

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
und dem Labor Synlab MVZ Leinfelden

**Etablierung von Enzymaktivitätsmessungen im Urin zur
Beurteilung der Probenqualität bei Drogen-
Überwachungsprogrammen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Friess, Anna Theresia

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Wieland

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Batra

Tag der Disputation: 20.12.2021

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Drogenabhängigkeit und Substitutionsbehandlung	1
1.2 Kontrollen bei der Drogensubstitution.....	3
1.3 Vorhandene Marker zu Substitutionskontrolle	4
1.4 GGT als möglicher Marker.....	8
1.5 LDH als möglicher Marker	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 Untersuchungsmaterialien.....	15
2.2 Patientenproben	15
2.2.1 Referenzkollektiv (50 Normalpersonen)	15
2.2.2 Untersuchungskollektiv (50 Substitutionspatienten).....	16
2.3 Gebrauchsgegenstände und Laborausstattung.....	16
2.3.1 Allgemeine Chemikalien.....	17
2.3.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.3.3 Geräte.....	17
2.3.4 EDV-Software	17
2.4 Laborchemische Analysen.....	18
2.4.1 Vorbereitung und Messung der Proben	21

2.4.2	Messmethode GGT.....	22
2.4.3	Messmethode LDH.....	22
2.4.4	Messmethode Kreatinin im Urin.....	23
2.4.5	Messmethode pH im Urin.....	23
2.4.6	Validierung der Messverfahren für Urin.....	23
2.4.7	Lagerungsstabilität der Enzymaktivitäten.....	27
2.4.8	Enzymstabilität bei mehrmaligem Einfrieren.....	27
2.4.9	Empfindlichkeit gegen pH-Änderung als Verfälschungsstrategie	27
2.4.10	Ermittlung der Referenzbereichsgrenzen.....	28
2.4.11	Ermittlung der Entscheidungsgrenzen und der Trennleistung.....	28
2.5	Datenerfassung und -übermittlung.....	29
2.6	Statistik.....	29
3	ERGEBNISSE.....	31
3.1	Validierung der GGT-Aktivitätsbestimmung für Urin.....	31
3.1.1	Erstellung eines Präzisionsprofils.....	31
3.1.2	Ermittlung der Bestimmungsgrenze (LoQ).....	32
3.1.3	Ermittlung von Leerwert- und Nachweisgrenze (LoB/LoD).....	33
3.1.4	Ermittlung von Unrichtigkeit, Unpräzision und QUAMM.....	35
3.1.5	Überprüfung der Linearität.....	36
3.2	Validierung der LDH-Aktivitätsbestimmung für Urin.....	38
3.2.1	Erstellung eines Präzisionsprofils.....	38
3.2.2	Ermittlung der Bestimmungsgrenzen (LoQ).....	39
3.2.3	Ermittlung von Nachweis- und Leerwertgrenze (LoD/LoB).....	40
3.2.4	Ermittlung von Unrichtigkeit, Unpräzision und QUAMM.....	41
3.2.5	Überprüfung der Linearität.....	43
3.3	Validierung der Aktivitätsmessung für Alkalische Phosphatase.....	44
3.4	Lagerungsstabilität bei verschiedenen Lagertemperaturen.....	45
3.5	Enzymstabilität bei mehrmaligem Einfrieren (Freeze-Thaw).....	50
3.6	Enzymstabilität bei pH-Änderung.....	51
3.7	Bestimmung von Referenzbereichen.....	54
3.8	Korrelation Urin/Serum Enzymaktivitätswerte.....	58
3.9	Untersuchung der Enzymausscheidung im Langzeitverlauf.....	60
3.10	Vergleich von Normalkollektiv mit Substitutionskollektiv.....	61

3.11	Bestimmung der Entscheidungsgrenzen für eingefrorene Proben .	66
3.11.1	Cut-off für LDH zur Erkennung von tiefgefrorenen Proben	72
3.12	Differenzierung von frischen und gefroren-gelagerten Urinproben .	73
3.12.1	Trennleistung von Einzelmarkerbestimmungen	74
3.12.2	Trennleistung von Markerkombinationen	75
3.13	Klassifizierung indifferenter Testresultate ohne Bewertung	76
3.14	Leistungsfähigkeit der kombinierten Enzymbestimmungen	77
3.14.1	Sensitivität und Spezifität	77
3.14.2	Positive und negative prädiktive Werte	78
3.15	Anwendungserprobung (Blindversuch)	79
4	DISKUSSION	81
4.1	Leistungsfähigkeit und Limitationen der Messverfahren	81
4.2	Enzymausscheidung von GGT und LDH im Urin	84
4.3	Aktivitätsverlust von GGT und LDH im Urin	86
4.4	Eigene Ergebnisse im Vergleich zu bisherigen Literaturangaben ...	87
4.5	Leistungsfähigkeit der Entscheidungsgrenzen	89
4.6	Limitationen des Einfriertests	90
4.7	Positive und negative Vorhersagewerte des Verfahrens	91
4.8	Vergleich zu anderen Laborverfahren	92
4.9	Anwendung in der Routinediagnostik	96
5	ZUSAMMENFASSUNG	97
6	LITERATURVERZEICHNIS	99
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	107
8	LEBENS LAUF	108
9	DANKSAGUNG	109

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABP	Athlete biological passport
AP	Alkalische Phosphatase
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
BtMVV	Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung
CI	Konfidenzintervall
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
d	Tag
DAkKS	Deutsche Akkreditierungsstelle
GC/MS	Gas Chromatography / Mass Spectrometry (Kopplung)
GF	Gefrierschrank (-18°C)
GGG	L-Gamma-Glutamyl-Glycylglycin
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
ICD	International Classification of Diseases
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IQR	Interquartile Range / Interquartilsabstand
ISO	International Organization for Standardization
KS	Kühlschrank (4-8°C)
LC/MS	Liquid Chromatography / Mass Spectrometry (Kopplung)
LDH	L-Lactatdehydrogenase
LoB	Limit of Blank (Leerwertgrenz)
LoD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LoQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
MW	Mittelwert
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogen
NP	Normalperson
NPW	Negativ prädiktiver Wert
ns	nicht signifikant
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
PEG	Polyethylenglycol
PPW	Positiv prädiktiver Wert
QK	Qualitätskontrolle
QUAMM	Quadratischer Mittelwert der Messwertabweichung
RiliBÄK	Richtlinie der Bundesärztekammer
ROC	Receiver-Operating-Characteristics
RT	Raumtemperatur (20 +/-2°C)
SD	Standardabweichung
SP	Substitutionspatient
TK	Tiefkühlschrank (-80°C)
VK	Variationskoeffizient
WADA	World Anti-Doping Agency
ZW	Zielwert

