentrationen

Es wurden eine oder mehrere Follow-up-Untersuchungen bei 35 Dobermännern durchgeführt, die in der vorherigen Studie als herzgesund beurteilt wurden, allerdings eine cTnI-Konzentration  $> 0,22$  ng/ml aufwiesen. Der Zeitabstand zwischen der Feststellung einer erhöhten cTnI-Konzentration und der ersten Follow-up-Untersuchung betrug mindestens sechs Monate. Anhand der Follow-up-Untersuchungen konnte bei acht Patienten (22,9 %) eine DoCM diagnostiziert werden, bei zwei Dobermännern (5,7 %) bestand mit einer Anzahl von 87 und 67 VES (Grauzone = 50 - 100 VES) der Verdacht auf eine DoCM. Bei den übrigen 25 Hunden (71,4 %) konnten keine elektro- oder echokardiographische Hinweise auf eine DoCM festgestellt werden und wurden demnach weiterhin als herzgesund beurteilt (Tabelle 18).

**Tabelle 18:** Darstellung des Gesundheitsstatus und der kardialen Troponin I-Konzentration der ursprünglich als herzgesund beurteilten Patienten mit einer kardialen Troponin I-Konzentration  $> 0,22$  Nanogramm pro Milliliter, bezogen auf die zuletzt durchgeführte Follow-up-Untersuchung (DoCM = Dobermann-Kardiomyopathie, n = Anzahl der Patienten, cTnI = kardiale Troponin I-Konzentration zum Zeitpunkt der Follow-up-Untersuchung in Nanogramm pro Milliliter).

	n	cTnI $> 0,22$	cTnI $< 0,22$
<b>Weiterhin herzgesund</b>	25 (71,4 %)	15	10
<b>Erkrankung an DoCM</b>	8 (22,9 %)	7	1
<b>Verdacht auf DoCM</b>	2 (5,7 %)	2	-

Zwei Dobermänner erkrankten innerhalb von sechs bis zwölf Monaten nach der Feststellung einer erhöhten cTnI-Konzentration, ein Hund innerhalb 13 – 24 Monaten, vier weitere Tiere nach 25 – 36 Monaten, wobei bei einem

dieser vier Hunde bereits nach 24 Monaten, aufgrund von 81 VES der Verdacht auf eine DoCM bestand. Ein Patient erkrankte nach 56 Monaten. Vier von diesen an der DoCM erkrankten Hunde wiesen ausschließlich VES auf, ein Tier ausschließlich echokardiographische Veränderungen und drei Patienten zeigten sowohl VES als auch echokardiographische Abnormalitäten. Bei sieben der erkrankten Hunde waren die cTnI-Konzentrationen konstant erhöht, dagegen konnte bei einem Tier, das ausschließlich VES aufwies, eine Reduktion dieser unterhalb des Cut-off-Wertes von 0,22 ng/ml ermittelt werden. Der Verdacht auf eine mögliche beginnende DoCM wurde bei zwei Dobermännern anhand einer Follow-up-Untersuchung nach sechs und 13 Monaten ausgesprochen, wobei die cTnI-Konzentrationen weiterhin erhöht waren.

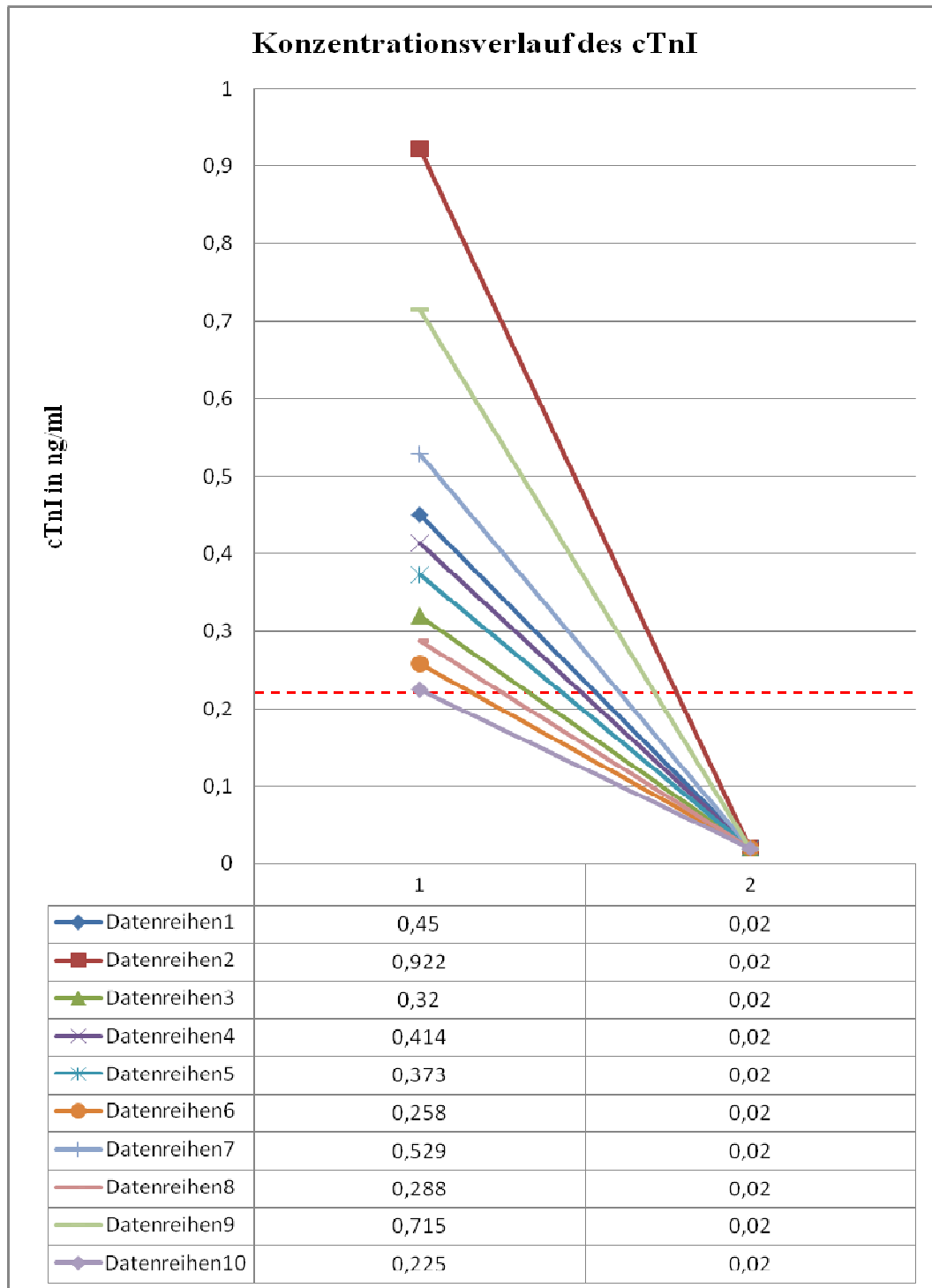
Von den verbleibenden 25 als herzgesund beurteilten Dobermännern konnten im Rahmen der durchgeführten Follow-up-Untersuchungen keine Hinweise auf eine bestehende DoCM nachgewiesen werden. Nach Feststellung einer erhöhten cTnI-Konzentration wurden 15 Hunde nach sechs bis zwölf Monaten, vier Patienten nach 13 – 24 Monaten, drei nach 25 – 36 Monaten und drei der Tiere nach > 36 Monaten weiterhin als gesund beurteilt. Die cTnI-Konzentration blieb bei 15 der gesunden Patienten trotzdem konstant über dem ermittelten Cut-off-Wert, bei den restlichen zehn Hunden konnte dagegen eine Reduktion dieser unter 0,22 ng/ml ermittelt werden.

In Tabelle 19 ist der Gesundheitsstatus der 35 ursprünglich als herzgesund beurteilten Patienten tabellarisch aufgezeigt.

**Tabelle 19:** Auflistung des Gesundheitsstatus der ursprünglich als herzgesund beurteilten Dobermänner (US = Untersuchung, DoCM = Dobermann-Kardiomyopathie, n = Gesamtzahl der Patienten der jeweiligen Gruppe).

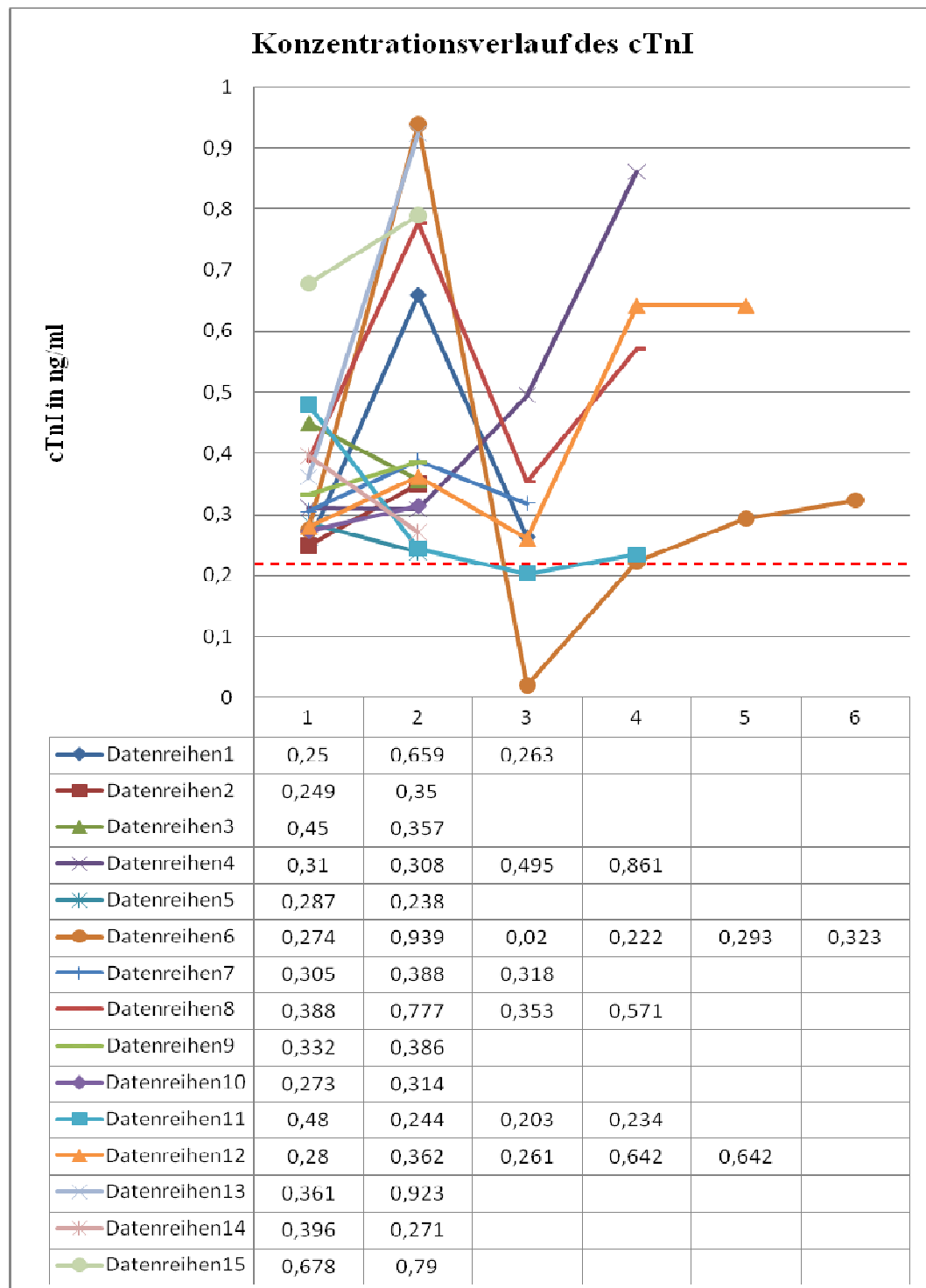
Follow-up-US nach:	Weiterhin herzgesund	Erkrankung an DoCM	Verdacht auf DoCM
6 -12 Monaten	15	2	1
13 – 24 Monaten	4	1	1
25 – 36 Monaten	3	4	-
> 36 Monaten	3	1	-
N	25	8	2

Die Abbildungen 23 und 24 geben einen graphischen Überblick über den Verlauf der cTnI-Konzentration der Patienten, die während der Follow-up-Untersuchungen weiterhin als herzgesund beurteilt wurden. Da das Detektionslimit des hier verwendeten cTnI-Assays bei 0,20 ng/ml lag, wurden in den Abbildungen cTnI-Konzentrationen  $< 0,20$  ng/ml als 0,02 ng/ml dargestellt.



**Abbildung 23:** Graphische Darstellung des kardialen Troponin I-Konzentrationsverlaufs der zehn Patienten, die anhand der Follow-up-Untersuchungen weiterhin als herzgesund beurteilt wurden und bei denen ein Abfall des cTnI-Serumspiegels unterhalb des Cut-off-Wertes ( $\leq 0,22$  Nanogramm pro Milliliter) festgestellt werden konnte (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, Datenreihen 1 – 10 = kardiale Troponin I-Konzentrationen der zehn Patienten, Untersuchungen: 1 = Ausgangskonzentration des kardialen Troponin I, 2 = kardiale Troponin I-Konzentration bei der Follow-up-Untersuchung).

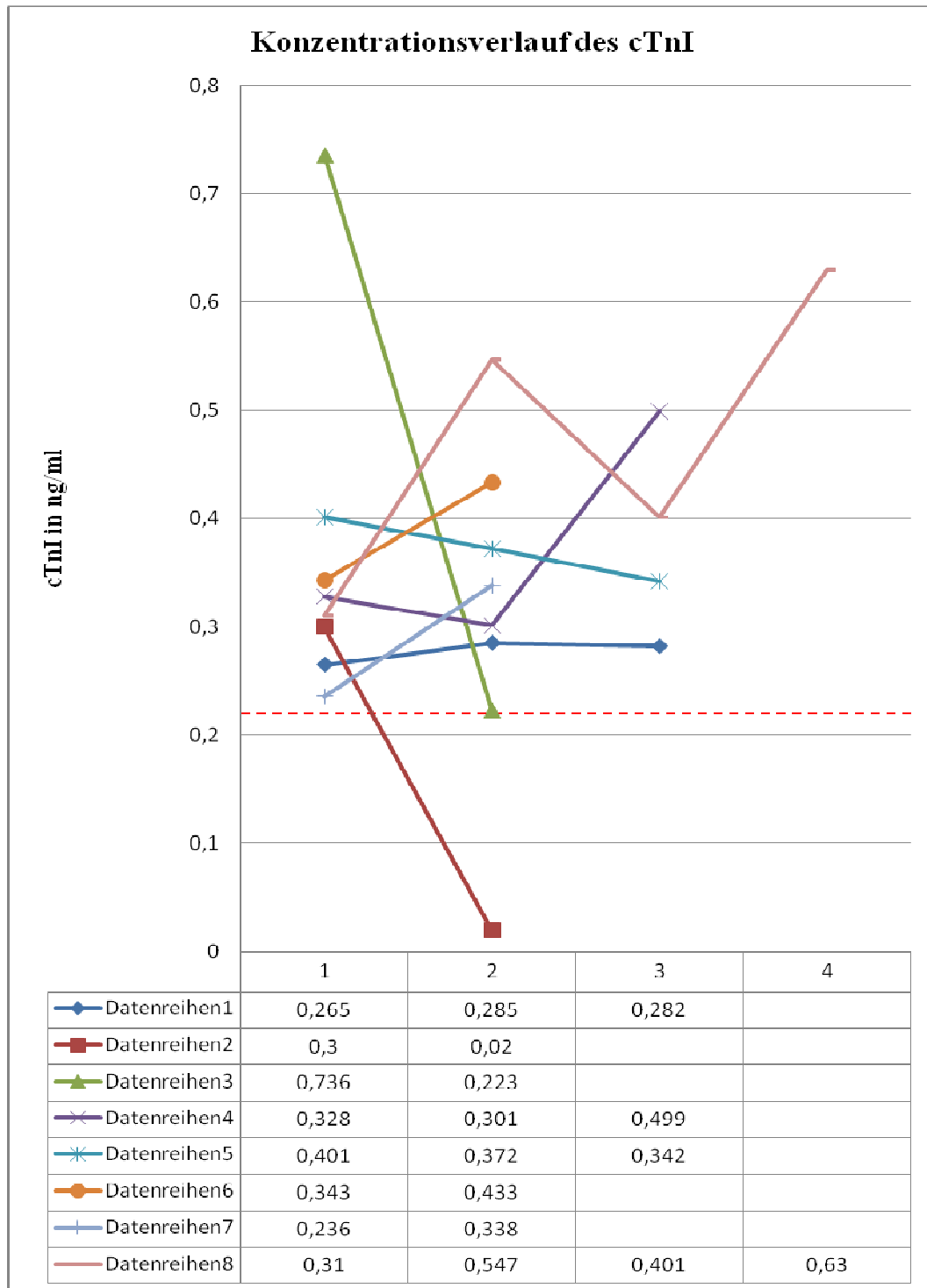




**Abbildung 24:** Graphische Darstellung des kardialen Troponin I-Konzentrationsverlaufs der 15 Patienten, die anhand der Follow-up-Untersuchungen weiterhin als herzgesund beurteilt wurden, aber deren cTnI-Konzentrationen bei der letzten Follow-up-Untersuchung nach wie vor den Cut-off-Wert von 0,22 Nanogramm pro Milliliter überschritten (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, Datenreihen 1 – 15 = kardiale Troponin I-Konzentrationen der 15 Patienten, Untersuchungen: 1 = Ausgangskonzentration des kardialen Troponin I, 2 - 6 = kardiale Troponin I-Konzentration bei den entsprechenden Follow-up-Untersuchungen).