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Gamma-Glutamylzyklus.....	9
Abb. 2: Reaktionsschema der GGT-Bestimmung.....	9
Abb. 3: Reaktionsschema der LDH-Bestimmung	12
Abb. 4: Methodenentwicklung GGT. Wiederholungsmessungen	32
Abb. 5: GGT. Präzisionsprofil.....	33
Abb. 6: GGT. Bestimmung von Nachweis- und Leerwertgrenze	34
Abb. 7: GGT. Überprüfung der Linearität.....	37
Abb. 8: Methodenentwicklung LDH. Wiederholungsmessungen.....	38
Abb. 9: LDH. Präzisionsprofil.....	39
Abb. 10: LDH. Bestimmung von Nachweis- und Leerwertgrenze.....	41
Abb. 11: LDH. Überprüfung der Linearität.	44
Abb. 12: Urin-GGT. Lagerungsstabilität bei RT und im Kühlschrank (4-8°C). ..	46
Abb. 13: Urin-GGT Lagerungsstabilität bei -18°C und -80°C.....	47
Abb. 14: Urin-LDH Lagerungsstabilität bei RT und im Kühlschrank (4-8°C)...	48
Abb. 15: Urin-LDH Lagerungsstabilität bei -18°C und -80°C.	49
Abb. 16: GGT-Aktivität nach wiederholtem Einfrieren.	50
Abb. 17: LDH-Aktivität nach wiederholtem Einfrieren.....	51
Abb. 18: GGT-Bestimmung unter basischen und sauren Bedingungen	52
Abb. 19: LDH-Bestimmung unter basischen und sauren Bedingungen.....	54
Abb. 20: Urin-GGT Bestimmung der Referenzbereiche	56
Abb. 21: Urin-LDH Bestimmung der Referenzbereiche.....	57
Abb. 22: Korrelation Urin-GGT / Serum-GGT.....	58
Abb. 23: Korrelation Urin-LDH / Serum-LDH.....	59
Abb. 24: Enzymausscheidung über 3 Monate.....	60
Abb. 25: Urin-GGT unter verschiedener Lagerung (Normalpersonen).....	62
Abb. 26: Urin-GGT unter verschiedener Lagerung (Substitutionspatienten). ...	63
Abb. 27: Urin-LDH unter verschiedener Lagerung (Normalpersonen).....	64
Abb. 28: Urin-LDH unter verschiedener Lagerung (Substitutionspatienten).	65
Abb. 29: Cut-off für gefroren-gelagerte Urine (GGT, absolut).....	68
Abb. 30: Cut-off für gefroren gelagerte Urine (GGT, relative Restaktivität).	69
Abb. 31: Cut-off für gefroren gelagerte Urine (LDH, absolut).	70
Abb. 32: Cut-off für gefroren gelagerte Urine (LDH, relative Restaktivität).....	71
Abb. 33: Cut-off für tiefgefroren (-80°C) gelagerten Proben (LDH).....	72
Abb. 34: Klassifizierung aller Urinproben (frisch/gefroren, n= 200).	73
Abb. 35: Klassifizierung der Urine mit konkordanter Enzymaktivität (n=173). ..	77

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Verwendete Chemikalien	17
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien	17
Tab. 3: Verwendete Geräte	17
Tab. 4: Verwendete Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten	18
Tab. 5: Ansätze der enzymatisch-photometrischen Messverfahren	20
Tab. 6: Testcharakteristika der Serummethoden (Herstellerangaben)	21
Tab. 7: Materialien zur Bestimmung von Linearität, Präzision und Richtigkeit .	24
Tab. 8: Materialien zur Bestimmung der Nachweis- und Leerwertgrenzen	24
Tab. 9: Basische und angesäuerte Urine	28
Tab. 10: GGT Präzision über den Messbereich	32
Tab. 11: GGT Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.	35
Tab. 12: Ermittlung Unrichtigkeit, Unpräzision und QUAMM	36
Tab. 13: GGT Überprüfung der Linearität.....	37
Tab. 14: LDH Präzision über den Messbereich	39
Tab. 15: LDH Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.....	41
Tab. 16: LDH Ermittlung von Unrichtigkeit, Unpräzision und QUAMM	43
Tab. 17: LDH Überprüfung der Linearität.	44
Tab. 18: Alkalische Phosphatase Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	45
Tab. 19: Beschreibung des Referenzkollektivs.....	55
Tab. 20: Urin-GGT Trennleistung für frische/gefroren-gelagerte Proben.....	74
Tab. 21: Urin-LDH Trennleistung für frische/gefroren-gelagerte Proben.	74
Tab. 22: Trennleistung der Markerkombination GGT pos/LDH pos	75
Tab. 23: Trennleistung der Markerkombination GGT neg/LDH neg.	76
Tab. 24: Trennleistung der kombinierten Enzymbestimmungen	78
Tab. 25: Prädiktive Werte in Abhängigkeit von der Vortestwahrscheinlichkeit .	79
Tab. 26: Anwendungserprobung bei unbekanntem Urinen	80

1 EINLEITUNG

1.1 Drogenabhängigkeit und Substitutionsbehandlung

Durch Konsum und Abhängigkeit von illegalen Drogen wird das deutsche Gesundheitssystem vor erhebliche medizinische und gesundheitspolitische Herausforderungen gestellt. Die Gruppe der häufig gebrauchten illegalen Drogen umfasst nach dem Betäubungsmittelgesetz (BtMG) im wesentlichen Cannabis, Opioide, Cocain, Amphetamine, Metamphetamine und neue psychoaktive Stoffe.

Im Epidemiologischen Suchtsurvey 2018 wird die Ein-Jahres-Prävalenz für den nieder- bis höherfrequenten Gebrauch von Cannabis in Deutschland mit 7,1% (3,1 Mio. User), für die Gruppe der Amphetamine mit 1,2% (539 000 User), für Kokain/Crack und Ecstasy mit jeweils 1,1% und für Heroin und anderen Opiate zusammen mit 0,4% angegeben (Atzendorf et al. 2019).