Von den 15 Patienten, die aufgrund der Follow-up-Untersuchungen weiterhin als herzgesund beurteilt wurden und bei der letzten Follow-up-Untersuchung eine cTnI-Konzentration oberhalb des Cut-off-Wertes von 0,22 ng/ml aufwiesen, zeigten sechs Tiere einen Anstieg der cTnI-Konzentration. Allerdings lag bei fünf dieser Patienten lediglich eine Follow-up-Untersuchung vor. Bei drei Hunden konnte anhand von jeweils einer Follow-up-Untersuchung eine Reduktion des cTnI-Serumspiegels detektiert werden. Deutliche Schwankungen der cTnI-Konzentration wurden bei insgesamt sechs Patienten festgestellt, wobei zwei Tiere jeweils einen Wert  $< 0,22$  ng/ml zeigten, aber diesen Cut-off-Wert bei der darauffolgenden Untersuchung wieder überschritten.

In Abbildung 25 wird der cTnI-Konzentrationsverlauf jener Dobermänner aufgezeigt, die während der Follow-up-Studie an der DoCM erkrankten.

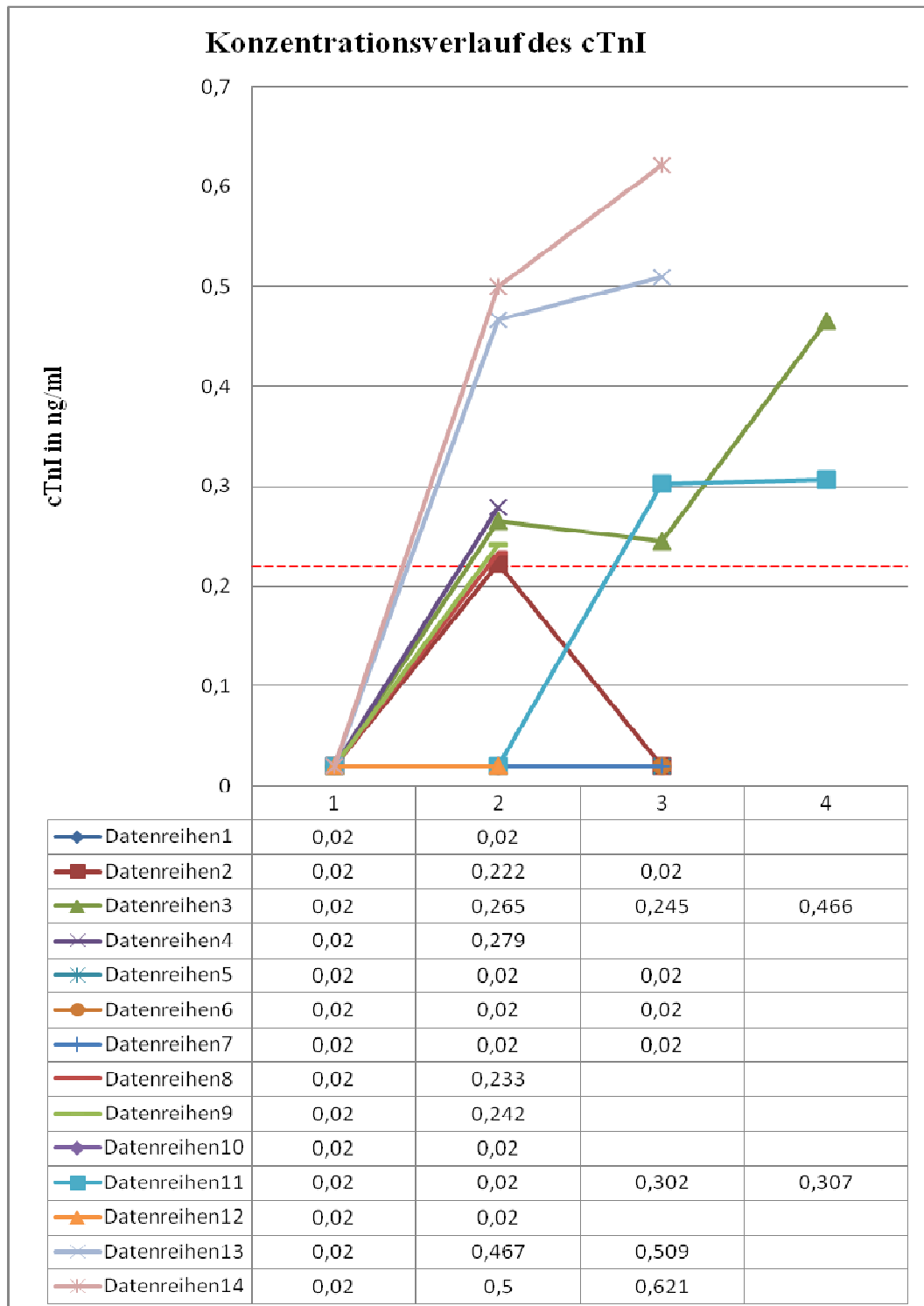


**Abbildung 25:** Graphische Darstellung des kardialen Troponin I-Konzentrationsverlaufs der acht Patienten, die ursprünglich als herzgesund beurteilt wurden, aber eine erhöhte cTnI-Konzentration ( $> 0,22$  Nanogramm pro Milliliter) aufwiesen und die Diagnose Dobermann-Kardiomyopathie anhand der Follow-up-Untersuchungen gestellt werden konnte (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, Datenreihen 1 – 8 = kardiale Troponin I-Konzentrationen der acht Patienten, Untersuchungen: 1 = Ausgangskonzentration des kardialen Troponin I, 2 - 4 = kardiale Troponin I-Konzentration bei den entsprechenden Follow-up-Untersuchungen).

Von den acht Patienten, bei denen anhand der letzten Follow-up-Studie die Diagnose DoCM gestellt wurde, zeigten sieben Hunde cTnI-Konzentration oberhalb des Cut-off-Wertes. Lediglich bei einem Tier, von dem nur eine Follow-up-Untersuchung vorlag, wurde eine Reduktion der cTnI-Konzentration unter 0,22 ng/ml festgestellt. Drei Hunde weisen einen Anstieg der cTnI-Konzentration auf. Dagegen war ein Abfall des cTnI-Spiegels bei zwei Patienten feststellbar. Deutliche Schwankungen im cTnI-Konzentrationsverlauf konnte bei zwei Dobermännern festgestellt werden.

#### **4.2. Herzkrankte Patienten mit niedrigen cTnI-Konzentrationen**

Es wurden eine oder mehrere Follow-up-Untersuchungen bei 14 Dobermännern durchgeführt, bei denen in der vorherigen Studie eine DoCM im okkulten Stadium diagnostiziert wurde, aber deren cTnI-Konzentration unterhalb des Cut-off-Wertes von 0,22 ng/ml lag. In Abbildung 26 ist der Verlauf der cTnI-Konzentrationen dieser 14 an der DoCM erkrankten Patienten graphisch dargestellt. Von diesen zeigten acht Patienten ausschließlich VES, vier Hunde ausschließlich echokardiographische Veränderungen und zwei Dobermänner eine Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen. CTnI-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze wurden erneut mit 0,02 ng/ml angegeben.



**Abbildung 26:** Graphische Darstellung des kardialen Troponin I-Konzentrationsverlaufs der 14 Patienten, bei denen eine Dobermann-Kardiomyopathie diagnostiziert wurde, aber deren kardiale Troponin I-Konzentration unterhalb des Cut-off-Wertes von 0,22 Nanogramm pro Milliliter lag (cTnI = kardiales Troponin I, ng/ml = Nanogramm pro Milliliter, Datenreihen 1 – 14 = kardiale Troponin I-Konzentrationen der 14 Patienten, Untersuchungen: 1 = Ausgangskonzentration des kardialen Troponin I, 2 - 4 = kardiale Troponin I-Konzentration bei den Follow-up-Untersuchungen).

Während der Follow-up-Untersuchungen kam es bei sechs (42,8 %) der 14 erkrankten Dobermänner zu einem kontinuierlichen Anstieg der cTnI-Konzentration über den Cut-off-Wert von 0,22 ng/ml. Dagegen zeigten sechs (42,8 %) Patienten im Verlauf der Follow-up-Untersuchungen weiterhin cTnI-Blutspiegel unterhalb der Nachweisgrenze (0,2 ng/ml) und somit keine messbare Konzentrationszunahme des cTnI. Bei zwei (14,3 %) Tieren konnten Schwankungen innerhalb des cTnI-Konzentrationsverlaufs detektiert werden, wobei einer dieser beiden Patienten während der Follow-up-Untersuchungen permanent cTnI-Konzentrationen > 0,22 ng/ml zeigte.

## V. DISKUSSION

Die Analyse der cTnI-Konzentration gilt derzeit, aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität, sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin als labordiagnostischer Goldstandard für den Nachweis einer myokardialen Zellschädigung (ROBERTS & SOBEL, 1973; GERHARDT et al., 1999; MORROW et al., 2007). Obwohl das cTnI beim Hund einen exzellenten Indikator für eine myokardiale Zellschädigung darstellt und mit dem Schweregrad des Myokardschadens korreliert (GALLEGOS et al., 2004; OYAMA & SISSON, 2004; SPRATT et al., 2005), können bei alleiniger Betrachtung einer erhöhten cTnI-Konzentration keinerlei Aussagen über die zugrundeliegende Ursache getroffen werden, da neben kardialen auch zahlreiche extrakardiale Ursachen mit erhöhten cTnI-Konzentrationen assoziiert sind (WELLS & SLEEPER, 2008; WELLS et al., 2009; SERRA et al., 2010; SNYDER et al., 2010). Unter Anwendung des hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays erwies sich die cTnI-Analyse für die Diagnosestellung der DoCM, als ein hilfreicher Screening-Test zusätzlich zu dem diagnostischen Goldstandard (24-Stunden-EKG und Echokardiographie). Ein bedeutender Fortschritt konnte mit dem hs cTnI-Test hinsichtlich der Früherkennung einer DoCM erzielt werden.

### ***In vitro* Langzeitstabilität des cTnI**

Informationen über die Langzeitstabilität eines Analyten *in vitro* sind insbesondere für Langzeitstudien, in welchen tiefgefrorene Blutproben zum Einsatz kommen, unabkömmlich. Bezüglich der Langzeitstabilität des cTnI existieren derzeit allerdings nur wenige Studien. Nach einer fünftägigen Lagerung bei 4 °C konnten O'BRIEN und Mitarbeiter eine kontinuierliche Konzentrationsabnahme um bis zu 18 % feststellen. Eine niedrigere Lagerungstemperatur von -20 °C war mit einer ca. 6%igen Reduktion der cTnI-Konzentration verbunden. Bei Lagerungstemperaturen von -80 °C für einen Zeitraum von drei Monaten, erwies sich das cTnI dagegen als stabil (O'BRIEN et al., 2006). BROTHAG konnte eine relativ gute Langzeitstabilität über zwei Jahre bei Lagerungstemperaturen von -20 °C nachweisen. Hierbei kam es zu einer durchschnittlichen lagerungsbedingten cTnI-Konzentrationsabnahme von 15 % (BROTHAG, 2003). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der

Langzeitstabilität des cTnI über einen Zeitraum von bis zu 5 Jahren. Hierfür kam der Immulite® 2000 Troponin I-Assay zum Einsatz, der bereits von O'BRIEN und Mitarbeiter für die Anwendung von caninen Blutproben validiert wurde und dessen AK gegen Epitope innerhalb der Core-Region des cTnI gerichtet sind (O'BRIEN et al., 2006). Im Vergleich zu den unmittelbar nach der Blutentnahme gemessenen Proben, resultierte eine Probenlagerung von bis zu fünf Jahren und 77 Tagen bei -80 °C in einer mittleren cTnI-Konzentrationsabnahme um 0,06 ng/ml (13,9 %). Die getrennten Untersuchungen auf Abweichungen der cTnI-Konzentrationen nach drei-, vier- und fünfjähriger Lagerungsdauer bei -80 °C erreichten ebenfalls keine statistische Signifikanz. Eine Lagerung von drei, vier und fünf Jahren war mit einer mittleren Konzentrationsreduktion von 0,05 ng/ml, 0,06 ng/ml und 0,05 ng/ml assoziiert. Da die *in vitro* Stabilität des cTnI zusätzlich von dem für die Analyse eingesetzten Assays abhängig ist (SHI et al., 1999), konnte mit einer durchschnittlichen Konzentrationsabnahme von 13,9 % die Stabilität der Core-Region des cTnI bei einer Lagerungstemperatur von -80 °C über mindestens fünf Jahre nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass die bei dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay verwendeten AK ebenfalls Epitope innerhalb der stabilen Core-Region erkennen, kann bei Anwendung dieses Tests und identischen Lagerungsbedingungen des Probenmaterials, von einer gleichartigen Stabilität des cTnI ausgegangen werden.

#### **ADVIA Centaur® TnI-Ultra**

Bisher kamen in der Tiermedizin vor allem konventionelle cTn-Assays zum Einsatz, die mit einem relativ hohen Detektionslimit assoziiert waren. Aus diesem Grund blieben viele Patienten mit nur milden Formen einer Kardiomyopathie, die mit einem geringen Anstieg der cTnI-Konzentration einhergehen, unerkant. Durch die Entwicklung von hs Tests, die im Vergleich zu den konventionellen Assays eine Messung von bis zu zehnfach niedrigeren cTn-Konzentrationen ermöglichen, sind nun bereits geringgradige Myokardschäden, wie sie in der Frühphase einer kardialen Erkrankung vorkommen, sowohl in der Tier- als auch in der Humanmedizin nachweisbar (LATINI et al., 2007; SCHULTZE et al., 2008; TATE, 2008). In der Humanmedizin war der Einsatz von hs cTnI-Assays mit einem bedeutenden Fortschritt in der Frühdiagnostik des ACS verbunden, da die Identifikationsrate dieser Patienten zum Vorstellungszeitpunkt um 61 % anstieg (MELANSON et al., 2007). Konventionelle Tests erbrachten dagegen



initial ein negatives cTnI-Resultat und ein Anstieg der cTnI-Konzentration konnte erst zu einem späteren Zeitpunkt detektiert werden. Durch die Entwicklung der hs cTnI-Assays können demnach Patienten, die von einem invasiven Management profitieren, frühzeitig identifiziert werden (VENGE et al., 2002; EGGERS et al., 2004; AMODIO et al., 2007; REICHLIN et al., 2009).

In vorliegender Arbeit wurde der ADVIA Centaur® TnI-Ultra, ein relativ neuer hs cTnI-Assay aus der Humanmedizin, für die Anwendung beim Dobermann evaluiert. Nach Herstellerangaben liegt für diesen Assay das Detektionslimit bei 0,006 ng/ml. Als Cut-Off-Wert für die Diagnose eines AMI ergab sich beim Menschen eine cTnI-Konzentration von 0,04 ng/ml (99. Perzentile einer gesunden Referenzpopulation), mit einem Range von 0,02 bis 0,06 ng/ml für die ADVIA Centaur® Systemfamilie, abhängig von dem jeweiligen Probenotyp, dem Gerät sowie der Reagenzcharge. Außerdem wurde die von der ESC/ACC empfohlene Messpräzision von  $\leq 10\%$  am Referenzwert der 99. Perzentile erreicht (Gesamt-VK von 10 % bei 0.03 ng/ml) (SIEMENS, 2008a).

Bis dato kam der ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay lediglich in zwei veröffentlichten Studien beim Hund zum Einsatz. APPLE und Mitarbeiter führten cTn-Analysen bei verschiedenen Spezies unter Anwendung von diversen kommerziell erhältlichen cTn-Immunoassays durch. In dieser Studie konnte anhand von cTnI-Messungen aus Serumproben von Beagle Hunden mittels des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays, eine gute Immunoreaktivität ermittelt werden. Die analytische Impräzision ergab einen VK  $< 20\%$  (APPLE et al., 2008a). In einer kürzlich von Serra und Mitarbeitern durchgeführten Studie wurde ebenfalls die Anwendung von verschiedenen cTn-Assays, inklusive dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra, bei Hunden, Katzen, Pferden, Milchvieh, Ratten und Kaninchen evaluiert. Eine Detektion erhöhter cTnI-Konzentrationen, bedingt durch eine primäre (kardiale Erkrankungen oder Applikation von kardiotoxischen Substanzen) oder sekundäre (extrakardiale Erkrankungen) myokardiale Zellschädigung, konnten mit Hilfe des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays bei allen Spezies nachgewiesen werden. Dagegen wiesen gesunde Hunde, Katzen und Milchkühe cTnI-Konzentrationen  $\leq 0,052$  ng/ml und gesunde Pferde sogar sechsfach niedrigere cTnI-Konzentrationen als die erstgenannten drei Spezies auf (SERRA et al., 2010). Die Resultate der eigenen Untersuchungen ergaben ebenfalls statistisch signifikant höhere cTnI-Konzentrationen bei den an der

DoCM erkrankten Patienten, die unter Anwendung des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays nachgewiesen werden konnten.

Sowohl die Berechnung des VK der Intra- (2,8 %) als auch der Inter-Assay Varianz (5,5 %) ergab einen Wert  $< 10$  %, was mit den Resultaten aus humanmedizinischen Studien übereinstimmt (VAN DE KERKHOF et al., 2008). Damit sind die von der International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine gestellten Anforderungen (VK  $< 10$  %) an die Test-Präzision erfüllt (PANTEGHINI et al., 2001; PANTEGHINI et al., 2004).

Der Hersteller des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays empfiehlt für die cTnI-Analyse die Verwendung von Serum, heparinisierten Plasma- und EDTA-Plasmaproben. Gegenüber der Analyse von Serumproben war die Verwendung von heparinisierten Plasma- und EDTA-Plasmaproben allerdings mit einer Konzentrationsabnahme der cTnI-Resultate um 1 % und 4 % assoziiert (SIEMENS, 2008a). In der Humanmedizin werden für die Analyse der cTn Plasmaproben bevorzugt, da die Anwendung von Serumproben mit längeren Bearbeitungszeiten verbunden sind (PANTEGHINI et al., 1999) und bei nicht sachgemäßem Probenhandling zu falsch hohen cTnI-Resultaten führen kann. Um ein aussagekräftiges cTnI-Ergebnis aus einer Serumprobe zu erhalten, ist vor der Probenzentrifugation eine ausreichend lange Gerinnung des Blutes nötig, um das Serum anschließend vollständig von den festen Blutbestandteilen trennen zu können. Eine ausreichende Probengerinnung stellt vor allem bei Patienten, die eine antikoagulative Therapie erhalten, ein Problem dar. Bleibt eine vollständige Trennung des Serums von den festen Blutbestandteilen aufgrund einer nicht ausreichenden Probengerinnung aus, können sich auch noch nach der Zentrifugation Koagel in der zu analysierenden Probe bilden. Folglich kommt es zur Entstehung von falsch hohen cTnI-Testergebnissen, bedingt durch die Bildung von nicht-spezifischen Bindungen zwischen dem in der Probe enthaltenem Fibrin und den Assay-AK. Des Weiteren kann die Anwesenheit von Fibrin das Messsystem blockieren, weshalb eine erneute Zentrifugation der Probe nötig ist und mit einer zeitlichen Verzögerung bis zum Erhalt eines Testergebnisses assoziiert ist (ROBERTS et al., 1997; NOSANCHUK et al., 1999; ROONGSRITONG et al., 2004). In vorliegender Arbeit wurden die cTnI-Resultate aus gepaarten Serum- und EDTA-Plasmaproben verglichen und auf Konzentrationsabweichungen überprüft. Hierbei konnte eine mittlere Differenz

der gemessenen cTnI-Konzentrationen von 0,03 ng/ml ermittelt werden. Demnach ergaben die cTnI-Analysen aus EDTA-Plasmaproben, im Vergleich zu jenen aus Serumproben, um 14,4 % niedrigere cTnI-Konzentrationen. Ursache für die analytisch niedrigere cTnI-Konzentration stellt das in der Probe enthaltene EDTA dar. EDTA bindet das für die Komplexerhaltung notwendige ionisierte  $\text{Ca}^{2+}$ , weshalb die cTn-Komplexe (cTnT-I-C, cTnI-C) teilweise in freie Untereinheiten gespalten werden (PANTEGHINI et al., 1999). Die analytische Reduktion der cTnI-Konzentration um 14,4 % bei Verwendung von EDTA-Plasmaproben lässt vermuten, dass mit dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay keine gleichwertige Messung der freien Form, im Vergleich zu dem komplexgebundenem cTnI, erfolgt. Für die Bestätigung dieser Hypothese ist allerdings eine ausführliche Testvalidierung unter Verwendung von gereinigten caninen cTnI, sowohl in freier als auch in komplexgebundener Form nötig, die in vorliegender Arbeit aus finanziellen Gründen nicht durchgeführt werden konnte. Obwohl der mittlere Konzentrationsunterschied zwischen den aus Serum- und EDTA-Plasmaproben ermittelten cTnI-Ergebnissen mit 14,4 % keine statistische Signifikanz erreichte, sollte dennoch für jeden Probenotyp, aufgrund dieser heterogenen Kreuzreaktivität der Test-AK gegenüber der verschiedenen cTnI-Formen eigene Cut-off-Werte definiert werden (SIEMENS 2008 ADVIA, PEETZ 2001).

Anhand der gesunden Kontrollgruppe wurde in vorliegender Arbeit außerdem der Einfluss des Lebensalters auf die cTnI-Konzentration geprüft. Sowohl bei gesunden Menschen als auch bei gesunden Hunden stellte sich das Alter bereits als physiologischer Einflussfaktor auf den cTnI-Blutspiegel heraus, wobei ein höheres Alter mit einem Anstieg von diesem assoziiert war (OYAMA & SISSON, 2004; O'BRIEN et al., 2006; CLERICO et al., 2008; SAUNDERS et al., 2009; LJUNGVALL et al., 2010; SERRA et al., 2010; WESS et al., 2010b). Die eigenen Untersuchungen ergaben gleichartige Ergebnisse, wobei ein signifikanter Unterschied in der cTnI-Konzentration zwischen den drei Altersgruppen, jünger als fünf Jahre, zwischen fünf und acht Jahren und älter als acht Jahre, ermittelt werden konnte. Für diesen physiologischen Anstieg der cTnI-Konzentration mit zunehmendem Alter sind vermutlich altersbedingte myokardiale Remodelingprozesse verantwortlich. In verschiedenen Studien, unter anderem am Tiermodell, wurde anhand von histologischen Untersuchungen ein progressiver

Verlust an Kardiomyozyten, bedingt durch myokardiale Nekrose und Apoptose, im alternden Herzen nachgewiesen (KAJSTURA et al., 1996). Durch die Aktivierung verschiedener molekularer Wege wird außerdem eine interstitielle sowie perivaskuläre Fibrose, bei gleichzeitiger Reduktion der Abbaufähigkeit von kollagenem Gewebe, induziert. Des Weiteren stellten sich im höheren Alter die reparativen Antworten auf myokardiale Zellschädigungen als vermindert und fehlerhaft heraus (ROBERTS et al., 1997; BIERNACKA & FRANGOGIANNIS, 2011). Eine weitere Ursache für die hier ermittelte altersbedingte cTnI-Konzentrationszunahme stellt, vor allem bei den älteren Dobermännern, eine mögliche bestehende Erkrankung an der DoCM in einem frühen Stadium (Stadium I) dar, die mittels 24-Stunden-EKG und Echokardiographie zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht identifiziert werden konnte.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung des cTnI als nichtinvasives Diagnostikum für die DoCM, unter Anwendung des hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays. Bei der DoCM handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte und häufig vorkommende Form der DCM, die mit einer langsamen Progression der Erkrankung vergesellschaftet ist (CALVERT et al., 1982; WESS et al., 2010a; MAUSBERG et al., 2011). Im Verlauf der Erkrankung können drei verschiedene Stadien unterschieden werden (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 1997b; PETRIC et al., 2002; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Das asymptomatisch verlaufende Stadium I ist sowohl elektrokardiographisch als auch echokardiographisch durch ein völlig unauffälliges Herz gekennzeichnet. Stadium II verläuft aus Sicht der Besitzer ebenfalls ohne das Auftreten von klinischen Symptomen einer Herzkrankheit, weshalb dieses auch als okkulte Phase bezeichnet wird. Allerdings ist das okkulte Stadium durch morphologische Veränderungen des Myokards und/oder ventrikulären Arrhythmien, überwiegend in Form von VES, charakterisiert. Echokardiographisch liegt initial eine linksventrikuläre systolische Dysfunktion vor, gefolgt von einer sekundär bedingten Volumenüberladung des LV (HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; O'GRADY et al., 2009). In den meisten Fällen stellen VES das erste Krankheitsanzeichen des okkulten Stadiums dar, weshalb das 24-Stunden-EKG derzeit als Diagnostikum der Wahl für die Erkennung der DoCM in einem frühen Stadium gilt (CALVERT et al., 2000a;

CALVERT et al., 2000b; CALVERT & MEURS, 2000; CALVERT & WALL, 2001; WESS et al., 2010a). Erst der weitere Krankheitsverlauf ist mit der Entwicklung einer linksventrikulären systolischen Dysfunktion assoziiert (HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; O'GRADY et al., 2009). 25 - 30 % der Patienten sterben in der okkulten Phase an einem, durch ventrikuläre Arrhythmien verursachten, plötzlichen Herztod (CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b). Das nachfolgende Stadium III ist mit der Entwicklung von klinischen Symptomen aufgrund eines CHF verbunden, in welchen wiederum 50 % an einem plötzlichen Herztod und 50 % der Patienten an den Folgen des CHF versterben (HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; O'GRADY et al., 2009). In einer von WESS und Mitarbeitern durchgeführten Studie konnte bereits anhand eines konventionellen cTnI-Tests (Immulate® 2000 Troponin I) nachgewiesen werden, dass das cTnI bei Dobermännern, die sich im Stadium I der DoCM befinden und somit weder anhand der Elektro- noch mittels der Echokardiographie identifiziert werden können, ein nützlicher diagnostischer Test hinsichtlich der Früherkennung einer DoCM darstellt (WESS et al., 2010b). Die Hypothese dieser Arbeit lautete, dass der Einsatz eines hs cTnI-Assays und der damit verbundenen Fähigkeit sehr geringe cTnI-Konzentrationen in der Zirkulation detektieren zu können, im Vergleich zu einem konventionellen Test, mit einer höheren Identifikationsrate von Patienten mit nur minimalen Myokardschäden auf zellulärer Ebene, wie sie im Frühstadium (Stadium I) der DoCM auftreten, assoziiert ist.

Dobermänner, die anhand des diagnostischen Goldstandards als herzgesund beurteilt wurden, aber innerhalb der folgenden 18 Monate an der DoCM erkrankten und demnach deren letzte unauffällige Untersuchung retrospektiv dem Stadium last normal zugeordnet wurde, wiesen gegenüber den gesunden Kontrolltieren, mit 0,168 ng/ml (versus 0,092 ng/ml) eine statistisch signifikant höhere mittlere cTnI-Konzentration auf. Im Vergleich zu dem diagnostischen Goldstandard, bestehend aus Holter-EKG über 24 Stunden und Echokardiographie, kann folglich mittels der cTnI-Analyse die Diagnose DoCM bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Erkrankung (Stadium I) gestellt werden. Diese Aussage steht im Einklang mit den Untersuchungsergebnissen von WESS und Mitarbeitern (WESS et al., 2010b). Auch in der Humanmedizin waren

geringgradige Myokardschäden mit einem Anstieg der Konzentration des cTnI vergesellschaftet, weshalb das cTnI ein hilfreicher Indikator für den Nachweis von frühen Krankheitsstadien darstellt (SATO et al., 2004). Das weiter fortgeschrittene okkulte Krankheitsstadium (ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen, Kombination aus elektro- und echokardiographischen Abnormalitäten) sowie die dekompensierten Patienten zeigten ebenfalls signifikant höhere mittlere cTnI-Konzentrationen, als die herzgesunden Kontrolltiere. In der Humanmedizin wurde bei Patienten mit chronischem Herzversagen eine Aktivierung des Sympathikus, des Renin-Angiotensin-Systems sowie der Cytokine, als Ursache für myokardiale Zellschädigungen nachgewiesen. Während eine gesteigerte Adrenalin-Konzentration in der Zirkulation mit Myokardnekrosen einhergeht, ist das Angiotensin II, neben Myokardnekrosen, für die Induktion einer kardialen Myozytenapoptose verantwortlich. Zudem wird die Apoptose der Myokardzellen durch den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  verstärkt. Außerdem ist eine durch Volumenüberladung bedingte Dehnung der Myozyten mit deren Nekrose und Apoptose assoziiert. Gegenüber dem kompensierten Stadium steigt die Intensität dieser myokardschädigenden Mechanismen während der Dekompensation an, was mit einer weiteren Zunahme der cTn-Konzentration vergesellschaftet ist (TAN et al., 1991; MANN et al., 1992; KROWN et al., 1996; TEIGER et al., 1996; JESSUP & BROZENA, 2003; MCMURRAY & PFEFFER, 2005). Auch in vorliegender Arbeit stieg die cTnI-Konzentration mit zunehmendem Schweregrad der DoCM an. Dementsprechend wies das dekompensierte Stadium die höchste mittlere cTnI-Konzentration auf und zeigte einen signifikanten Konzentrationsunterschied zu den restlichen Stadien.

Um herzgesunde Dobermänner von an der DoCM erkrankten Patienten differenzieren zu können, wurden mit Hilfe von ROC-Kurven sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität verschiedener Cut-off-Werte untersucht. Der von dem Statistikprogramm als optimal berechneter Cut-off-Wert zur Differenzierung zwischen jeglichen Krankheitsstadien der DoCM und den herzgesunden Dobermännern ergab eine cTnI-Konzentration von  $> 0,151$  ng/ml. Die ermittelte AUC betrug dabei 0,835. Mit diesem Cut-off-Wert konnten mit einer Sensitivität von 70,4 % und einer Spezifität von 89,4 % erkrankte Dobermänner, inklusive jenen des Stadiums last normal, von den herzgesunden

Hunden differenziert werden. Für einen optimalen Screening-Test wird eine 100%ige Sensitivität bei gleichzeitigem Vorliegen einer hohen Spezifität angestrebt, um falsch positive sowie falsch negative Testresultate zu minimieren. Wird ein niedriger Cut-off-Wert gewählt, steigt die Sensitivität bei gleichzeitiger Abnahme der Spezifität, an. Dies hat eine erhöhte Anzahl an falsch positiven Testresultaten zur Folge, was wiederum für den Besitzer mit einer zeitlichen und vor allem finanziellen Belastung, aufgrund von in verkürzten Zeitabständen durchzuführenden Kontrolluntersuchungen, verbunden wäre. Die Wahl eines Cut-off-Wertes in einem höheren cTnI-Konzentrationsbereich geht dagegen mit einer Zunahme der Spezifität auf Kosten der Sensitivität einher, was dementsprechend mit einem Anstieg der falsch negativen Testergebnisse assoziiert ist. Wird ein an der DoCM erkrankter Hund fälschlicherweise als herzgesund beurteilt, kann das einen Zuchteinsatz und die damit verbundene Weitervererbung der Erkrankung sowie dem Ausbleiben einer notwendigen Therapie oder sogar den plötzliche Herztod zur Folge haben. Die Untersuchungen der Sensitivität sowie der Spezifität verschiedener Cut-off-Werte ergaben, dass bei einer cTnI-Konzentration von  $> 0,104$  ng/ml der Verdacht auf eine zugrundeliegende DoCM besteht. Mit diesen Cut-off von  $> 0,104$  ng/ml konnten kranke Dobermänner mit einer Sensitivität von 82,9 % und einer Spezifität von 68,7 % von herzgesunden Hunden differenziert werden. Von den insgesamt 179 gesunden Kontrolltieren wurden dementsprechend 67 % korrekterweise als herzgesund identifiziert. Allerdings liegt die Rate der falsch positiven Resultate mit 33 % relativ hoch. Dagegen war der Anteil der an der DoCM erkrankten Patienten, die fälschlicherweise als herzgesund beurteilt wurden (falsch negativ) mit 17 % gering. Besteht aufgrund einer cTnI-Konzentration von  $> 0,104$  ng/ml der Verdacht auf eine zugrundeliegende DoCM, sollten die Zeitabstände der kardiologischen Kontrolluntersuchungen (24-Stunden-EKG und Echokardiographie) auf sechs, anstelle von 12 Monaten verkürzt werden. Allerdings können auch diverse extrakardiale Ursachen, die mit einer sekundären Myokardschädigung einher gehen, für einen erhöhten cTnI-Serumspiegeln verantwortlich sein (siehe Kapitel II Punkt 2.4.2.1.2.). Aus diesem Grund sind eine ausführliche Anamnese sowie eine gründliche klinische Untersuchung von großer Bedeutung und gegebenenfalls weiterführende Untersuchungen für eine internistische Abklärung der erhöhten cTnI-Konzentration notwendig.

In die aus insgesamt 179 herzgesunden Dobermännern bestehende Kontrollgruppe wurden lediglich 10 Hunde eingeschlossen, die jünger als fünf Jahre waren. Damit sollte das Risiko minimiert werden Dobermänner in die Kontrollgruppe einzuschließen, die in jungen Jahren elektro- sowie echokardiographisch als herzgesund beurteilt werden, aber in einem höheren Alter an der DoCM erkranken, da die Prävalenz der Erkrankung mit zunehmendem Alter ansteigt. Aufgrund des physiologischen cTnI-Konzentrationsanstiegs mit zunehmendem Alter, fällt die hier ermittelte durchschnittliche cTnI-Konzentration der Kontrolltiere mit 0,092 ng/ml für Dobermänner, die das fünfte Lebensjahr noch nicht erreicht haben, mit großer Wahrscheinlichkeit etwas zu hoch aus. Demzufolge wäre die Aufnahme von jüngeren Dobermännern in die gesunde Kontrollgruppe mit einer niedrigeren mittleren cTnI-Konzentration als 0,092 ng/ml assoziiert wodurch sich der Anteil an falsch positiven Testresultaten wahrscheinlich verringert hätte.

Bei alleiniger Betrachtung der cTnI-Konzentration und unter Verwendung des Cut-off-Wertes von  $> 0,104$  ng/ml wurden 27,6 % der Patienten des Stadiums last normal nicht als an der DoCM erkrankt identifiziert. Demzufolge ermöglichte die cTnI-Analyse bei 72,4 % der Dobermänner eine Diagnosestellung bereits in dem frühen Stadium I der DoCM, in welchem noch keine ventrikulären Arrhythmien oder eine systolische Dysfunktion vorliegen und folglich auch nicht mit dem diagnostischen Goldstandard nachzuweisen ist. Auf diesen Ergebnissen basierend stellte sich die Analyse des cTnI insbesondere in der Früherkennung der DoCM als ein äußerst hilfreicher, nichtinvasiver Test heraus, um bestehende Schäden auf zellulärer Myokardebene nachweisen zu können.