Dabei hat insbesondere eine Opioidabhängigkeit weitreichende gesundheitliche und wirtschaftliche Folgen. 2019 starben nach Angaben des Bundeskriminalamts in Deutschland insgesamt 1398 Personen durch illegalen Drogenkonsums, 217 davon alleine auf Grund einer akuten Opiatvergiftung, weitere 433 durch polyvalente Vergiftung mit Opioiden in Verbindung mit anderen Stoffen (Bundeskriminalamt 2019).

Die derzeitige Anzahl von opioidabhängigen Personen in der Bundesrepublik wird auf rund 166.000 geschätzt und hält sich in den letzten 20 Jahren nahezu unverändert auf diesem Niveau (Kraus et al. 2019). Opiatabhängigkeit ist häufig vergesellschaftet mit dem Gebrauch weiterer Drogen und hat gegenüber der Gesamtbevölkerung eine um 5-10 mal höhere Mortalität durch akute Intoxikation, Unfälle oder Suizid. Darüber hinaus besteht bei Opiatabhängigen eine höhere Disposition für Infektionserkrankungen (HIV, Hepatitis) oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Hser et al. 2001; Arendt et al. 2011; Degenhardt et al. 2014a; Degenhardt et al. 2014b; Broz et al. 2014; Schuckit 2016).

Die Opioidabhängigkeit erfordert häufig eine lebenslange Behandlung. Therapie der Wahl ist die substanzgesteuerte Behandlung (Substitutionsbehandlung) kombiniert mit psychosozialen Begleitangeboten. Voraussetzungen für die Einleitung der Substitutionsbehandlung ist die Diagnose der Opioidabhängigkeit als chronische Erkrankung nach ICD (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) mit seit mindestens einem Jahr nachweisbaren körperlichen Abhängigkeitssymptomen.

Die Durchführung der Programme ist in der Verordnung über das Verschreiben, die Abgabe und den Nachweis des Verbleibs von Betäubungsmitteln (Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung - BtMVV) und im Betäubungsmittelgesetz (BtMG) gesetzlich geregelt und die Richtlinien der Substitutionsbehandlung sind von der Bundesärztekammer festgesetzt (Bundesärztekammer 2017).

Das deutsche Substitutionsregister zählt derzeit 79.700 Patienten (Stand 01.07.2019), die sich in einer laufenden Substitutionstherapie befinden (Bundesopiumstelle 2020). Derzeit werden 57% aller Opioidabhängigen in Deutschland mit Substitutionsmedikamenten behandelt (Kraus et al. 2019).

Häufig verwendete, zugelassene Substanzen der Opioidsubstitution sind Levomethadon, Methadon und Buprenorphin, deren Wirksamkeit und Sicherheit wissenschaftlich belegt wurden (Übersichten bei (Farrell et al. 1994; Connock et al. 2007; Clark et al. 2014; Wang et al. 2019). In begründeten Ausnahmefällen wird auch Codein, Dihydrocodein oder bei Schwerstabhängigen in Spezialambulanzen auch reines Heroin (Diamorphin) eingesetzt. Bei geeigneten Patienten kann die Substitution auch mit Langzeit-Präparaten durchgeführt werden (Soyka und Pogarell 2019).

In der Regel werden die Substitutionssubstanzen täglich vom Patienten direkt in der Praxis und unter Kontrolle in einer Form eingenommen, die sich nicht zur intravenösen Applikation eignet, beispielsweise in Saft gelöst. Seit 2017 können

die Substitutionssubstanzen unter bestimmten Voraussetzungen auch mit nach Hause genommen werden. Nach der Betäubungsmittelverschreibungsverordnung sind für diese Form der Behandlung jedoch besondere Kontrollmechanismen zur Sicherung des bestimmungsgemäßen Gebrauchs erforderlich (vgl. §5 Absatz 8 und 9 der BtMVV) (Bundesärztekammer 2017).

1.2 Kontrollen bei der Drogensubstitution

Wesentliches Element eines Substitutionsprogramms ist die Überwachung der Drogenabstinenz und des ordnungsgemäßen Gebrauchs des Substitutionsmittels durch Urinkontrollen (BtMVV §5 Absatz 12). Diese dienen der Erkennung von unerwünschten Nebenwirkungen und von missbräuchlichen Verwendungen des Substitutionsmittels (wie z.B. der Weitergabe auf den Schwarzmarkt), zur Überwachung der Adhärenz des Patienten im Behandlungsprogramm und zum Ausschluss des Beigebrauchs von anderen Drogen (Bleckwenn et al. 2016).

Die Häufigkeit der unangekündigten Verlaufs- und Beigebrauchskontrollen und die Kontaktdichte ist abhängig vom Behandlungsverlauf. So werden im aktuellen bayerischen Substitutionsleitfaden anfangs zwei bis vier Urinproben pro Monat empfohlen. Bei stabiler Substitution sind 2 oder 3 unangekündigte Urinproben pro Quartal ausreichend (Bayerische Akademie für Sucht- und Gesundheitsfragen 2018).

Ein Problem bei Urinkontrollen ist der Versuch der Probanden, die Urinprobe zu manipulieren, um einen falsch negativen Urinbefund vorzutäuschen. Darum werden die Proben bislang in der Regel unter Sicht in Gegenwart einer Aufsichtsperson abgegeben und nach Abgabe temperaturkontrolliert. Dieses Verfahren ist personalaufwendig und es wird diskutiert, ob die direkte Sichtkontrolle des Wasserlassens die Privatsphäre der Patienten verletzt und zu einer schlechteren Compliance führt. Die jetzigen Substitutionstherapien haben eine Abbruchrate von ca. 40% (Timko et al. 2016).

Gängige Strategien zur Manipulation und Täuschung bei der Probenabgabe sind die Einnahme oder Zugabe von Substanzen, welche die Analytik stören sollen, die unbemerkte Abgabe des drogenfreien Urins einer anderen Person, oder auch der Austausch des aktuellen Urins gegen mitgebrachten, eigenen Urin, der zuvor in einer früheren Phase der Abstinenz gewonnen und dann bis zur Kontrolluntersuchung zuhause als drogenfreier Urin weggefroren und gelagert wurde (Scholer 2004). Probleme bereitet dabei speziell die Überprüfung, ob es sich beim abgegebenen Urin um eine frisch gewonnene oder um eine zuvor eingefrorene Probe handelt. Durch Temperaturmessung soll gesichert werden, dass der Patient frischen, körperwarmen Urin abgibt. Unter Substitutionspatienten sind jedoch eine Anzahl von Strategien und Vorrichtungen bekannt. Eine Methode ist der unbemerkte Austausch, eine andere ist das Anwärmen des Urins während der Abgabe (Thevis et al. 2012; Fu 2016; Kluge et al. 2018).