Von den insgesamt 36 Dobermännern im dekompenzierten Stadium konnten überraschenderweise nur 35 (97,2 %) Patienten mit dem Cut-off-Wert von 0,104 ng/ml detektiert werden. Abgesehen von einem Hund, der erstaunlicherweise eine cTnI-Konzentration von 0,010 ng/ml aufwies, zeigten die restlichen dekompenzierten Hunde cTnI-Konzentrationen zwischen 0,167 und 2,537 ng/ml (Mittelwert  $0,593 \pm 0,479$  ng/ml). Da bei dem nicht als krank erkannten Dobermann insgesamt fünf Untersuchungen im dekompenzierten Stadium vorlagen, welche mit einem kontinuierlichen Anstieg der cTnI-Konzentration von 0,216 auf letztlich 1,231 ng/ml assoziiert waren, ist die Ursache der niedrigen cTnI-Konzentration von 0,010 ng/ml zum Zeitpunkt der



dritten Untersuchung mit großer Wahrscheinlichkeit analytisch bedingt.

Um das Vorhersagepotential des cTnI für ventrikuläre Arrhythmien und echokardiographischen Veränderungen besser evaluieren zu können, erfolgte eine Erstellung von weiteren ROC-Kurven zur Differenzierung von herzgesunden Kontrolltieren und Dobermännern mit VES (ausschließlich VES und eine Kombination aus VES und echokardiographischen Veränderungen) sowie zur Unterscheidung zwischen herzgesunden Kontrolltieren und Patienten mit echokardiographischen Veränderungen (ausschließlich echokardiographische Abnormalitäten und eine Kombination aus VES und echokardiographischen Veränderungen). Bezüglich der mittleren cTnI-Konzentration der Stadien ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen und einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, wurde eine statistisch signifikant höhere cTnI-Konzentration bei Patienten mit einer Kombination aus VES und Herzultraschallveränderungen, im Vergleich zu jenen, die ausschließlich echokardiographische Abnormalitäten aufwiesen, ermittelt. Kein signifikanter Konzentrationsunterschied konnte dagegen zwischen den Stadien ausschließlich VES und ausschließlich echokardiographischen Veränderungen nachgewiesen werden. Der cTnI-Konzentrationsunterschied von Patienten mit ausschließlich VES und solchen mit einer Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen erreichte ebenfalls keine statistische Signifikanz. Die AUC der ROC-Kurven zur Differenzierung zwischen herzgesunden Hunden und Patienten mit VES sowie zur Unterscheidung zwischen den gesunden Kontrolltieren und Patienten mit Herzultraschallveränderungen erwiesen sich mit 0,862 versus 0,838 als ähnlich. Unter Verwendung des Cut-off-Wertes von  $> 0,104$  ng/ml konnten Patienten mit ventrikulären Arrhythmien von den herzgesunden Hunden, mit einer Sensitivität von 87,7 % und einer Spezifität von 67,0 %, differenziert werden. Unter gleichartigen Bedingungen konnten eine Sensitivität von lediglich 82,6 % und eine etwas höher gelegene Spezifität von 68,7 %, für die Unterscheidung zwischen herzgesunden Dobermännern und Patienten mit echokardiographischen Veränderungen erreicht werden. Demnach wurden von den insgesamt 219 Patienten mit ventrikulären Arrhythmien 12,3 % und von den insgesamt 161 Hunden mit echokardiographischen Veränderungen 16,8 % nicht als an der DoCM erkrankt identifiziert. Da die cTnI-Analyse bei Patienten mit ventrikulären

Arrhythmien, im Vergleich zu jenen mit echokardiographischen Veränderungen, mit einem um 4,5 % geringeren Anteil an falsch negativen Testresultaten assoziiert war und einen höheren Wert der AUC erbrachte (AUC-Differenz = 0,024), scheint das cTnI ein besseres Vorhersagepotential für ventrikuläre Arrhythmien als für echokardiographische Veränderungen aufzuweisen. Demzufolge gehen ventrikuläre Arrhythmien wahrscheinlich mit einem stärkeren Ausmaß an myokardialen Zellschädigungen einher, als echokardiographische Veränderungen. In der Humanmedizin konnten ebenfalls erhöhte cTnI-Serumspiegel bei Patienten mit supraventrikulären oder ventrikulären Arrhythmien nachgewiesen werden. Tachyarrhythmien sind mit einem erhöhten Sauerstoffbedarf bei gleichzeitiger Reduktion des Angebots an Sauerstoff aufgrund der verkürzten Dauer der Diastole verbunden. Dieser Sauerstoffmangel hat eine, durch Hypoxie bedingte, myokardiale Zellschädigung zur Folge (ZELLWEGER et al., 2003). Außerdem konnte bei Menschen mit bestehender systolischer Dysfunktion, aufgrund von subklinischer kardialer Myozytendegeneration während des kompensierten Herzversagens, eine erhöhte cTnI-Konzentration nachgewiesen werden (LA VECCHIA et al., 1997). Ursachen hierfür stellen eine chronische Ischämie, der Verlust der Zellmembranintegrität sowie die Apoptose dar (NARULA et al., 1993; DAVIES et al., 1996). Im Gegensatz zu den in vorliegender Arbeit ermittelten Resultaten, konnten in einer Studie von WESS und Mitarbeitern anhand von cTnI-Analysen beim Dobermann echokardiographische Veränderungen mit einer Sensitivität 86,6 % und VES mit einer Sensitivität von 70,5 % identifiziert werden. Auch die ermittelte AUC der ROC-Kurve ergab für das cTnI ein besseres Vorhersagepotential für Herzultraschallveränderungen, als für ventrikuläre Arrhythmien (WESS et al., 2010b). Eine mögliche Ursache dieser gegensätzlichen Ergebnisse über das Vorhersagepotential des cTnI, könnte die höhere Anzahl an Patienten mit VES sowie mit echokardiographischen Veränderungen in vorliegender Arbeit darstellen. In beiden Studien war das Potential des cTnI für die Detektion von VES (Sensitivität von 87,7 % und 70,5 %) sowie für echokardiographische Veränderungen (Sensitivität 82,6 % und 86,6 %) allerdings mit relativ niedrigen Sensitivitäten verbunden, weshalb der diagnostische Goldstandard (24-Stunden-EKG und Echokardiographie) keinesfalls durch die Analyse des cTnI ersetzt werden kann.

Übereinstimmend mit den Untersuchungsergebnissen von WESS und Mitarbeitern konnte auch in vorliegender Arbeit keine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der cTnI-Konzentration und der Anzahl an VES in 24 Stunden nachgewiesen werden (WESS et al., 2010b). In einer Studie über die ARVC des Boxers korrelierte dagegen die cTnI-Konzentration mit der Anzahl an VES in 24 Stunden (BAUMWART et al., 2007). Allerdings wurde in diese nur eine sehr geringe Anzahl an Patienten eingeschlossen. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist demnach nicht die Anzahl an einzelnen VES für das Ausmaß der cTnI-Konzentration verantwortlich, sondern deren Malignität, wie die Frequenz der VES, das Auftreten von Couplets, Triplets, ventrikulären Tachyarrhythmien oder eines R-auf-T-Phänomens.

Ab einem Cut-off von  $> 0,242$  ng/ml erhärtet sich der Verdacht auf eine bestehende DoCM mit einer Spezifität von 97,2 % und einer Sensitivität von 42,3 % enorm. Unter Verwendung dieser cTnI-Konzentration als Cut-off-Wert lag der Anteil an falsch positiven Ergebnissen lediglich bei 3 %. Allerdings konnten 57 % der erkrankten Patienten nicht als solche identifiziert werden (falsch negativ) und blieben demnach unerkannt.

### **Testvergleich**

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit bestand aus einem analytischen sowie klinischen Vergleich zwischen dem hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay und dem konventionellen Immulite® 2000 Troponin I-Test. Für die cTnI-Analysen anhand des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays kamen EDTA-Plasmaproben zum Einsatz, die bei  $-80$  °C für maximal 5 Jahre und 77 Tage gelagert wurden. Die cTnI-Bestimmung mittels des Immulite® 2000 Troponin I-Tests erfolgte dagegen aus Serumproben, deren Analyse im Probeentnahmezeitraum stattgefunden hat.

Die untere Nachweisgrenze des konventionellen Tests liegt bei 0,20 ng/ml, der Messbereich zwischen 0,20 und 180 ng/ml. Dagegen weist der hs Assay ein Detektionslimit von 0,006 ng/ml und einen Messbereich zwischen 0,006 und 50 ng/ml auf, was mit einer deutlichen Verbesserung der analytischen Sensitivität einhergeht. Bei dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Test handelt es sich um einen Sandwich-Immunoassay, der mit drei verschiedenen AK und direkter CL arbeitet (SIEMENS, 2008a). Das Test-Reagenz enthält einen polyklonalen Ziege-Anti-

TnI-AK (Signal-AK), sowie zwei monoklonale Maus-Anti-TnI-AK (Capture-AK). Die zwei von den monoklonalen Capture-AK erkannten Epitope (AS-Sequenzen 87 – 91 und 41 – 49) sind innerhalb der stabilen Core-Region des humanen cTnI lokalisiert. Der Signal-AK bindet dagegen an die AS 27 - 39. Der Immulite® 2000 Troponin I stellt ein Festphasen enzymmarkierter CL immunometrischer Assay dar, der mit nur zwei verschiedenen AK arbeitet. Die Festphase ist mit einem monoklonalem Maus-Anti-TnI-AK (Capture-AK) beschichtet. Die Flüssigphase enthält einen polyklonalen Ziege-Anti-TnI-AK (Signal-AK) (SIEMENS, 2008b). Beide AK erkennen Epitope des humanen cTnI, die zwischen der AS 33 und 110 und damit ebenfalls in der stabilen Core-Region gelegen sind (SCHARNHORST et al., 2002).

Der analytische Testvergleich ergab für den hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay mit 0,26 ng/ml eine deutlich und statistisch signifikant niedrigere mittlere cTnI-Konzentration, als für den Immulite® 2000 Troponin I-Test ( $p < 0,0001$ ). Die von diesem ermittelte durchschnittliche cTnI-Konzentration erbrachte dagegen mit 0,49 ng/ml einen fast doppelt so hohen Wert. Der Maximalwerte des Immulite® 2000 Troponin I-Test war mit 5,19 ng/ml ebenfalls doppelt so hoch, als der des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays (Maximum 2,537 ng/ml). Die maximalen Werte beider Tests gingen aus ein und derselben Blutprobe hervor. Im Vergleich zu den cTnI-Resultaten des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays, ergaben demnach die Messungen anhand des Immulite® 2000 Troponin I-Tests im Mittel um 0,22 ng/ml (64,5 %) höhere cTnI-Ergebnisse. Des Weiteren wurde eine Zunahme der Differenzen bei ansteigenden cTnI-Konzentrationen nachgewiesen.

Derzeit sind multiple cTnI-Assays von verschiedenen Fabrikanten auf dem Markt erhältlich, deren Testresultate im Vergleich eine bis zu 20 fache Abweichung der cTnI-Konzentrationen ergeben (APPLE, 1999). Die für diese Konzentrationsvariationen verantwortlichen Faktoren sind nicht völlig geklärt (SHI et al., 1999). Vermutlich spielt die Heterogenität der in den verschiedenen Tests verwendeten AK eine bedeutende Rolle, da sich diese hinsichtlich der Erkennung von cTnI-Isoformen unterscheiden (WU et al., 1998). Da sich das cTnI bei Lagerungstemperaturen von  $-80\text{ °C}$  über mindestens fünf Jahre als stabil erwiesen hat, kann eine lagerungsbedingte Abnahme der cTnI-Konzentration in jenen Proben, die anhand des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays analysiert

wurden, als Ursache für die 64,5%ige Diskrepanz weitgehend ausgeschlossen werden. Allerdings hat die Verwendung von zwei verschiedenen Probentypen (Serum und EDTA-Plasma) mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Verstärkung der Konzentrationsdifferenz zwischen den beiden cTnI-Assays beigetragen, da (wie bereits oben erläutert) die Anwesenheit von EDTA mit einer analytischen Reduktion der cTnI-Konzentrationen assoziiert ist (PANTEGHINI et al., 1999). Jedoch lässt sich die derartig hohe Abweichung der cTnI-Konzentration nicht allein durch die Anwendung von EDTA-Plasmaproben für den ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay erklären.

Für den klinischen Testvergleich zwischen dem hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay und dem konventionellen Immulite® 2000 Troponin I-Test wurden insgesamt 507 gepaarte Proben, von 174 herzgesunden Dobermännern und 333 Untersuchungen von an der DoCM erkrankten Patienten, herangezogen. Für die Differenzierung zwischen herzgesunden und kranken Dobermännern anhand der cTnI-Resultate des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays wurde der in vorliegender Arbeit ermittelte Cut-off-Wert von  $> 0,104$  ng/ml herangezogen.

Der konventionelle Immulite® 2000 Troponin I-Test kam bereits in einer Studie von WESS und Mitarbeitern zum Einsatz, in der das cTnI bei der DoCM evaluiert wurde. Mit einem Cut-off-Wert von 0,22 ng/ml konnten in dieser mit einer Sensitivität von 78,9 % und einer Spezifität von 87,3 % alle Krankheitsstadien der DoCM (last normal, ausschließlich VES, ausschließlich echokardiographische Veränderungen, Kombination aus elektro- und echokardiographischen Veränderungen, dekompensiert) von den herzgesunden Kontrolltieren differenziert werden (WESS et al., 2010b).

Der klinische Testvergleich erfolgte mit Hilfe von ROC-Kurven, die für beide cTnI-Assays erstellt wurden sowie der jeweiligen AUC. Unter Anwendung der oben genannten Cut-off-Werte wurde für den ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay eine Sensitivität von 83,2 % und eine Spezifität von 68,4 % ermittelt. Dagegen konnten mit dem Immulite® 2000 Troponin I-Test die an der DoCM erkrankten Patienten mit einer Sensitivität von 80,2 % und einer Spezifität von 73,0 % von den herzgesunden Patienten differenziert werden. Die niedriger gelegene Spezifität von 68,4 % des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays war, im Vergleich zu der des Immulite® 2000 Troponin I-Tests (Spezifität 73,0 %), mit einem um 5,7 % höheren Anteil an falsch positiven Resultaten (33,3 % versus 27,6 %)

verbunden. Durch die Anwendung des Immulite® 2000 Troponin I-Tests wurden 19,5 % der Patienten, die an der DoCM erkrankt waren, fälschlicherweise als herzgesund beurteilt. Dagegen lag die Rate der falsch negativen Testergebnisse des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays bei nur 16,5 %. Gegenüber dem Immulite® 2000 Troponin I-Test konnten demnach mit dem ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay 3 % mehr der Patienten korrekterweise als krank identifiziert werden. Bezüglich des Stadiums last normal wurden anhand des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays 71,4 % und mittels des Immulite® 2000 Troponin I-Tests lediglich 64,3 % der Hunde in diesem frühen Stadium der DoCM identifiziert. Demnach stieg unter Anwendung des hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays die Identifikationsrate der Dobermänner des Stadiums last normal um 7,1 % an. Des Weiteren ergab die AUC, die ein Maß für die Güte eines diagnostischen Tests darstellt, einen signifikant höheren Wert für den hs ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay als für den konventionellen Test.

Diesen Ergebnissen zufolge ist die Verwendung des hs cTnI-Assays, im Vergleich zu dem konventionellen Test, mit dem bedeutendem Vorteil verbunden, dass ein größerer Anteil an Patienten im frühen Stadium I der DoCM identifiziert werden kann. Durch das erheblich niedriger gelegene Detektionslimit des hs cTnI-Assays können nun auch sehr geringe cTnI-Konzentrationszunahmen nachgewiesen werden, die aufgrund von minimalen Myokardschädigungen entstanden sind. Da das Vorhandensein des myokardialen Zellschadens zu diesem frühen Zeitpunkt der DoCM noch nicht mit dem Auftreten von ventrikulären Arrhythmien oder echokardiographischen Veränderungen verbunden ist und demnach auch nicht mittels Holter-EKG oder Herzultraschall nachgewiesen werden kann, stellen kardiale Biomarker derzeit das einzige nichtinvasive Diagnostikum für das Stadium I der DoCM dar. Aus diesem Grund kann die geringe Zunahme der falsch positiven Testresultate um 5,7 %, die durch die Anwendung des niedrigen Cut-off-Wertes von 0,104 ng/ml bedingt ist, in Kauf genommen werden. Eine frühzeitige Diagnose der DoCM ist aus verschiedenen Gründen von großer Bedeutung. Zum einen ist der Zuchtausschluss von herzkranken Dobermännern von besonderer Wichtigkeit, da die DoCM mit einem autosomal dominanten Erbgang einhergeht. Für die Zucht werden häufig junge Tiere eingesetzt, die zwar Träger des Gendefekts sind, aber die DoCM zum Zeitpunkt des Zuchteinsatzes anhand des diagnostischen Goldstandards noch nicht nachgewiesen werden kann.

Die Verwendung eines hs cTnI-Assays ist zwar mit dem Vorteil verbunden einen größeren Anteil an Dobermännern mit einer erhöhten cTnI-Konzentration identifizieren zu können, allerdings kann aufgrund der langsamen Progression der Erkrankung eine lange Zeit vergehen bis es zur nachweisbaren Entwicklung von elektro- und oder echokardiographischen Veränderungen im Sinne einer DoCM kommt. Erfahrungsgemäß werden die Hunde trotz der erhöhten cTnI-Konzentration, die das erste Anzeichen für eine bestehende DoCM im Stadium I (Myokardschaden ausschließlich auf zellulärer Ebene) sein kann, für die Zucht eingesetzt. Ein Rückgang der derzeit sehr hohen Krankheitsprävalenz von 58,2 % kann nur durch die Entwicklung eines Gentests erzielt werden, mit welchem Dobermännern mit bestehendem Gendefekt vor Zuchteinsatz detektiert werden können. Außerdem ist eine frühzeitige Diagnose der DoCM von großer Bedeutung, um mit einer medikamentellen Therapie der ventrikulären Arrhythmien und/oder der systolischen Dysfunktion beginnen zu können sowie prognostische Aussagen treffen zu können.

Ein weiterer Vorteil der cTnI-Analyse stellt die leichte Durchführbarkeit sowie der geringe finanzielle Aufwand für die in der Praxis tätigen Tierärzte dar, welche nicht die Möglichkeit einer weiterführenden kardiologischen Abklärung mittels Echokardiographie und 24-Stunden-EKG aufweisen. Für diese sollte der Nachweis einer erhöhten cTnI-Konzentration mit einer Überweisung zu einem Spezialisten, der das notwendige Equipment sowie die ausreichende Erfahrung besitzt, verbunden sein.

### **Follow-up-Studie**

Des Weiteren wurde in vorliegender Arbeit eine Follow-up-Studie durchgeführt. In einer vorherigen Studie von WESS und Mitarbeitern wurde das cTnI als Screening-Test für die DoCM bereits klinisch evaluiert. Hierbei kam der konventionelle Immulite® 2000 Troponin I-Assay zum Einsatz, dessen untere Nachweisgrenze bei 0,2 ng/ml liegt. Unter Anwendung des ermittelten Cut-off-Wertes von 0,22 ng/ml konnten, mit einer Sensitivität von 78,9 % und einer Spezifität von 87,3 %, herzgesunde Hunde von jenen, die an der DoCM erkrankt waren inklusive des Stadiums last normal, differenziert werden (WESS et al., 2010b). Hierbei fielen zum einen 35 Dobermännern auf, die mittels des diagnostischen Goldstandards (24-Stunden-EKG und Echokardiographie) als herzgesund beurteilt wurden, aber eine cTnI-Konzentration > 0,22 ng/ml

aufwiesen und zum anderen 14 Patienten, die an der DoCM erkrankt waren, aber eine cTnI-Konzentration  $< 0,22$  ng/ml zeigten. Im Rahmen der Follow-up-Studie wurden diese 49 Patienten einer oder mehreren Nachuntersuchungen unterzogen, um deren Outcome eruieren zu können.

Bei 22,9 % der 35 Dobermänner, die in oben genannter Studie als herzgesund beurteilt wurden, aber eine erhöhte cTnI-Konzentration aufwiesen, konnte anhand der Follow-up-Untersuchungen eine Erkrankung an der DoCM zu einem späteren Zeitpunkt nachgewiesen werden. Demnach war bei diesen Patienten das cTnI in der Zirkulation korrekterweise aufgrund einer DoCM im Stadium I erhöht. Da in diesem frühen Stadium lediglich ein Myokardschaden auf zellulärer Ebene vorliegt, der noch nicht mit dem Auftreten von ventrikulären Arrhythmien oder einer systolischen Dysfunktion vergesellschaftet ist und somit auch nicht mittels dem diagnostischen Goldstandard nachgewiesen werden kann, erwies sich das cTnI erneut als ein hilfreicher diagnostischer Test im Hinblick auf die Früherkennung einer DoCM. Lediglich einer dieser acht Patienten zeigte bei der Follow-up-Untersuchung eine cTnI-Konzentration unterhalb des Cut-off-Wertes. Da diese unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten cTnI-Tests lag und deshalb die exakte cTnI-Konzentration nicht bekannt war, besteht dennoch die Möglichkeit, dass mit Hilfe eines hs Assays und dem damit verbundenen niedrigeren Cut-off-Wert auch bei diesem Patienten eine pathologisch hohe cTnI-Konzentration hätte ermittelt werden können. Die übrigen sieben an der DoCM erkrankten Patienten zeigten dagegen konstant erhöhte cTnI-Konzentrationen  $> 0,22$  ng/ml. Bei 71,4 % der 35 Dobermänner, die ursprünglich als herzgesund beurteilt wurden, konnten auch im Rahmen der Follow-up-Untersuchungen keine elektro- oder echokardiographische Hinweise auf eine bestehende DoCM nachgewiesen werden. Von diesen 25 Patienten wiesen 15 Dobermänner weiterhin cTnI-Konzentrationen  $> 0,22$  ng/ml auf. Da die DoCM bekanntlich mit einer langsamen Progression assoziiert ist und eine Diagnose des okkulten Stadiums deshalb häufig erst in einem fortgeschrittenen Lebensalter gestellt wird (WESS et al., 2010a), kann eine mögliche bestehende Erkrankung an der DoCM im frühen Stadium I bei diesen Patienten trotzdem nicht ausgeschlossen werden. Allerdings existieren neben kardialen auch multiple extrakardiale Ursachen, die mit einem Anstieg des cTnI-Blutspiegels vergesellschaftet sind. Hierzu zählen unter anderem einige Infektionskrankheiten, verschiedene Toxine



beziehungsweise Medikamente, ein kardiales Trauma, Magendilatation beziehungsweise –volvulus, pulmonale Krankheiten, Pyometra, Epilepsie, Steroidresponsive Meningitis-Arteritis, Pankreatitis, Nierenversagen, Neoplasien, unkontrollierter Hyper- sowie Hypoadrenokortizismus, Anämie, Hypoxie, Hitzschlag sowie hochgradige Anstrengung (WELLS & SLEEPER, 2008; WELLS et al., 2009; SERRA et al., 2010; SNYDER et al., 2010). Im Zeitraum der Follow-up-Studie konnte bei vier der 15 herzgesunden Dobermännern, die weiterhin erhöhte cTnI-Konzentrationen aufwiesen, an der medizinischen Kleintierklinik der LMU München folgende mögliche extrakardiale Ursachen für den erhöhten cTnI-Blutspiegel diagnostiziert werden: Kupferspeicherkrankheit mit folglich chronischer Hepatitis, chronische Niereninsuffizienz, vergrößerte Prostata sowie ein Fibrosarkom. Ein weiterer Patient zeigte respiratorische Symptome, multiple kutane Umfangsvermehrungen sowie eine erhöhte Aktivität der Leberenzyme, wobei eine weitere internistische Abklärung der erhobenen Befunde von den Besitzern nicht gewünscht wurde. Vorberichtlich wiesen drei Hunde eine diagnostizierte Hypothyreose und ein weiterer Hund ein Mammakarzinom mit Verdacht auf Lungenmetastasen auf. Bei den restlichen sechs Hunden erwiesen sich der Vorbericht sowie die klinische Untersuchung als unauffällig. Demzufolge wiesen neun (60 %) der 15 herzgesunden Patienten mit weiterhin erhöhten cTnI-Konzentrationen, verschiedene systemische Erkrankung auf, die möglicherweise für den Anstieg der cTnI-Konzentration verantwortlich sein könnten. Dagegen lagen bei den restlichen sechs (40 %) Dobermännern keine Hinweise auf einen extrakardial bedingten Anstieg der cTnI-Konzentration vor. Außerdem waren bei einigen der weiterhin als herzgesund beurteilten Tiere deutliche Schwankungen der cTnI-Konzentration zu vernehmen. Diese könnten möglicherweise durch variable Intensitäten einer extrakardialen Erkrankung, die mit einem Anstieg der cTnI-Konzentration assoziiert ist, bedingt sein. Eine weitere Erklärung für die beobachteten Schwankungen innerhalb des cTnI-Konzentrationsverlaufs stellen mögliche wöchentliche Variabilitäten der cTnI-Konzentration dar, wie sie bereits in einer Studie für den kardialen Biomarker NT-proBNP bei ebenfalls herzgesunden Hunden nachgewiesen werden konnten (KELLIHAN et al., 2009). Ob derartige wöchentliche Variabilitäten auch für das cTnI existieren muss allerdings durch zukünftige Studien untersucht werden. Bei 40 % der 25 Dobermänner, die auch im Rahmen der Follow-up-Untersuchungen weiterhin als herzgesund eingestuft wurden, kam es zu einem Abfall der cTnI-

Konzentration unterhalb des Cut-off-Wertes. Drei dieser Patienten zeigten zum Zeitpunkt der initial erhöhten cTnI-Konzentration Symptome einer systemischen Erkrankung (Hämaturie aufgrund von Blasensteinen, Vomitus und Leistungsinsuffizienz), welche während der Follow-up-Untersuchung nicht mehr bestanden und mit großer Wahrscheinlichkeit für den initialen cTnI-Konzentrationsanstieg verantwortlich waren. Obwohl bei den übrigen sieben Hunden der Vorbericht sowie die klinische Untersuchung keine Auffälligkeiten zeigten, kann ein vorübergehender extrakardial bedingter Anstieg der cTnI-Konzentration nicht sicher ausgeschlossen werden. Aber auch bei diesen Patienten könnten mögliche wöchentliche cTnI-Konzentrationschwankungen für die initial hohen cTnI-Werte verantwortlich sein.

Von den Dobermännern, bei denen in der vorherigen Studie eine DoCM diagnostiziert wurde, zeigten lediglich 14 Patienten cTnI-Konzentrationen unterhalb des Cut-off-Wertes von 0,22 ng/ml. Die Anzahl dieser Follow-up-Gruppe verdeutlicht zum einen, dass eine Erkrankung an der DoCM nur in seltenen Fällen nicht mit einem Anstieg der cTnI-Konzentration verbunden ist und zum anderen, dass weder die Echokardiographie noch das 24-Stunden-EKG durch die Analyse des cTnI ersetzt werden können. Bei sechs (42,8 %) dieser erkrankten Patienten wurde während der durchgeführten Follow-up-Untersuchungen ein kontinuierlicher Anstieg der cTnI-Konzentration  $> 0,22$  ng/ml detektiert. Hierbei war der Konzentrationsanstieg bei allen Hunden, trotz der Applikation einer kardialen Therapie, mit einer deutlichen Progression der Erkrankung vergesellschaftet. Dieses Resultat stimmt mit jenen aus anderen Studien überein, die eine Korrelation zwischen dem Ausmaß des cTnI-Konzentrationsanstiegs und dem Schweregrad der Herzerkrankung nachweisen konnten (DEFRANCESCO et al., 2002; OYAMA & SISSON, 2004; TARDUCCI et al., 2004; SPRATT et al., 2005). Dagegen zeigten sechs Patienten auch im Verlauf der Follow-up-Untersuchungen weiterhin niedrige cTnI-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von 0,20 ng/ml und somit keine messbare Konzentrationszunahme des cTnI. Zwei dieser Hunde wiesen geringgradige echokardiographische Abnormalitäten auf, wobei keine Progression der systolischen Funktion unter der Therapie mit Pimobendan, einem Inodilatator, festzustellen war, was eine mögliche Erklärung für den fehlenden Anstieg der cTnI-Konzentration darstellen könnte. Obwohl keine Korrelation zwischen der

cTnI-Konzentration und der Anzahl an VES in 24 Stunden nachgewiesen werden konnte, reduzierte sich unter antiarrhythmischer Therapie bei drei dieser sechs Hunde die Anzahl der VES deutlich. Bei zwei weiteren unter antiarrhythmischer Therapie stehenden Tieren stieg die Anzahl der VES dagegen an. Da Antiarrhythmika neben der Anzahl auch die Malignität von ventrikulären Arrhythmien reduzieren, kann eine Verminderung der Malignität für die weiterhin niedrigen cTnI-Konzentrationen verantwortlich sein. Bei zwei Hunden konnte die Wirksamkeit der kardialen Therapie anhand der cTnI-Konzentrationsschwankungen verdeutlicht werden. Bei diesen Dobermännern war die Verbesserung der systolischen Dysfunktion unter Pimobendan mit einer Reduktion der cTnI-Konzentration verbunden. Bei der nachfolgenden Follow-up-Untersuchung kam es bei einem dieser beiden Hunde allerdings zur Zunahme der ventrikulären Arrhythmien, was wiederum mit einem Anstieg der cTnI-Konzentration assoziiert war. Ob die Analyse des cTnI allerdings eine Kontrolle der Wirksamkeit einer kardialen Therapie zulässt, muss anhand von weiteren Studien verifiziert werden.

Die Ergebnisse der Follow-up-Studie verdeutlichen, dass eine erhöhte cTnI-Konzentration auf eine DoCM im frühen Stadium hinweisend sein kann und aus diesem Grund regelmäßige kardiologische Kontrolluntersuchungen mittels Elektro- und Echokardiographie in kürzeren Zeitabständen von sechs statt 12 Monaten empfohlen werden. Außerdem sollten eine ausführliche Erhebung des Vorberichts, eine gründliche klinische Untersuchung und gegebenenfalls eine weitere Abklärung von einem möglichen extrakardial bedingten cTnI-Konzentrationsanstieg stattfinden. Wird eine erhöhte cTnI-Konzentration ohne Hinweise auf das Vorliegen einer extrakardialen Erkrankungen nachgewiesen, erhärtet sich der Verdacht auf eine bestehende DoCM in einem frühen Krankheitsstadium. Allerdings ist ein pathologischer Anstieg dieser, wie bereits erläutert, nur hinweisend auf eine mögliche bestehende DoCM, aber nicht beweisend, da in seltenen Fällen auch Dobermänner, die definitiv an der DoCM erkrankt sind, cTnI-Konzentrationen unterhalb des Cut-off-Wertes aufweisen können.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die autosomal dominant vererbte dilatative Kardiomyopathie des Dobermanns ist durch eine langsame Progression der Erkrankung gekennzeichnet, beginnend mit einem myokardialen Schaden auf zellulärer Ebene, der anhand des derzeitigen diagnostischen Goldstandards (24-Stunden-EKG und Echokardiographie) nicht nachgewiesen werden kann. Für die Diagnosestellung dieses frühen Stadiums erwies sich das kardiale Troponin I als ein hilfreicher zusätzlicher Screening-Test. Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Untersuchung der *in vitro* Stabilität des kardialen Troponin I sowie die analytische und klinische Evaluierung eines neuen hochsensitiven kardialen Troponin I-Assays als Screening-Test für die dilatative Kardiomyopathie des Dobermanns. Des Weiteren wurde der hochsensitive Assay sowohl analytisch als auch klinisch mit einem konventionellen Test verglichen. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand aus der Durchführung einer Follow-up-Studie, in der zum einen herzgesunde Dobermänner mit erhöhten cTnI-Konzentrationen und zum anderen Patienten, die an der DoCM erkrankt waren, aber einen niedrigen cTnI-Serumspiegel zeigten, nachuntersucht wurden. Anhand gepaarter Serumproben von 32 Dobermännern konnte die Stabilität des kardialen Troponin I bei Lagerungstemperaturen von -80 Grad Celsius über fünf Jahre und 77 Tage nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Test-Präzision des ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assays ergab für die Anwendung von caninen Blutproben eine mittlere Intra-Assay Varianz von 2,8 % sowie eine Inter-Assay Varianz von 5,5 %, womit die international gestellte Anforderung an die Präzision eines Assays (Variationskoeffizienten < 10 %) erfüllt ist. Da die Troponin I-Analysen aus EDTA-Plasmaproben, im Gegensatz zu Serumproben, um 14,4 % niedrigere Testresultate erbrachten, sollte ein Vergleich der aus diesen Probenstypen stammenden Ergebnisse vermieden werden. Des Weiteren konnte ein signifikanter Anstieg der Troponin I-Konzentration mit zunehmendem Lebensalter nachgewiesen werden. Die klinische Evaluierung des hochsensitiven Tests erfolgte an 179 herzgesunden und 345 Untersuchungsergebnissen von erkrankten Dobermännern, die in die Krankheitsstadien „last normal“, okkult und dekompensiert eingeteilt wurden. Dem Stadium „last normal“ wurde die letzte elektro- und echokardiographisch unauffällige Untersuchung von Dobermännern retrospektiv zugeordnet, die initial als herzgesund beurteilt wurden, aber im

Rahmen einer Folgeuntersuchung innerhalb von 18 Monaten ventrikuläre Arrhythmien und/oder eine systolische Dysfunktion entwickelt haben. Gegenüber den herzgesunden Hunden zeigten Patienten der verschiedenen Krankheitsstadien eine signifikant höhere mittlere Troponin I-Konzentration. Bei einer Troponin I-Konzentration von  $> 0,104$  ng/ml besteht der Verdacht auf das Vorliegen einer Dobermann-Kardiomyopathie (Sensitivität 82,9 %, Spezifität 68,7 %). Die Verwendung dieses niedrigen Cut-off-Wertes war zwar mit einem relativ hohen Anteil an falsch positiven Testresultaten (33 %) assoziiert, allerdings blieben nur 17 % der kranken Dobermänner unerkannt. Bezüglich des Stadiums „last normal“, welches mit dem diagnostischen Goldstandard zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht nachgewiesen werden konnte, wurden 72,4 % der Patienten korrekterweise als krank detektiert. Dieses Resultat verdeutlicht, dass die cTnI-Analyse vor allem im Hinblick auf die Früherkennung der Erkrankung im Stadium I gegenüber dem diagnostischen Goldstandard überlegen ist. Ab einer Troponin I-Konzentration von  $> 0,242$  ng/ml ist das Vorliegen einer Dobermann-Kardiomyopathie dagegen sehr wahrscheinlich (Sensitivität 42,3 %, Spezifität 97,2 %). Im Vergleich zu echokardiographischen Veränderungen erwies sich das Vorhersagepotential des kardialen Troponin I für ventrikuläre Arrhythmien als geringfügig besser. Trotzdem kann die Troponin I-Analyse das 24-Stunden-EKG sowie die Echokardiographie aufgrund der niedrigen Spezifität nicht ersetzen. Gegenüber des konventionellen Tests konnte durch die Anwendung des hochsensitiven Assays die Identifikationsrate der Patienten des Stadiums „last normal“ um 7,1 % gesteigert werden, was einen bedeutenden Fortschritt im Hinblick auf die frühzeitige Erkennung der Dobermann-Kardiomyopathie im Stadium I darstellt. Anhand der Follow-up-Studie konnte gezeigt werden, dass insgesamt nur wenige Patienten, die an der Dobermann-Kardiomyopathie erkrankt waren, kardiale Troponin I-Konzentrationen unterhalb des Cut-off-Wertes aufwiesen. Das Auftreten einer erhöhten kardialen Troponin I-Konzentration bei elektro- und echokardiographisch herzgesunden Dobermännern kann auf eine Erkrankung in dem frühen Stadium I hinweisend sein. Aus diesem Grund werden regelmäßige kardiologische Kontrolluntersuchungen in kürzeren Zeitabständen von sechs Monaten empfohlen. Allerdings existieren verschiedene extrakardiale Erkrankungen, die zu einem Anstieg der kardialen Troponin I-Konzentration führen können, weshalb ein ausführlicher Vorbericht, eine gründliche klinische Untersuchung und gegebenenfalls weiterführende Diagnostik unerlässlich sind.