1.3 Vorhandene Marker und Kontrollmechanismen bei Substitutionskontrolle

Mittlerweile existieren eine Vielzahl von gut etablierten Prozeduren und Labormethoden, viele davon für die Dopingkontrolle von Sportlern entwickelt, um Täuschungen und Verfälschungen bei der Abgabe von Urinproben auszuschließen.

So geben bereits einfache Untersuchungen des Urin-pHs oder der Urinkonzentration in vielen Fällen Hinweise auf eine unphysiologisch veränderte Probe, beispielsweise durch Verdünnung oder den Zusatz von Säuren oder Basen.

Die Beimengung oder die Einnahme von Störsubstanzen, darunter häufig Medikamente wie z.B. Diuretika, Probenecid oder 5-alpha-Reduktase-Hemmer (Ventura and Segura 2010) können analytisch mittels LC-MS oder GC-MS eindeutig nachgewiesen werden. Dazu wird der Urin (entweder routinemäßig, oder auch nur bei besonderem Verdacht) in einem „general unknown screening auf exogene Substanzen“ nach gas-chromatographischer (GC)- oder flüssigkeits-chromatographischer (LC)-Auftrennung mittels Massenspektrometrie

(MS) auf das Vorliegen von exogenen Substanzen analysiert. Die Substanzbibliotheken dieser Verfahren enthalten die Spektren von jeweils mehreren tausend Medikamenten, Drogen und anderen Substanzen, die bei Vorliegen eindeutig nachgewiesen und identifiziert werden. Durch ständige Erweiterung und Aktualisierung der Spektrenbibliotheken wird erreicht, dass auch neue, bislang wenig bekannte Substanzen nachweisbar werden (Meyer and Maurer 2016; Pasin et al. 2017).

Zur Identitätssicherung der Probe wurden eine Reihe von individual-charakteristischen Markern entwickelt, die sicherstellen, dass der Urin auch von der betreffenden Person stammt. Eine Möglichkeit ist die Anlage von individuellen Steroid-Ausscheidungsprofilen, die mit weiteren laborchemischen oder hämatologischen Markern zu einem „biologischen Passport“ kombiniert werden (Thevis et al. 2007; Vernec 2014). Diese für jedes Individuum charakteristische Konstellation wird gespeichert und bei jeder Folgeuntersuchung erneut untersucht und verglichen. Breite Verwendung findet dies u.a. bei Dopingkontrollen der World Anti-Doping Agency (WADA) als Athlete Biological Passport (ABP) (World Anti-Doping Agency 2019).

Alternativ kann die Probenidentität durch eine DNA-Analyse sichergestellt werden. Dabei wird die DNA aus Zellen in der Urinprobe analysiert und mit einem abgespeicherten Wangenabstrich des Probanden verglichen. Bei diesem Verfahren muss die DNA-Analyse rasch nach der Probengewinnung erfolgen, da die mit dem Urin ausgeschiedenen Zellen bei Transport und Lagerung der Probe lysieren und die Isolation von DNA dann erheblich erschwert wird.

Die bislang genannten Verfahren können den Tausch von Urin zwischen Personen aufdecken, erkennen aber nicht, ob ein Urin derselben Person vorliegt, der zu einem anderen Zeitpunkt z.B. in einer Phase ohne Beikonsum gesammelt und dann aufbewahrt wurde.

Eine Kombination aus Überprüfung, ob der Urin frisch gesammelt wurde, und Identitätssicherung ist im Ruma-Marker-System realisiert (Huppertz et al. 2004). In diesem System wird dem Substitutionspatienten vor der Urinabgabe ein charakteristischer „chemischer Code“ zugeführt. Dieser besteht aus Polyethylenglykol (PEG)-Molekülen unterschiedlicher Kettenlänge, die jeweils für den betreffenden Patienten individuell zusammengestellt sind. Diese Moleküle werden unverändert im Urin ausgeschieden und dann eindeutig chromatographisch nachgewiesen und wieder dem Patienten zugeordnet (Elbe et al. 2016). Das Auflösungsvermögen und die Zahl der möglichen Kombinationen ist in diesem System jedoch begrenzt und erfordert in großen Substitutionsprogrammen einigen organisatorischen Aufwand.

Durch die vorgenannten Verfahren ist sichergestellt, dass die Urinprobe personalisiert werden kann. Bislang existiert jedoch noch keine einfach zugängliche Methode, mit der nachträglich im Labor geprüft werden kann, ob die vorliegende Probe am Kontrolltag tatsächlich direkt am Patienten und frisch abgenommen wurde, oder nicht doch vom Probanden in den Wochen zuvor in einem „cleanen“ Intervall gewonnen und dann bis zur Abgabe gelagert und dem Kontrolleur in Täuschungsabsicht untergeschoben wurde. Dabei muss die Lagerung des Urins zwangsläufig gefroren erfolgen, da eine ungefroren gelagerte Urinprobe selbst bei Kühlschranktemperatur bereits nach ein bis zwei Wochen durch bakterielle Überwucherung zwangsläufig geruchlich und optisch stark verändert und leicht erkennbar wird. Die Kontrollintervalle der Substitutionsprogramme und die Halbwertszeit der im Drogenscreening abgeprüften Substanzgruppen erfordern zwangsläufig diese längeren Lagerzeiten im Bereich von Wochen oder Monaten.