## VII. SUMMARY

Dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers is an autosomal dominant inherited disease that is characterized by a slow disease progression. This cardiomyopathy starts with a myocardial damage on a cellular level that cannot be detected by the current diagnostic gold standard (24-hour-ECG and echocardiography). Cardiac troponin I measurements turned out to be a valuable additional screening test for the diagnosis of this early stage.

The aims of this study were first to examine the *in vitro* stability of the cardiac troponin I and second to evaluate a new ultrasensitive cardiac troponin I-assay analytically and clinically as a screening test for dilated cardiomyopathy in Doberman pinschers. Furthermore, the new ultrasensitive assay was analytically and clinically compared to a conventional cardiac troponin I-test. A further aspect was a follow-up-study. Therefore, dogs that were judged to be healthy according to the gold standard examinations, but which had elevated cardiac troponin I levels, were reexamined. Additionally, patients which were diagnosed with dilated cardiomyopathy, but had low cardiac troponin I-concentrations, were rechecked in the follow-up-study.

The present study shows that cardiac troponin I is stable for at least five years at storage temperatures of -80 degrees Celsius on the basis of paired serum samples of 32 Doberman Pinschers. The investigation of the test-precision of the ADVIA Centaur® TnI-Ultra-Assay using canine blood samples carried out a mean intra-assay variance of 2.8 % and an inter-assay variance of 5.5 %. Consequently, the international demands for test-precision (coefficient of variation < 10 %) are met. Troponin I-analyses of EDTA-plasma samples showed 14.4 % lower test results, compared to serum samples. Therefore, a comparison between the results from these types of blood samples should be avoided.

A significant increase in troponin I-concentration was detected with increased age of the dogs. The clinical evaluation of the highly sensitive troponin I-test was performed on the basis of examination results from 179 healthy and 345 Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy, which were divided in the disease stages “last normal”, occult, and decompensated. The last electro- and echocardiographically unremarkable examination of Doberman Pinschers, which

were initially considered to be healthy, was assigned to the group “last normal” retrospectively, if they developed ventricular premature contractions and/or a systolic dysfunction in the context of a follow-up-examination within the next 18 months. The mean troponin I-concentration in all disease stages was significantly higher, compared to the control group. Using a troponin I-concentration cut-off-value of  $> 0.104$  ng/mL, the presence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers is suspected (sensitivity 82.9 %, specificity 68.7 %). The application of this low cut-off-value was associated with a comparatively high proportion of false positive test results (33 %), but just 17 % of the Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy were not detected. With respect to the group “last normal”, which cannot be identified using the diagnostic gold standard at the time of investigation, 72.4 % of diseased patients were accurately recognized as affected by dilated cardiomyopathy. This result illustrates that troponin I-analyses outmatch the diagnostic gold standard, particularly with regard to the early detection of stage I of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. Using a higher troponin I cut-off-value of  $> 0.242$  ng/mL, the presence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers is quite likely (sensitivity 42.3 %, specificity 97.2 %). The potential of cardiac troponin I proved to be slightly better to predict ventricular premature contractions, compared to its ability to detect echocardiographic abnormalities. Nevertheless, troponin I-analyses cannot replace 24-hour-ECG and echocardiography because of the low specificity. Using the new highly sensitive assay, the identification rate of patients of the group “last normal” was increased by 7.1 %, compared to the conventional troponin I-test. This is an important improvement with regards to the early detection of stage I of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. The follow-up-study showed that only a few Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy had a cardiac troponin I-concentration in their follow-up-examination below the cut-off-value. An increased cardiac troponin I-concentration in dogs without electro- and echocardiographic abnormalities suggesting dilated cardiomyopathy could indicate the stage I of the disease. For this reason regular cardiac follow-up-examinations in shorter intervals than six months are recommended if troponin I-concentration is increased. However, there are multiple extracardiac diseases which can potentially cause an increase in cardiac troponin I-concentration. Therefore, a detailed history, a close clinical examination and further diagnostics if indicated are necessary to exclude extracardiac diseases.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Adams J, 3rd. Impact of troponins on the evaluation and treatment of patients with acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol* 1999; 14: 310-3.

Adams JE, 3rd, Schechtman KB, Landt Y, Ladenson JH, Jaffe AS. Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I. *Clin Chem* 1994; 40: 1291-5.

Adin DB, Milner RJ, Berger KD, Engel C, Salute M. Cardiac troponin I concentrations in normal dogs and cats using a bedside analyzer. *J Vet Cardiol* 2005; 7: 27-32.

Adin DB, Oyama MA, Sleeper MM, Milner RJ. Comparison of canine cardiac troponin I concentrations as determined by 3 analyzers. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 1136-42.

Alehan D, Ayabakan C, Celiker A. Cardiac troponin T and myocardial injury during routine cardiac catheterisation in children. *Int J Cardiol* 2003; 87: 223-30.

Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 959-69.

Ammann P, Maggiorini M, Bertel O, Haenseler E, Joller-Jemelka HI, Oechslin E, Minder EI, Rickli H, Fehr T. Troponin as a risk factor for mortality in critically ill patients without acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2004-9.

Amodio G, Antonelli G, Varraso L, Ruggieri V, Di Serio F. Clinical impact of the troponin 99th percentile cut-off and clinical utility of myoglobin measurement in the early management of chest pain patients admitted to the Emergency Cardiology Department. *Coron Artery Dis* 2007; 18: 181-6.



Anand I, McMurray JJ, Whitmore J, Warren M, Pham A, McCamish MA, Burton PB. Anemia and its relationship to clinical outcome in heart failure. *Circulation* 2004; 110: 149-54.

Anderson PA, Greig A, Mark TM, Malouf NN, Oakeley AE, Ungerleider RM, Allen PD, Kay BK. Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. *Circ Res* 1995; 76: 681-6.

Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M, McCabe CH, Cannon CP, Fischer GA, Fung AY, Thompson C, Wybenga D, Braunwald E. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1996; 335: 1342-9.

Apple FS. Clinical and analytical standardization issues confronting cardiac troponin I. *Clin Chem* 1999; 45: 18-20.

Apple FS, Murakami MM. Cardiac troponin and creatine kinase MB monitoring during in-hospital myocardial reinfarction. *Clin Chem* 2005; 51: 460-3.

Apple FS, Murakami MM, Ler R, Walker D, York M. Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T immunoassays in serum from rats, dogs, and monkeys with induced acute myocardial injury. *Clin Chem* 2008a; 54: 1982-9.

Apple FS, Smith SW, Pearce LA, Ler R, Murakami MM. Use of the Centaur TnI-Ultra assay for detection of myocardial infarction and adverse events in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome. *Clin Chem* 2008b; 54: 723-8.

Apple FS, Pearce LA, Smith SW, Kaczmarek JM, Murakami MM. Role of monitoring changes in sensitive cardiac troponin I assay results for early diagnosis of myocardial infarction and prediction of risk of adverse events. *Clin Chem* 2009; 55: 930-7.

Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ* 2005; 173: 1191-202.

Basit M, Bakshi N, Hashem M, Allebban Z, Lawson N, Rosman HS, Maciejko JJ. The effect of freezing and long-term storage on the stability of cardiac troponin T. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 164-7.

Baumwart RD, Orvalho J, Meurs KM. Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2007; 68: 524-8.

Biernacka A, Frangogiannis NG. Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging Dis* 2011; 2: 158-73.

Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1: 307-10.

Bodor GS, Porter S, Landt Y, Ladenson JH. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. *Clin Chem* 1992; 38: 2203-14.

Bodor GS, Porterfield D, Voss EM, Smith S, Apple FS. Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. *Clin Chem* 1995; 41: 1710-5.

Bodor GS, Servant L, Voss EM, Smith S, Porterfield D, Apple FS. Cardiac troponin T composition in normal and regenerating human skeletal muscle. *Clin Chem* 1997; 43: 476-84.

Brothag A. Analytische und klinische Evaluierung eines kardialen Troponin-I-Immunoassays [Dissertation]. München: Technischen Universität München; 2003. 2003;

Burgener IA, Kovacevic A, Mauldin GN, Lombard CW. Cardiac troponins as indicators of acute myocardial damage in dogs. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 277-83.

Calvert CA, Chapman WL, Jr., Toal RL. Congestive cardiomyopathy in Doberman pinscher dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 181: 598-602.

Calvert CA. Dilated congestive cardiomyopathy in Doberman pinschers. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1986; 8: 417-30.

Calvert CA, Brown J. Use of M-mode echocardiography in the diagnosis of congestive cardiomyopathy in Doberman pinschers. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189: 293-7.

Calvert CA. Diagnosis and management of ventricular tachyarrhythmias in Doberman pinschers with cardiomyopathy. In: *Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice*. Kirk RW, Bonagura JD, eds. Toronto: W. B. Saunders 1995: 799-806.

Calvert CA, Hall G, Jacobs G, Pickus C. Clinical and pathologic findings in Doberman pinschers with occult cardiomyopathy that died suddenly or developed congestive heart failure: 54 cases (1984-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1997a; 210: 505-11.

Calvert CA, Pickus CW, Jacobs GJ, Brown J. Signalment, survival, and prognostic factors in Doberman pinschers with end-stage cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 1997b; 11: 323-6.

Calvert CA, Jacobs G, Pickus CW, Smith DD. Results of ambulatory electrocardiography in overtly healthy Doberman Pinschers with echocardiographic abnormalities. *J Am Vet Med Assoc* 2000a; 217: 1328-32.

Calvert CA, Jacobs GJ, Smith DD, Rathbun SL, Pickus CW. Association between

results of ambulatory electrocardiography and development of cardiomyopathy during long-term follow-up of Doberman pinschers. *J Am Vet Med Assoc* 2000b; 216: 34-9.

Calvert CA, Meurs KM. CVT Update: Doberman Pinscher Occult Cardiomyopathy. In: Kirk's Current Veterinary Therapy, 13 edn. Bonagura JD, Kirk RW, eds. Philadelphia: W.B. Saunders 2000: 756-60.

Calvert CA, Wall M. Results of ambulatory electrocardiography in overtly healthy Doberman Pinschers with equivocal echocardiographic evidence of dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 782-4.

Calvert CA, Brown J. Influence of antiarrhythmia therapy on survival times of 19 clinically healthy Doberman pinschers with dilated cardiomyopathy that experienced syncope, ventricular tachycardia, and sudden death (1985-1998). *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40: 24-8.

Carlson RJ, Navone A, McConnell JP, Burritt M, Castle MC, Grill D, Jaffe AS. Effect of myocardial ischemia on cardiac troponin I and T. *Am J Cardiol* 2002; 89: 224-6.

Casals G, Filella X, Bedini JL. Evaluation of a new ultrasensitive assay for cardiac troponin I. *Clin Biochem* 2007; 40: 1406-13.

Christenson RH, Duh SH, Apple FS, Bodor GS, Bunk DM, Dalluge J, Panteghini M, Potter JD, Welch MJ, Wu AH, Kahn SE. Standardization of cardiac troponin I assays: round Robin of ten candidate reference materials. *Clin Chem* 2001; 47: 431-7.

Chun R, Kelliham HB, Henik RA, Stepien RL. Comparison of plasma cardiac troponin I concentrations among dogs with cardiac hemangiosarcoma, noncardiac hemangiosarcoma, other neoplasms, and pericardial effusion of nonhemangiosarcoma origin. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 237: 806-11.

Church WM, Sisson DD, Oyama MA, Zachary JF. Third degree atrioventricular block and sudden death secondary to acute myocarditis in a dog. *J Vet Cardiol* 2007; 9: 53-7.

Clerico A, Fortunato A, Ripoli A, Prontera C, Zucchelli GC, Emdin M. Distribution of plasma cardiac troponin I values in healthy subjects: pathophysiological considerations. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 804-8.

Collinson PO, Boa FG, Gaze DC. Measurement of cardiac troponins. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 423-49.

Collinson PO, Stubbs PJ. Are troponins confusing? *Heart* 2003; 89: 1285-7.

Cooper G (2000) *The Cell - A Molecular Approach*, 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2000.

Cummins B, Auckland ML, Cummins P. Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1987; 113: 1333-44.

Cummins B, Cummins P. Cardiac specific troponin-I release in canine experimental myocardial infarction: development of a sensitive enzyme-linked immunoassay. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 999-1010.

Cummins P, Perry SV. Troponin I from human skeletal and cardiac muscles. *Biochem J* 1978; 171: 251-9.

Dasgupta A, Chow L, Nazareno L, Tso G, Datta P. Performance evaluation of a new chemiluminescent cardiac troponin I assay. *J Clin Lab Anal* 2000; 14: 224-9.

Davies CH, Harding SE, Poole-Wilson PA. Cellular mechanisms of contractile dysfunction in human heart failure. *Eur Heart J* 1996; 17: 189-98.

de Lemos JA, Morrow DA, Gibson CM, Murphy SA, Rifai N, Tanasijevic M, Giugliano RP, Schuhwerk KC, McCabe CH, Cannon CP, Antman EM, Braunwald E. Early noninvasive detection of failed epicardial reperfusion after fibrinolytic therapy. *Am J Cardiol* 2001; 88: 353-8.

DeFrancesco TC, Atkins CE, Keene BW, Coats JR, Hauck ML. Prospective clinical evaluation of serum cardiac troponin T in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 553-7.

Dhoot GK, Gell PG, Perry SV. The localization of the different forms of troponin I in skeletal and cardiac muscle cells. *Exp Cell Res* 1978; 117: 357-70.

Dhoot GK, Perry SV. Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. *Nature* 1979; 278: 714-8.

Diniz PP, de Moraes HS, Breitschwerdt EB, Schwartz DS. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 1136-43.

Diris JH, Hackeng CM, Kooman JP, Pinto YM, Hermens WT, van Dieijen-Visser MP. Impaired renal clearance explains elevated troponin T fragments in hemodialysis patients. *Circulation* 2004; 109: 23-5.

Eggers KM, Oldgren J, Nordenskjold A, Lindahl B. Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction. *Am Heart J* 2004; 148: 574-81.

Eggers KM, Lagerqvist B, Venge P, Wallentin L, Lindahl B. Persistent cardiac troponin I elevation in stabilized patients after an episode of acute coronary syndrome predicts long-term mortality. *Circulation* 2007; 116: 1907-14.

Everett RM, McGann J, Wimberly HC, Althoff J. Dilated cardiomyopathy of Doberman pinschers: retrospective histomorphologic evaluation of heart from 32

cases. *Vet Pathol* 1999; 36: 221-7.

Fan A, Cao Z, Li H, Kai M, Lu J. Chemiluminescence platforms in immunoassay and DNA analyses. *Anal Sci* 2009; 25: 587-97.

Feng YJ, Chen C, Fallon JT, Lai T, Chen L, Knibbs DR, Waters DD, Wu AH. Comparison of cardiac troponin I, creatine kinase-MB, and myoglobin for detection of acute ischemic myocardial injury in a swine model. *Am J Clin Pathol* 1998; 110: 70-7.

Ferrieres G, Calzolari C, Mani JC, Laune D, Trinquier S, Laprade M, Larue C, Pau B, Granier C. Human cardiac troponin I: precise identification of antigenic epitopes and prediction of secondary structure. *Clin Chem* 1998; 44: 487-93.

Fesmire FM. Improved identification of acute coronary syndromes with delta cardiac serum marker measurements during the emergency department evaluation of chest pain patients. *Cardiovasc Toxicol* 2001; 1: 117-23.

Fonfara S, Loureiro JF, Swift S, James RA, Pereira YM, Lopez-Alvarez J, Summerfield N, Dukes-McEwan J. English springer spaniels with significant bradyarrhythmias--presentation, troponin I and follow-up after pacemaker implantation. *J Small Anim Pract* 2010a; 51: 155-61.

Fonfara S, Loureiro J, Swift S, James R, Cripps P, Dukes-McEwan J. Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. *Vet J* 2010b; 184: 334-9.

Freda BJ, Tang WH, Van Lente F, Peacock WF, Francis GS. Cardiac troponins in renal insufficiency: review and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 2065-71.

Fredericks S, Merton GK, Lerena MJ, Heining P, Carter ND, Holt DW. Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory

animals. *Clin Chim Acta* 2001; 304: 65-74.

Fuentes VL, Corcoran B, French A, Schober KE, Kleemann R, Justus C. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of pimobendan in dogs with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 255-61.

Gallegos RP, Swingen C, Xu XJ, Wang X, Bianco R, Jerosch-Herold M, Bolman RM, 3rd. Infarct extent by MRI correlates with peak serum troponin level in the canine model. *J Surg Res* 2004; 120: 266-71.

Gaze DC, Collinson PO. Multiple molecular forms of circulating cardiac troponin: analytical and clinical significance. *Ann Clin Biochem* 2008; 45: 349-55.

Gerhardt W, Nordin G, Ljungdahl L. Can troponin T replace CK MBmass as "gold standard" for acute myocardial infarction ("AMI")? *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1999; 230: 83-9.

Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, Jarausch J, Jaffe AS, Katus HA. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clin Chem* 2010; 56: 254-61.

Goldmann BU, Christenson RH, Hamm CW, Meinertz T, Ohman EM. Implications of troponin testing in clinical medicine. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2001; 2: 75-84.

Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 2000; 80: 853-924.

Greaser ML, Gergely J. Purification and properties of the components from tropinin. *J Biol Chem* 1973; 248: 2125-33.

Guglielmini C, Civitella C, Diana A, Di Tommaso M, Cipone M, Luciani A. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with precapillary and postcapillary



pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 145-52.

Gunes V, Ozcan K, Citil M, Onmaz AC, Erdogan HM. Detection of myocardial degeneration with point-of-care cardiac troponin assays and histopathology in lambs with white muscle disease. *Vet J* 2010; 184: 376-8.

Hagman R, Lagerstedt AS, Fransson BA, Bergstrom A, Haggstrom J. Cardiac troponin I levels in canine pyometra. *Acta Vet Scand* 2007; 49: 1-8.

Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, Jorgensen P, Peheim E, Ljungdahl L, Goldmann B, Katus HA. The prognostic value of serum troponin T in unstable angina. *N Engl J Med* 1992; 327: 146-50.

Hamm CW, Heeschen C, Goldmann B, Vahanian A, Adgey J, Miguel CM, Rutsch W, Berger J, Kootstra J, Simoons ML. Benefit of abciximab in patients with refractory unstable angina in relation to serum troponin T levels. c7E3 Fab Antiplatelet Therapy in Unstable Refractory Angina (CAPTURE) Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; 340: 1623-9.

Hansson K, Haggstrom J, Kvart C, Lord P. Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in cavalier King Charles spaniels with and without left atrial enlargement. *Vet Radiol Ultrasound* 2002; 43: 568-75.

Hassan AK, Bergheanu SC, Hasan-Ali H, Liem SS, van der Laarse A, Wolterbeek R, Atsma DE, Schaliij MJ, Jukema JW. Usefulness of peak troponin-T to predict infarct size and long-term outcome in patients with first acute myocardial infarction after primary percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2009; 103: 779-84.

Hazlett MJ, Maxie MG, Allen DG, Wilcock BP. A retrospective study of heart disease in doberman pinscher dogs. *Can Vet J* 1983; 24: 205-10.

Heidenreich PA, Alloggiamento T, Melsop K, McDonald KM, Go AS, Hlatky

MA. The prognostic value of troponin in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 478-85.

Hirsch R, Landt Y, Porter S, Canter CE, Jaffe AS, Ladenson JH, Grant JW, Landt M. Cardiac troponin I in pediatrics: normal values and potential use in the assessment of cardiac injury. *J Pediatr* 1997; 130: 872-7.

Jaffe AS, Landt Y, Parvin CA, Abendschein DR, Geltman EM, Ladenson JH. Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1996; 42: 1770-6.

Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, Naslund U, Apple FS, Galvani M, Katus H. It's time for a change to a troponin standard. *Circulation* 2000; 102: 1216-20.

Jaffe AS. Chasing troponin: how low can you go if you can see the rise? *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1763-4.

Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1-11.

Jaffe AS. The clinical impact of the universal diagnosis of myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 1485-8.

James S, Armstrong P, Califf R, Simoons ML, Venge P, Wallentin L, Lindahl B. Troponin T levels and risk of 30-day outcomes in patients with the acute coronary syndrome: prospective verification in the GUSTO-IV trial. *Am J Med* 2003; 115: 178-84.

Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med* 2003; 348: 2007-18.

Jin JP, Lin JJ. Rapid purification of mammalian cardiac troponin T and its isoform switching in rat hearts during development. *J Biol Chem* 1988; 263: 7309-15.

Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara JA, Chapnick S, Reiss K, Olivetti G, Anversa P. Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol* 1996; 271: H1215-28.

Katrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, Pettersson K, Lovgren T, Severina ME, Pulkki K, Vuopio-Pulkki LM, Gusev NB. Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex. *Clin Chem* 1997; 43: 1379-85.

Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov VL, Esakova TV, Kolosova OV, Pettersson K, Lovgren T, Bulargina TV, Trifonov IR, Gratsiansky NA, Pulkki K, Voipio-Pulkki LM, Gusev NB. Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clin Chem* 1998; 44: 2433-40.

Katus HA, Remppis A, Scheffold T, Diederich KW, Kuebler W. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991; 67: 1360-7.

Keller T, Zeller T, Peetz D, Tzikas S, Roth A, Czyz E, Bickel C, Baldus S, Warnholtz A, Frohlich M, Sinning CR, Eleftheriadis MS, Wild PS, Schnabel RB, Lubos E, Jachmann N, Genth-Zotz S, Post F, Nicaud V, Tiret L, Lackner KJ, Munzel TF, Blankenberg S. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2009; 361: 868-77.

Kellihan HB, Oyama MA, Reynolds CA, Stepien RL. Weekly variability of plasma and serum NT-proBNP measurements in normal dogs. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: S93-7.

Kent M, Reiss C, Blas-Machado U. Elevated cardiac troponin I in a dog with an intracranial meningioma and evidence of myocardial necrosis. *J Am Anim Hosp Assoc* 2010; 46: 48-55.

Kittleson MD (1998) Primary Myocardial Disease Leading to Chronic Myocardial

Failure (Dilated Cardiomyopathy and Related Disease). In: Kittleson MD, Kienle RD. *Small Animal Cardiovascular Medicine*, 1st ed. St. Louis: Mosby; 1998. p. 339.

Kontos MC, Shah R, Fritz LM, Anderson FP, Tatum JL, Ornato JP, Jesse RL. Implication of different cardiac troponin I levels for clinical outcomes and prognosis of acute chest pain patients. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 958-65.

Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996; 98: 2854-65.

La Vecchia L, Mezzena G, Ometto R, Finocchi G, Bedogni F, Soffiati G, Vincenzi M. Detectable serum troponin I in patients with heart failure of nonmyocardial ischemic origin. *Am J Cardiol* 1997; 80: 88-90.

La Vecchia L, Mezzena G, Zanolla L, Paccanaro M, Varotto L, Bonanno C, Ometto R. Cardiac troponin I as diagnostic and prognostic marker in severe heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 644-52.

Labugger R, Organ L, Collier C, Atar D, Van Eyk JE. Extensive troponin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2000; 102: 1221-6.

Lagneau F, Beyne P, Letteron P, Laperche T, Marty J. Fluid therapy directly interferes with immunoassay for cardiac troponin I. *Intensive Care Med* 1999; 25: 625-7.

Lamb EJ, Webb MC, Abbas NA. The significance of serum troponin T in patients with kidney disease: a review of the literature. *Ann Clin Biochem* 2004; 41: 1-9.

Lang K, Borner A, Figulla HR. Comparison of biochemical markers for the

detection of minimal myocardial injury: superior sensitivity of cardiac troponin--T ELISA. *J Intern Med* 2000; 247: 119-23.

Larue C, Defacque-Lacquement H, Calzolari C, Le Nguyen D, Pau B. New monoclonal antibodies as probes for human cardiac troponin I: epitopic analysis with synthetic peptides. *Mol Immunol* 1992; 29: 271-8.

Latini R, Masson S, Anand IS, Missov E, Carlson M, Vago T, Angelici L, Barlera S, Parrinello G, Maggioni AP, Tognoni G, Cohn JN. Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure. *Circulation* 2007; 116: 1242-9.

Lauer B, Niederau C, Kuhl U, Schannwell M, Pauschinger M, Strauer BE, Schultheiss HP. Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 1354-9.

LaVecchio D, Marin LM, Baumwart R, Iazbik MC, Westendorf N, Couto CG. Serum cardiac troponin I concentration in retired racing greyhounds. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 87-90.

Linde A, Summerfield NJ, Sleeper MM, Wright FB, Clifford CA, Melgarejo T, Knight DH. Pilot study on cardiac troponin I levels in dogs with pericardial effusion. *J Vet Cardiol* 2006; 8: 19-23.

Lippi G, Targher G, Franchini M, Plebani M. Genetic and biochemical heterogeneity of cardiac troponins: clinical and laboratory implications. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 1183-94.

Lipshultz SE, Rifai N, Sallan SE, Lipsitz SR, Dalton V, Sacks DB, Ottlinger ME. Predictive value of cardiac troponin T in pediatric patients at risk for myocardial injury. *Circulation* 1997; 96: 2641-8.

Ljungvall I, Hoglund K, Tidholm A, Olsen LH, Borgarelli M, Venge P,

Haggstrom J. Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 153-9.

Lobetti R, Dvir E, Pearson J. Cardiac troponins in canine babesiosis. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 63-8.

Lum G, Solarz D. False positive cardiac troponin results in patients without acute myocardial infarction. *Lab Med* 2006; 37: 546-50.

Macrae AR, Kavsak PA, Lustig V, Bhargava R, Vandersluis R, Palomaki GE, Yerna MJ, Jaffe AS. Assessing the requirement for the 6-hour interval between specimens in the American Heart Association Classification of Myocardial Infarction in Epidemiology and Clinical Research Studies. *Clin Chem* 2006; 52: 812-8.

Mair J, Morandell D, Genser N, Lechleitner P, Dienstl F, Puschendorf B. Equivalent early sensitivities of myoglobin, creatine kinase MB mass, creatine kinase isoform ratios, and cardiac troponins I and T for acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1995a; 41: 1266-72.

Mair J, Wagner I, Morass B, Fridrich L, Lechleitner P, Dienstl F, Calzolari C, Larue C, Puschendorf B. Cardiac troponin I release correlates with myocardial infarction size. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995b; 33: 869-72.

Mair J. Tissue release of cardiac markers: from physiology to clinical applications. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 1077-84.

Mann DL, Kent RL, Parsons B, Cooper Gt. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* 1992; 85: 790-804.

Mastrorilli C, Dondi F, Agnoli C, Turba ME, Vezzali E, Gentilini F. Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans*

Australis serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001-2004). *J Vet Intern Med* 2007; 21: 3-10.

Mausberg TB, Wess G, Simak J, Keller L, Drogemuller M, Drogemuller C, Webster MT, Stephenson H, Dukes-McEwan J, Leeb T. A locus on chromosome 5 is associated with dilated cardiomyopathy in doberman pinschers. *PLoS One* 2011; 6: e20042.

McKenzie EC, Jose-Cunilleras E, Hinchcliff KW, Holbrook TC, Royer C, Payton ME, Williamson K, Nelson S, Willard MD, Davis MS. Serum chemistry alterations in Alaskan sled dogs during five successive days of prolonged endurance exercise. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 230: 1486-92.

McMurray JJ, Pfeffer MA. Heart failure. *Lancet* 2005; 365: 1877-89.

McNeil A. The trouble with Troponin. *Heart Lung Circ* 2007; 16 Suppl 3: S13-6.

Melanson SE, Morrow DA, Jarolim P. Earlier detection of myocardial injury in a preliminary evaluation using a new troponin I assay with improved sensitivity. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 282-6.

Mellor PJ, Mellanby RJ, Baines EA, Villiers EJ, Archer J, Herrtage ME. High serum troponin I concentration as a marker of severe myocardial damage in a case of suspected exertional heatstroke in a dog. *J Vet Cardiol* 2006; 8: 55-62.

Meurs KM. Canine dilated cardiomyopathy - recognition and clinical management. The 26th Annual Waltham/OSU Symposium: Small Animal Cardiology, 2002;

Meurs KM, Fox PR, Norgard M, Spier AW, Lamb A, Koplitz SL, Baumwart RD. A prospective genetic evaluation of familial dilated cardiomyopathy in the Doberman pinscher. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1016-20.

Mohammed AA, Januzzi JL, Jr. Clinical applications of highly sensitive troponin assays. *Cardiol Rev* 2010; 18: 12-9.

Moise NS, Fox PR. Echocardiography and Doppler Imaging. In: *Textbook of Canine and Feline Cardiology: Principles and Clinical Practice*. Fox PR, Sisson DD, Moise NS, eds. Philadelphia: W. B. Saunders 1999: 151-260.

Moise NS. Chronic management of tachyarrhythmias in the dog. The 26th annual Waltham/OSU Symposium: Small Animal Cardiology, 2002;

Morrow DA, Cannon CP, Rifai N, Frey MJ, Vicari R, Lakkis N, Robertson DH, Hille DA, DeLucca PT, DiBattiste PM, Demopoulos LA, Weintraub WS, Braunwald E. Ability of minor elevations of troponins I and T to predict benefit from an early invasive strategy in patients with unstable angina and non-ST elevation myocardial infarction: results from a randomized trial. *JAMA* 2001; 286: 2405-12.

Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, Wu AH, Christenson RH. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation* 2007; 115: e356-75.

Narula J, Khaw BA, Dec GW, Jr., Palacios IF, Southern JF, Fallon JT, Strauss HW, Haber E, Yasuda T. Brief report: recognition of acute myocarditis masquerading as acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 328: 100-4.

Neumayr G, Gaenger H, Pfister R, Sturm W, Schwarzacher SP, Eibl G, Mitterbauer G, Hoertnagl H. Plasma levels of cardiac troponin I after prolonged strenuous endurance exercise. *Am J Cardiol* 2001; 87: 369-71, A10.

Newby LK, Storrow AB, Gibler WB, Garvey JL, Tucker JF, Kaplan AL, Schreiber DH, Tuttle RH, McNulty SE, Ohman EM. Bedside multimarker testing for risk stratification in chest pain units: The chest pain evaluation by creatine



kinase-MB, myoglobin, and troponin I (CHECKMATE) study. *Circulation* 2001; 103: 1832-7.

Nosanchuk JS, Combs B, Abbott G. False increases of troponin I attributable to incomplete separation of serum. *Clin Chem* 1999; 45: 714.

O'Brien PJ, Dameron GW, Beck ML, Kang YJ, Erickson BK, Di Battista TH, Miller KE, Jackson KN, Mittelstadt S. Cardiac troponin T is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim Sci* 1997a; 47: 486-95.

O'Brien PJ, Landt Y, Ladenson JH. Differential reactivity of cardiac and skeletal muscle from various species in a cardiac troponin I immunoassay. *Clin Chem* 1997b; 43: 2333-8.

O'Brien PJ. Blood cardiac troponin in toxic myocardial injury: archetype of a translational safety biomarker. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6: 685-702.

O'Brien PJ, Smith DE, Knechtel TJ, Marchak MA, Pruiomboom-Brees I, Brees DJ, Spratt DP, Archer FJ, Butler P, Potter AN, Provost JP, Richard J, Snyder PA, Reagan WJ. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim* 2006; 40: 153-71.

O'Brien PJ. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology* 2008; 245: 206-18.

O'Grady MR, Horne R. The prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman pinschers. *Proceedings 16th Annual ACVIM Forum, San Diego, CA, 1998;*

O'Grady MR, O'Sullivan ML. Dilated cardiomyopathy: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34: 1187-207.

O'Grady MR, Minors SL, O'Sullivan ML, Horne R. Effect of pimobendan on case

fatality rate in Doberman Pinschers with congestive heart failure caused by dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 897-904.

O'Grady MR, O'Sullivan ML, Minors SL, Horne R. Efficacy of benazepril hydrochloride to delay the progression of occult dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 977-83.

Ohtsuki I, Morimoto S. Troponin: regulatory function and disorders. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369: 62-73.

Omland T, de Lemos JA, Sabatine MS, Christophi CA, Rice MM, Jablonski KA, Tjora S, Domanski MJ, Gersh BJ, Rouleau JL, Pfeffer MA, Braunwald E. A sensitive cardiac troponin T assay in stable coronary artery disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 2538-47.

Oyama MA, Solter PF. Validation of an immunoassay for measurement of canine cardiac troponin-I. *J Vet Cardiol* 2004; 6: 17-24.

Oyama MA, Sisson DD. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 831-9.

Oyama MA, Sisson DD, Solter PF. Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations. *Am J Vet Res* 2007; 68: 42-7.

Panteghini M, Apple FS, Christenson RH, Dati F, Mair J, Wu AH. Use of biochemical markers in acute coronary syndromes. IFCC Scientific Division, Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage. International Federation of Clinical Chemistry. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 687-93.

Panteghini M, Gerhardt W, Apple FS, Dati F, Ravkilde J, Wu AH. Quality specifications for cardiac troponin assays. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 175-9.

Panteghini M, Pagani F, Yeo KT, Apple FS, Christenson RH, Dati F, Mair J, Ravkilde J, Wu AH. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clin Chem* 2004; 50: 327-32.

Parmacek MS, Leiden JM. Structure, function, and regulation of troponin C. *Circulation* 1991; 84: 991-1003.

Pearlstone JR, Carpenter MR, Smillie LB. Amino acid sequence of rabbit cardiac troponin T. *J Biol Chem* 1986; 261: 16795-810.

Pelander L, Hagman R, Haggstrom J. Concentrations of cardiac Troponin I before and after ovariohysterectomy in 46 female dogs with pyometra. *Acta Vet Scand* 2008; 50: 35.

Pelander L, Ljungvall I, Haggstrom J. Myocardial cell damage in 24 dogs bitten by the common European viper (*Vipera berus*). *Vet Rec* 2010; 166: 687-90.

Perry SV. Troponin T: genetics, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* 1998; 19: 575-602.

Petric AD, Stabej P, Zemva A. Dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers: Survival, Causes of Death and a Pedigree Review in a Related Line. *J Vet Cardiol* 2002; 4: 17-24.

Porciello F, Rishniw M, Herndon WE, Biretoni F, Antognoni MT, Simpson KW. Cardiac troponin I is elevated in dogs and cats with azotaemia renal failure and in dogs with non-cardiac systemic disease. *Aust Vet J* 2008; 86: 390-4.