Potentielle Urin-Marker, die zur Beurteilung der Fragestellung, ob eine im Labor eingegangene Urinprobe zuvor über den genannten Zeitraum gefroren gelagert war, sollten folgende Anforderungen erfüllen:

- sie sollten prinzipiell im Urin in einem Konzentrationsbereich vorkommen, der der üblichen klinisch-chemischen Diagnostik zugänglich ist und die Einzelwerte aller nierengesunder Individuen sollten in einem gut messbaren Bereich liegen.
- im klinisch-chemischen Routinelabor sollten etablierte Nachweismethoden für den Marker bereits verfügbar sein und sich dort mit akzeptablem Aufwand für das Probenmaterial Urin etablieren lassen. Zumindest sollte der Marker für die im Routinelabor verfügbaren Methoden wie Photometrie, Immunoassay, Nephelometrie o.a. zugänglich sein, um routinegängige Messverfahren zu entwickeln.
- die Urinausscheidung des Analyten sollte bei Nierengesunden intraindividuell ausreichend konstant und ausreichend unabhängig von unterschiedlichen physiologischen Zuständen und Einflussfaktoren wie Tageszeit, Hydratationszustand, Ernährung, Urin-pH sein, so dass der Analyt in allen eingehenden Proben sicher nachweisbar ist.
- im Idealfall sollte der Analyt ein individual spezifischen Ausscheidungsniveau oder -muster aufweisen.
- der Marker sollte günstige präanalytische Eigenschaften haben. Insbesondere sollte er eine ausreichende Probenstabilität im Standardmaterial von Substitutionspatienten (bei Raumtemperatur eingesandter Nativ-Urin) über die typische Transportzeit und Bearbeitungszeit von 1-2 Tagen aufweisen. Auch sollte der Marker unter den typischen Einflüssen im Labor (Lagerung bei Kühlschranktemperatur, bakt. Überwucherung) und beim Messvorgang für maximal bis zu fünf Tagen keine signifikante Konzentrations- oder Aktivitätsveränderungen aufzeigen.
- als wesentliche Eigenschaft sollte der Marker anzeigen, ob die Probe zuvor gefroren gelagert wurde. Er sollte also den Einfriervorgang oder die Lagerung im gefrorenen Zustand durch eine ausreichend große und regelhafte Konzentrations- oder Aktivitätsveränderung anzeigen.

- die Messmethode selbst muss dann für den Marker auch in der Probenmatrix Urin ausreichend gute Leistungsdaten aufweisen, um die Lagerungseffekte sicher von physiologischen Schwankungen und der physiologischen Streuung der Werte abzugrenzen.

Bei Durchsicht der Literatur zu den bislang aus Urin bestimmten Substraten und Enzymen zeigt sich, dass die Gruppe der im Urin in nennenswerter Konzentration nachweisbaren Enzyme Gamma-Glutamyltransferase (GGT), L-Lactatdehydrogenase (LDH) und Alkalische Phosphatase (AP) viele dieser Kriterien (Matteucci et al. 1991; Zafirovska et al. 1993) erfüllen könnte. Insbesondere GGT und LDH wurden in der vorliegenden Arbeit überprüft.

1.4 GGT als möglicher Marker

Die Gamma-Glutamyl-Transferase/Transpeptidase (GGT, E.C.2.3.2.2) katalysiert einen wichtigen Zwischenschritt im Glutathion-Stoffwechsel und im Gamma-Glutamyl-Zyklus (Abb. 1). GGT überträgt Gamma-Glutamylgruppen von reduziertem Glutathion auf Aminosäuren oder Peptide (Meister et al. 1981; Welbourne and Dass 1982). Das Enzym ist membranständig lokalisiert und kommt hauptsächlich in der Leber, im Pankreas, im Darm, in der Milz, auf Lymphozyten, in hoher Aktivität in Nierengewebe und insbesondere an der Membran der Microvilli im proximalen Tubulus der Niere vor (Pfaller et al. 1984). Die Gamma-Glutamylierung an den Brush-border Membranbereichen der proximalen Nierentubuli ist wichtig für den aktiven Transport von Aminosäuren über die Zellmembran, dient der aktiven Rückresorption von glomerulär frei filtrierte Aminosäuren und Peptiden aus dem Primärharn und reguliert den intrazellulären Glutathionspiegel der Nierenzellen.

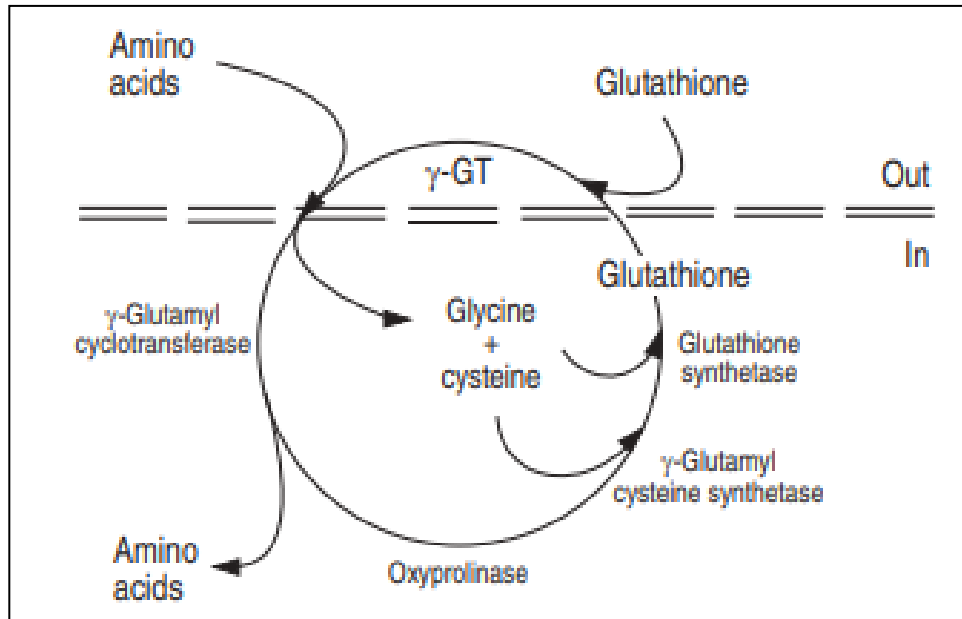


Abb. 1: Gamma-Glutamylzyklus zum aktiven Transport von Aminosäuren über die Zellmembran (aus (van Klaveren et al. 1997).

Zur Aktivitätsbestimmung wird die IFCC-Methode von Shaw et.al. (Shaw et al. 1983) verwendet. Dabei wird der gamma-Glutamylrest eines synthetischen Substrats (L-γ-Glutamy-3-Corboxy-4-Nitoanilid) auf Glycylglycin übertragen (Abb. 2). Das freigesetzte farbige Produkt hat ein Extinktionsmaximum bei 400 nm. Die Reaktionsrate wird photometrisch aus der Bildung des Produkts und der Extinktionszunahme bei 410/478 nm bestimmt.