Price A, Burgin C, Cruise M. Stability of cardiac troponins and CK-MB mass isoenzyme. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 1159-60.

Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, Solter PF. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type

natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 238-42.

Prosek R, Ettinger SJ (2010). Biomarkers of Cardiovascular Disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the dog and the cat*, 7th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2010. p. 1187-96.

Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, Biedert S, Schaub N, Buerge C, Potocki M, Noveanu M, Breidthardt T, Twerenbold R, Winkler K, Bingisser R, Mueller C. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* 2009; 361: 858-67.

Ricchiuti V, Voss EM, Ney A, Odland M, Anderson PA, Apple FS. Cardiac troponin T isoforms expressed in renal diseased skeletal muscle will not cause false-positive results by the second generation cardiac troponin T assay by Boehringer Mannheim. *Clin Chem* 1998a; 44: 1919-24.

Ricchiuti V, Sharkey SW, Murakami MM, Voss EM, Apple FS. Cardiac troponin I and T alterations in dog hearts with myocardial infarction: correlation with infarct size. *Am J Clin Pathol* 1998b; 110: 241-7.

Ricchiuti V, Apple FS. RNA expression of cardiac troponin T isoforms in diseased human skeletal muscle. *Clin Chem* 1999; 45: 2129-35.

Rifai N, Douglas PS, O'Toole M, Rimm E, Ginsburg GS. Cardiac troponin T and I, echocardiographic [correction of electrocardiographic] wall motion analyses, and ejection fractions in athletes participating in the Hawaii Ironman Triathlon. *Am J Cardiol* 1999; 83: 1085-9.

Rishniw M, Barr SC, Simpson KW, Winand NJ, Wootton JA. Cloning and sequencing of the canine and feline cardiac troponin I genes. *Am J Vet Res* 2004; 65: 53-8.

Roberts R, Sobel BE. Editorial: Isoenzymes of creatine phosphokinase and diagnosis of myocardial infarction. *Ann Intern Med* 1973; 79: 741-3.

Roberts WL, Calcote CB, De BK, Holmstrom V, Narlock C, Apple FS. Prevention of analytical false-positive increases of cardiac troponin I on the Stratus II analyzer. *Clin Chem* 1997; 43: 860-1.

Ronald A, Stimson WH. The evolution of immunoassay technology. *Parasitology* 1998; 117 Suppl: S13-27.

Roongsritong C, Warraich I, Bradley C. Common causes of troponin elevations in the absence of acute myocardial infarction: incidence and clinical significance. *Chest* 2004; 125: 1877-84.

Saadeddin SM, Habbab MA, Siddieg HH, Al Seeni MN, Tahery AB, Dafterdar RM. Evaluation of 6 cardiac troponin assays in patients with acute coronary syndrome. *Saudi Med J* 2003; 24: 1092-7.

Saggin L, Gorza L, Ausoni S, Schiaffino S. Troponin I switching in the developing heart. *J Biol Chem* 1989; 264: 16299-302.

Sato Y, Kita T, Takatsu Y, Kimura T. Biochemical markers of myocyte injury in heart failure. *Heart* 2004; 90: 1110-3.

Saunders AB, Smith BE, Fosgate GT, Suchodolski JS, Steiner JM. Cardiac troponin I and C-reactive protein concentrations in dogs with severe pulmonic stenosis before and after balloon valvuloplasty. *J Vet Cardiol* 2009; 11: 9-16.

Scharnhorst V, Vader HL, van der Graaf F. Characteristics of the cardiac troponin I assay on the Immulite 2000 analyzer. *Clin Chem* 2002; 48: 1626-7.

Schober KE, Kirbach B, Oechtering G. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. *J Vet Cardiol* 1999; 1: 17-25.

Schober KE, Cornand C, Kirbach B, Aupperle H, Oechtering G. Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentrations in dogs with gastric dilatation-volvulus. *J Am Vet Med Assoc* 2002a; 221: 381-8.

Schober KE, Kirbach B, Cornand C, Oechtering G. Diagnostische und differentialdiagnostische Wertigkeit zirkulierender kardialen Troponine bei Hund und Katze, Teil 2: Diagnostische Bedeutung. *Tierärztl Praxis* 2002b; 30: 326-32.

Schober KE, Kirbach B, Cornand C, Oechtering G. Diagnostische und differentialdiagnostische Wertigkeit zirkulierender kardialer Troponine bei Hund und Katze, Teil 1: Der Troponinkomplex - Struktur, Funktion, periphere Zirkulation und biochemischer Nachweis. *Tierärztl Praxis* 2002c; 30: 290-4.

Schreier T, Kedes L, Gahlmann R. Cloning, structural analysis, and expression of the human slow twitch skeletal muscle/cardiac troponin C gene. *J Biol Chem* 1990; 265: 21247-53.

Schultze AE, Konrad RJ, Credille KM, Lu QA, Todd J. Ultrasensitive cross-species measurement of cardiac troponin-I using the Erenna immunoassay system. *Toxicol Pathol* 2008; 36: 777-82.

Segev G, Ohad DG, Shipov A, Kass PH, Aroch I. Cardiac arrhythmias and serum cardiac troponins in *Vipera palaestinae* envenomation in dogs. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 106-13.

Selting KA, Lana SE, Ogilvie GK, Olmstead A, Mykles DL, Bright J, Richardson KL, Walton JA, Monnet E, Fettman MJ. Cardiac troponin I in canine patients with lymphoma and osteosarcoma receiving doxorubicin: comparison with clinical heart disease in a retrospective analysis. *Vet Comp Oncol* 2004; 2: 142-56.

Serra M, Papakonstantinou S, Adamcova M, O'Brien PJ. Veterinary and toxicological applications for the detection of cardiac injury using cardiac troponin. *Vet J* 2010; 185: 50-7.

Sharkey LC, Berzina I, Ferasin L, Tobias AH, Lulich JP, Hegstad-Davies RL. Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in dogs with renal failure. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 234: 767-70.

Shaw SP, Rozanski EA, Rush JE. Cardiac troponins I and T in dogs with pericardial effusion. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 322-4.

Shi Q, Ling M, Zhang X, Zhang M, Kadujevic L, Liu S, Laurino JP. Degradation of cardiac troponin I in serum complicates comparisons of cardiac troponin I assays. *Clin Chem* 1999; 45: 1018-25.

Shih AC, Maisenbacher HW, Barreirinha A, Adin DB, Schmidt MK, Prosek R, Estrada AH. Effect of routine cardiovascular catheterization on cardiac troponin I concentration in dogs. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: S87-92.

Siemens. TnI-Ultra, ADVIA Centaur- und ADVIA Centaur XP-Testanleitung. 2008a;

Siemens. Immulite 2000 Troponin I, Testanleitung. 2008b:

Sleeper MM, Clifford CA, Laster LL. Cardiac troponin I in the normal dog and cat. *J Vet Intern Med* 2001; 15: 501-3.

Snyder K, Saunders AB, Levine JM, Clubb FJ. Arrhythmias and elevated troponin I in a dog with steroid-responsive meningitis-arteritis. *J Am Anim Hosp Assoc* 2010; 46: 61-5.

Solaro RJ, Rosevear P, Kobayashi T. The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369: 82-7.

Spratt DP, Mellanby RJ, Drury N, Archer J. Cardiac troponin I: evaluation I of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *J Small Anim Pract* 2005;

46: 139-45.

Stubbs P, Collinson P, Moseley D, Greenwood T, Noble M. Prognostic significance of admission troponin T concentrations in patients with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94: 1291-7.

Taggart DP, Hadjinikolas L, Wong K, Yap J, Hooper J, Kemp M, Hue D, Yacoub M, Lincoln JC. Vulnerability of paediatric myocardium to cardiac surgery. *Heart* 1996; 76: 214-7.

Takeda S, Yamashita A, Maeda K, Maeda Y. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form. *Nature* 2003; 424: 35-41.

Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res* 1991; 69: 1185-95.

Tanasijevic MJ, Cannon CP, Antman EM, Wybenga DR, Fischer GA, Grudzien C, Gibson CM, Winkelman JW, Braunwald E. Myoglobin, creatine-kinase-MB and cardiac troponin-I 60-minute ratios predict infarct-related artery patency after thrombolysis for acute myocardial infarction: results from the Thrombolysis in Myocardial Infarction study (TIMI) 10B. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 739-47.

Tarducci A, Abate O, Borgarelli M, Borrelli A, Zanatta R, Cagnasso A. Serum values of cardiac troponin-T in normal and cardiomyopathic dogs. *Vet Res Commun* 2004; 28 Suppl 1: 385-8.

Tate JR. Troponin revisited 2008: assay performance. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 1489-500.

Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996; 97: 2891-7.



Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 2173-95.

Tidholm A, Haggstrom J, Borgarelli M, Tarducci A. Canine idiopathic dilated cardiomyopathy. Part I: Aetiology, clinical characteristics, epidemiology and pathology. *Vet J* 2001; 162: 92-107.

Toyota N, Shimada Y. Differentiation of troponin in cardiac and skeletal muscles in chicken embryos as studied by immunofluorescence microscopy. *J Cell Biol* 1981; 91: 497-504.

Trafny DJ, Oyama MA, Wormser C, Reynolds CA, Singletary GE, Peddle GD. Cardiac troponin-I concentrations in dogs with bradyarrhythmias before and after artificial pacing. *J Vet Cardiol* 2010; 12: 183-90.

Tucker JF, Collins RA, Anderson AJ, Hauser J, Kalas J, Apple FS. Early diagnostic efficiency of cardiac troponin I and Troponin T for acute myocardial infarction. *Acad Emerg Med* 1997; 4: 13-21.

van de Kerkhof D, Peters B, Scharnhorst V. Performance of the Advia Centaur second-generation troponin assay TnI-Ultra compared with the first-generation cTnI assay. *Ann Clin Biochem* 2008; 45: 316-7.

Varga A, Schober KE, Walker WL, Lakritz J, Michael Rings D. Validation of a commercially available immunoassay for the measurement of bovine cardiac troponin I. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 359-65.

Venge P, Lagerqvist B, Diderholm E, Lindahl B, Wallentin L. Clinical performance of three cardiac troponin assays in patients with unstable coronary artery disease (a FRISC II substudy). *Am J Cardiol* 2002; 89: 1035-41.

Voss EM, Sharkey SW, Gernert AE, Murakami MM, Johnston RB, Hsieh CC, Apple FS. Human and canine cardiac troponin T and creatine kinase-MB

distribution in normal and diseased myocardium. Infarct sizing using serum profiles. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119: 799-806.

Wakshlag JJ, Kraus MS, Gelzer AR, Downey RL, Vacchani P. The influence of high-intensity moderate duration exercise on cardiac troponin I and C-reactive protein in sled dogs. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 1388-92.

Waxman DA, Hecht S, Schappert J, Husk G. A model for troponin I as a quantitative predictor of in-hospital mortality. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1755-62.

Wells RJ, Sedacca CD, Aman AM, Hackett TB, Twedt DC, Shelton GD. Successful management of a dog that had severe rhabdomyolysis with myocardial and respiratory failure. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 234: 1049-54.

Wells SM, Sleeper M. Cardiac troponins. *J Vet Emerg Crit Care* 2008; 18: 235-45.

Wess G, Schulze A, Butz V, Simak J, Killich M, Keller LJ, Maeurer J, Hartmann K. Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *J Vet Intern Med* 2010a; 24: 533-8.

Wess G, Simak J, Mahling M, Hartmann K. Cardiac troponin I in doberman pinschers with cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2010b; 24: 843-9.

Wess G, Schulze A, Geraghty N, Hartmann K. Ability of a 5-minute electrocardiography (ECG) for predicting arrhythmias in Doberman Pinschers with cardiomyopathy in comparison with a 24-hour ambulatory ECG. *J Vet Intern Med* 2010c; 24: 367-71.

Wess G, Mäurer J, Hartmann K. Comparison of New Reference Values of Biplane Simpson Rule and New M-Mode Reference Values to Detect Early Echocardiographic Changes in Doberman Pinschers with DCM. *ACVIM*

(Abstract) 2010d;

Wess G, Maurer J, Simak J, Hartmann K. Use of Simpson's method of disc to detect early echocardiographic changes in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2010e; 24: 1069-76.

Wess G, Butz V, Mahling M, Hartmann K. Evaluation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Am J Vet Res* 2011; 72: 642-9.

Wilkinson JM, Grand RJ. Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. *Nature* 1978; 271: 31-5.

Willging S, Keller F, Steinbach G. Specificity of cardiac troponins I and T in renal disease. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 87-92.

Wilson SR, Sabatine MS, Braunwald E, Sloan S, Murphy SA, Morrow DA. Detection of myocardial injury in patients with unstable angina using a novel nanoparticle cardiac troponin I assay: observations from the PROTECT-TIMI 30 Trial. *Am Heart J* 2009; 158: 386-91.

Wong GC, Morrow DA, Murphy S, Kraimer N, Pai R, James D, Robertson DH, Demopoulos LA, DiBattiste P, Cannon CP, Gibson CM. Elevations in troponin T and I are associated with abnormal tissue level perfusion: a TACTICS-TIMI 18 substudy. *Treat Angina with Aggrastat and Determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy-Thrombolysis in Myocardial Infarction*. *Circulation* 2002; 106: 202-7.

Wu AH, Feng YJ, Moore R, Apple FS, McPherson PH, Buechler KF, Bodor G. Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. American Association for Clinical Chemistry Subcommittee on cTnI Standardization. *Clin Chem* 1998; 44: 1198-208.

Wu AH, Ford L. Release of cardiac troponin in acute coronary syndromes: ischemia or necrosis? *Clin Chim Acta* 1999; 284: 161-74.

Zellweger MJ, Schaer BA, Cron TA, Pfisterer ME, Osswald S. Elevated troponin levels in absence of coronary artery disease after supraventricular tachycardia. *Swiss Med Wkly* 2003; 133: 439-41.

Zimmerman J, Fromm R, Meyer D, Boudreaux A, Wun CC, Smalling R, Davis B, Habib G, Roberts R. Diagnostic marker cooperative study for the diagnosis of myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99: 1671-7.

## IX. ANHANG

**Tabelle 20:** Klassifikation der verschiedenen Typen des Myokardinfarkts entsprechend der universellen Definition von 2007 (THYGESEN et al., 2007)

Typ I	Spontaner Myokardinfarkt als Folge einer Ischämie im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms verursacht z.B. durch Plaqueruptur
Typ II	Sekundärer Myokardinfarkt als Folge einer Ischämie bei erhöhtem Sauerstoffbedarf oder verminderten Angebot, z.B. Koronarspasmus oder – embolie, Anämie, Arrhythmien, Hyper- oder Hypotension
Typ III	Plötzlicher Herztod, inklusive kardialer Arrest, mit passender Klinik, passendem EKG-Befund (neue ST-Streckenhebung oder neuer Linksschenkelblock) und Hinweise auf einen frischen Thrombus in der Autopsie oder Angiographie. Der Tod trat vor einer Blutprobenentnahme oder vor einem nachweisbaren Troponinanstieg ein
Typ IVa	Myokardinfarkt im Rahmen einer perkutanen Koronarintervention
Typ IVb	Myokardinfarkt im Rahmen einer Stentthrombose, dokumentiert mittels Angiographie oder Autopsie
Typ V	Myokardinfarkt im Zusammenhang mit einer Bypassoperation

**Tabelle 21:** International Small Animal Cardiac Health Council's Klassifikation

Stadium	Beschreibung
I	Asymptomatische Tiere
IA	Im Röntgen ist keine Vergrößerung des Herzens erkennbar
IB	Im Röntgen stellt sich das Herz vergrößert dar
II	Gering- mittelgradige Herzinsuffizienz
III	Hochgradige Herzinsuffizienz
IIIA	Ambulante Therapie der Erkrankung möglich
IIIB	Stationäre Aufnahme zur Stabilisierung notwendig

## **X. DANKSAGUNG**

### **Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei:**

Herrn Privatdozent Dr. Gerhard Wess, meinem Doktorvater, der mich bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit jederzeit mit fachlich sehr wertvollen Ratschlägen unterstützt hat. Gerhard vielen herzlichen Dank für das hochinteressante Thema, dein Vertrauen, das du in mich gesetzt hast, deine mir entgegengebrachte Geduld, deine Begeisterung für die Kardiologie, die sich auf mich übertragen hat, die kardiologische Ausbildung und deine Freundschaft.

Frau Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann, die die Erstellung dieser Arbeit überhaupt ermöglicht hat.

Herrn Dr. Peter Zwerenz der Firma Siemens Healthcare Diagnostics für die Bereitstellung der Materialien zur Durchführung des hochsensitiven Tests.

Frau Dr. Sibylle Thüre und Herrn Dr. Marco Weiss von IDEXX Laboratories für die fachlichen Ratschläge und die Durchführung der Troponin-Analysen.

Herrn Prof. Küchenhoff und seinem Mitarbeiter André Klima des Instituts für Statistik der LMU München für ihre wertvolle Beratung und geduldige Hilfsbereitschaft.

meinen lieben Eltern, die mir in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Lebensweg gelegt haben, die mir stets Mut zugesprochen haben und immer hinter mir gestanden sind. Danke für eure grenzenlose und uneingeschränkte Unterstützung.

meiner Cousine Martina, die immer für mich da ist und mich zu jeder Tages- und Nachtzeit in allen Lebenssituationen tatkräftig unterstützt. Martina vielen Dank für alles.

meinem Freund Stefan, der mich bestärkt hat, sobald ich selbst an der erfolgreichen Fertigstellung meiner Doktorarbeit gezweifelt habe.

Alex, die seit dem Studium mit mir durch dick und dünn geht und auf die ich mich immer verlassen kann.

Lisa und Julia für ihre uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft ihr großes kardiologisches Wissen an mich weiterzugeben und ihre Freundschaft.