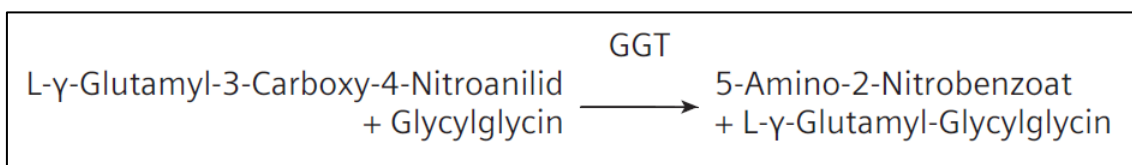


Abb. 2: Reaktionsschema der GGT-Aktivitätsbestimmung (aus (Siemens 2017d).

Die GGT-Bestimmung im Serum stellt einen laborchemischen Routineparameter bei der Diagnostik von Leber und Gallenblasen-Erkrankungen dar (Whitfield 2001). Erhöhungen werden auch bei chronischem Alkoholmissbrauch beobachtet (Conigrave et al. 2002; Jastrzębska et al. 2016).

In der Niere ist die GGT größtenteils auf der äußeren Mikrovilli-Membran (renale Brush-border Membran) der proximalen Tubuluszellen lokalisiert. Aufgrund dieser Lokalisation wird die renale GGT den renalen Brush-border Enzymen zugerechnet und über den ausgeschiedenen Urin sezerniert (Albert et al. 1961; Scherberich et al. 1974; Horiuchi et al. 1978; Tate und Meister 1985). Die Bestimmung von GGT im Urin gilt als sensibler Marker für tubuläre Schäden bei akuter Nierenschädigung (Scherberich 1990; Westhuyzen et al. 2003; Santos et al. 2010).

Eine ganze Reihe von Untersuchungen weist auf einen möglichen diagnostischen Nutzen der Urin-GGT-Bestimmung hin. In Untersuchungen bei Hunden und Katzen zeigen die Urin Konzentrationen von GGT und von AP eine gute Korrelation zu einem proximalen tubulären Schaden (Clemon 1998; Cobrin et al. 2013; Lippi et al. 2018).

Bei Langzeiteinnahme von NSAIDs (Nicht-steroidalen anti-inflammatorischen drugs) lassen sich die nierentoxischen Nebenwirkungen gut anhand der Bestimmung der GGT-Aktivität im Urin überwachen (Zafirovska et al. 1993). Die akuten, nephrotoxischen Folgen von Paracetamol bei Ratten können auch anhand der GGT, AP und LDH Aktivität im Urin kostengünstig und schnell abgeschätzt werden (da Silva Melo, DA et al. 2006) .

Die GGT Aktivität im Urin wird durch eine Schwangerschaft nicht signifikant beeinflusst und kann als Parameter auf eine subklinische Nierenfunktionsstörung während der Schwangerschaft hinweisen (Jacob and Balasubramaniam 2006) . Eine erhöhte GGT-Aktivität im Urin innerhalb von drei Monaten nach Nierentransplantation korreliert mit Transplantatversagen (Kwiatkowska et al. 2014).

Als früher Marker der Gentamicin-verursachten akuten tubulären Nekrose ist die Erhöhung der GGT im Urin den etablierten Parametern, wie dem Serumkreatinin, der Kreatininclearance, dem Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN), dem spezifischen Uringewicht und der Proteinausscheidung im Urin überlegen (Rivers et al. 1996; Whiting and Brown 1996). Auch beim nephrotischen Syndrom ist ein GGT Anstieg im Urin beobachtet worden, der reversibel ist (Rambabu et al. 1988). De Carvalho et al. haben die GGT Urinausscheidung als potentiellen Marker zur

Früherkennung einer diabetischen Nephropathie beschrieben (De Carvalho, José A M et al. 2011).

Eine wesentliche Einschränkung für die klinische Nutzung der Urin-GGT-Bestimmung ist die fehlende hohe Spezifität zum Ausschluss von Nierenerkrankungen. Unspezifisch erhöhte Werte finden sich in Untersuchungen an Tieren und Menschen. Crivellenti et al. beschrieb dies bei Hunden, die mit einer nicht nierenschädlichen Substanz vergiftet wurden (Crivellenti et al. 2014). Westhuyzen et al. weisen darauf hin, dass auch beim Menschen eine erhöhte Urin-GGT ohne nephrotoxische Schädigung zu finden ist (Westhuyzen et al. 2003).

Nach Literaturangaben nimmt die Aktivität der GGT nach Gefrierlagerung bei -18 bis -20°C kontinuierlich ab (Matteucci et al. 1991; Ilchyshyn et al. 2019). Diese Eigenschaft macht die GGT zum geeigneten Kandidaten für die Fragestellung der vorliegenden Untersuchung.

1.5 LDH als möglicher Marker

L-Laktatdehydrogenase (E.C.1.1.1.27, LDH) ist als Tetramer aufgebaut, das sich gewebespezifisch aus zwei verschiedenen Polypeptidketten zusammensetzt. Daraus ergeben sich 5 verschiedene LDH-Isoenzyme mit spezifischer Gewebeverteilung. Intrazellulär ist LDH im Zytosol lokalisiert und kommt ubiquitär in allen Geweben vor. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat unter Verwendung von NAD^+ als H^+ -Akzeptor (NAD^+ -Oxidoreduktase). Diese Reaktion ist reversibel und läuft physiologisch je nach Stoffwechselsituation entweder in Richtung zum Laktat (letzter Schritt der Glycolyse unter anaeroben Bedingungen) oder in Richtung zum Pyruvat (bei Muskelkontraktion gebildetes Laktat wird unter Bildung von $\text{NADH}+\text{H}^+$ wieder zu Pyruvat oxidiert) (Adams et al. 1973; Schär and Zuber 1979).

Die Aktivitätsbestimmung der LDH erfolgt nach der Methode von Morgenstern et al. mit entsprechend dem nachfolgenden Reaktionsschema (Abb. 3). Die enzymatische Aktivität der LDH ist dabei proportional zur Menge des gebildeten $\text{NADH} + \text{H}^+$ und dem Extinktionsanstieg bei 340/410 nm. Die Methode ist gut auf die IFCC-Referenzmethode rückführbar.

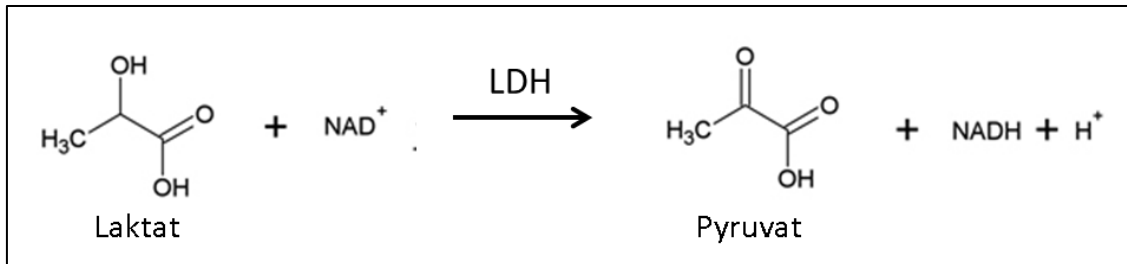


Abb. 3: Reaktionsschema der LDH-Bestimmung

Die im Serum messbare LDH stammt ganz überwiegend aus der Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur, Leukozyten und Erythrozyten. Eine erhöhte LDH zeigt Gewebeschädigung und Zellyse an. Aufgrund der fehlenden Organspezifität erfordert die Interpretation von mäßig erhöhter Serum-LDH weitere Zusatzinformationen. Stark erhöhte Werte weisen aufgrund der überwiegenden Muskelmasse auf eine muskuläre Schädigung oder auf massiven Zellzerfall hin, wie er bei Tumoren, massiven Hämolyse und massiven Gewebeschädigungen zu finden ist. Wesentliche Indikationen zur LDH-Bestimmung sind die Abklärung von Hämolyse und Anämie oder die Verlaufskontrolle von Muskelerkrankungen, von Tumoren und von hämatologischen Erkrankungen (Huijgen et al. 1997).

In der Niere kommt die LDH vor allem an den distalen Tubuluszellen vor. Eine Erhöhung der LDH in Urin weist auf eine renal tubuläre Schädigung hin und wird als früher und sensitiver aber ätiologisch unspezifischer Marker einer Nierenschädigung diskutiert (Plummer et al. 1979). Die Urin-LDH-Aktivität kann als Marker für arzneimittelassoziierte Nephrotoxizität verwendet werden. Nach Injektion von Nephrotoxin bei Ratten, das Schäden am proximalen Tubulus verursacht, stieg die LDH Urinausscheidung exorbitant an. Dieser LDH-Nachweis ist jedoch nicht spezifisch für die Ursache der Schädigung (Harauchi and Yoshizaki 1990).

Insgesamt hat sich bisher eine klinische Nutzung von LDH-Messungen im Urin nicht durchgesetzt. Dazu ist die LDH-Aktivität im Vergleich zum Serum zu niedrig, und die Variabilität der Werte schon bei gesunden Personen zu hoch. Dies gilt gleichermaßen im Langzeitverlauf innerhalb eines Individuums (intraindividuelle Tag zu Tag Variabilität) als auch zwischen gesunden Personen (interindividuelle Streuung der Werte).

Dennoch hat die Urin-LDH die für die vorliegende Untersuchung günstige Eigenschaft, dass die Enzymaktivität nach Gefrierlagerung rasch und zuverlässig abnimmt: Matteuci et al. untersuchten die LDH Aktivität bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen und beschreiben einen dramatischen Abfall der Aktivität nach Lagerung unter -20 und auch unter -70°C über einen Monat (Matteucci et al. 1991).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines einfachen Laborverfahrens, mit dem eine Aussage gemacht werden kann, ob die im Labor vorliegende Urinprobe zuvor gefroren gelagert wurde.

Dazu sollen als erstes Messverfahren für die Aktivitätsmessung von GGT und LDH im Urin etabliert und validiert werden. Dabei soll auch der Einfluss möglicher Interferenzen (mehrere Einfrierzyklen, veränderter Urin-pHs) auf die Messverfahren überprüft werden. Mit den validierten Verfahren sind die Wertelagen und Verteilungen der Enzymaktivitäten für frischen Nativurin an einem Referenzkollektiv zu erheben und mit einem vergleichbaren Kollektiv von Substitutionspatienten zu vergleichen.

Danach soll die Lagerungsstabilität und der zeitliche Verlauf der Enzymaktivitäten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen und Temperaturen erhoben werden. Aus dem Aktivitätsverlauf sollen geeignete Untersuchungszeitpunkte und Entscheidungsgrenzen zur Abgrenzung der Lagerungszustände abgeleitet werden.

Die validierten Verfahren sollen dann auf gesplittete Proben (zwei Lagerungszustände: frisch vs. Gefrierlagerung) angewandt werden, um Entscheidungsgrenzen und einen Algorithmus für die Abtrennung beider Gruppen durch die Enzymmessung zu erheben.

Abschließend soll die Aussagekraft des Verfahrens für unterschiedliche Untersuchungssituationen modelliert und optimiert und durch Anwendung auf verblindete Laborproben überprüft werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

Die laborchemischen Analysen und Versuche für diese Arbeit wurden im Zeitraum von August 2019 bis Januar 2020 im Einsendelabor MVZ Synlab Leinfelden durchgeführt. Der Prüfplan zur vorliegenden Arbeit wurde der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen und des Universitätsklinikums Tübingen zur Begutachtung vorgelegt und wurde unter der Projekt-Nummer 590/2019BO1 genehmigt. Alle für diese Arbeit benutzten Urinproben von Patienten wurden anonymisiert, neu codiert und können nicht mehr auf eine Person zurückgeführt werden.

2.1 Untersuchungsmaterialien

Die Validierung der Messverfahren wurde mit Qualitätskontrollmaterialien durchgeführt, die auf die entsprechenden Verdünnungen gebracht wurden. Die weiteren Versuchsteile erfolgten mit den Urinen freiwilliger Probanden und mit anonymisierten Proben aus dem Routineeingang des Labors.

2.2 Patientenproben

Verwendet wurden jeweils überzählige 10 ml Urin-Monovetten und Serumproben aus dem Routineeingang des MVZ Leinfelden. Die benutzten Proben wurden im Probeneingang von den ursprünglichen Auftragsdaten vollständig getrennt, anonymisiert und für die Verarbeitung und Bestimmung neu codiert.

2.2.1 Referenzkollektiv (50 Normalpersonen)

Das Referenzkollektiv setzt sich aus 50 augenscheinlich nierengesunden Personen (23 Männer, 27 Frauen, im Alter von 21 bis 82 Jahren) aus dem Routineeingang des Labors zusammen. Die Proben stammen aus Routineuntersuchungsprogrammen von Betriebs- und Hausärzten, bei denen überzählige Urinmonovetten als Zusatzproben anfielen. Diese wurden nach Probeneingang von den ursprünglichen Auftragsdaten getrennt und unter neuen

Barcodes gemessen. Ausschlusskriterien waren: laborchemischer Hinweis auf Nierenerkrankung (Serum-Kreatinin: Männer > 1,1 mg/dl, Frauen > 0,8 mg/dl), Alter ≤ 18 Jahre und sehr niedriger Kreatinin-Messwert (< 0,20 mg/l) in der Urinprobe.

2.2.2 Untersuchungskollektiv (50 Substitutionspatienten)

Das Substitutionskollektiv bestand aus 50 Patienten aus Methadon- oder Buprenorphin-Substitutionsprogrammen. Die Proben wurden in der Substitutionspraxis nach dem Standardprotokoll des Überwachungsprogramms unter Sicht abgegeben und bereits dort anonymisiert. Dazu wurden an den Abgabetafeln durch Mitarbeiterinnen der Praxis von mehreren Probanden jeweils eine zusätzliche, unbeschriftete und nur für den Studienzweck vorgesehene, 10 ml Urin-Monovette aus dem im Überschuss in Urinbechern vorliegenden Urin gewonnen und jeweils in einer separaten Tüte ohne Angabe von personenbezogenen Daten und ausschließlich für den Studienzweck eingesandt. Aus diesem Grund können keine biometrischen Angaben über das Kollektiv der Substitutionspatienten gemacht werden.

Ausschlusskriterien waren laborchemische Hinweise auf Nierenerkrankungen (Serum-Kreatinin: Männer > 1,1 mg/dl, Frauen > 0,8 mg/dl), Alter ≤ 18 Jahre und sehr niedriger Kreatinin-Messwert (< 0,20 mg/l) in der Urinprobe. Urine dieser Wertelage werden auch im üblichen Drogenscreening von der weiteren Analytik ausgeschlossen, da hier der Verdacht auf Verfälschung durch absichtliche Verdünnung besteht.

2.3 Gebrauchsgegenstände und Laborausstattung

Alle Untersuchungen wurden im Labor Synlab Leinfelden unter der Nutzung der dortigen Laborausstattung durchgeführt. Das Labor ist DAkkS-akkreditiert (Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH) und verwendet soweit als möglich qualitätskontrollierte Geräte, Verfahren und Routineprozeduren nach den einschlägigen Vorgaben (DAkkS, RiliBÄK (Richtlinien der Bundesärztekammer), ISO (Internationale Organisation für Normung) 15189).

2.3.1 Allgemeine Chemikalien

Tab. 1: Verwendete Chemikalien

Natriumcarbonat, wasserfrei (CAS 497-19-8), Sigma Aldrich Bestellnr. 222321
Ascorbinsäure (CAS 50-81-7), Sigma Aldrich Bestellnr. A92902
Qualitätskontrolle Bio-Rad Multiquel Liquid Assayed Level 2, Ref.Nr. 4737-04, Lot-Nr. 45812, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA
Qualitätskontrolle Bio-Rad Multiquel Liquid Assayed Level 3. Ref.Nr. 4738-04, Lot.-Nr. 45813, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA)

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Probenröhrchen 5ml, 75x13mm, Sarstedt AG & Co. KG, REF 55.475
Eppendorf Pipetten 1,10,50,100-1000µl (verstellbar) mit Aufsätzen
Urin-Monovetten 10ml REF 10.252 Sarstedt AG & Co. KG

2.3.3 Geräte

Tab. 3: Verwendete Geräte

Atellica Solutions Automatenstraße mit Sample-Manager-Modul (Siemens-Systemnummer SP00590) und Siemens Atellica CH-Mess-Modul (Siemens-Systemnummer CH0740) mit bidirektionaler Anbindung an die Labor EDV
Kühlkammer mit Temperatur-Logger
Wasserbad Sonorex RK100
Mischer Reamix 2789
Zentrifuge Hettich mit verschiedenen Einsätzen

2.3.4 EDV-Software

Labor-EDV MOLIS (Compu Group Medical CGM, Deutschland)

Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)

Statistikpaket Analyse-It V.5.11 als Excel Plug-In (Analyse-It Software, Leeds, Großbritannien)

Cloud basiertes Statistikpaket ValidationManager V.65.11 (FinBiosoft, Espoo, Finnland)

2.4 Laborchemische Analysen

Alle laborchemischen Analysen wurden im Labor Synlab Leinfelden durchgeführt. Die Bestimmung der Serummesswerte und die Bestimmung von Kreatinin und pH-Wert im Urin erfolgte mit den nachgenannten Routineverfahren und Geräten des Labors. Die Qualitätssicherung von Verfahren und Geräten erfolgte durch interne und externe Qualitätskontrollen entsprechend den einschlägigen Vorgaben (RiliBÄK, DAkkS, ISO 15189).

Tab. 4: Verwendete Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten

Test	Anwendung auf:
Atellica CH Gamma-Glutamyl Transferase (GGT) Assay, Ref. 11097597, Siemens Healthcare, Tarrytown, NY, USA (Siemens 2017d)	Urin- / Serumproben
Atellica CH Lactate Dehydrogenase L-P (LDLP) Assay, Ref. 11097594, Siemens Healthcare, Tarrytown, NY, USA (Siemens 2017c)	Urin- / Serumproben
Atellica CH Atellica CH Alkaline Phosphatase (ALP_2c) Assay, Ref. 11097600, Siemens Healthcare, Tarrytown, NY, USA (Siemens 2017a)	Urin- / Serumproben
Atellica CH Enzymatic Creatinine_2 (ECre_2) Assay, Ref. 11097533, Siemens Healthcare, Tarrytown, NY, USA (Siemens 2017b)	Serumproben
Atellica CH Enzymatic Creatinine_2 (ECre_2_Urine) Assay,	Urinproben

Ref. 11097590, Siemens Healthcare, Tarrytown, NY, USA (Siemens 2017b)	
Atellica CH pH-Validitätstest (SVTPH), Ref. 10490245, Siemens Healthcare, Tarrytown, NY, USA (Siemens 2012)	Urinproben

Die Bestimmungen von GGT und LDH aus Urin erfolgten mit den entsprechenden unmodifizierten Serumverfahren und wurden über dieselben Qualitätskontrollen und Kontrollprozeduren kontrolliert wie das vom Hersteller validierte Messverfahren für Serumproben. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass sich die analytische Leistungsfähigkeit, insbesondere im für Urinmessungen relevanten niedrigen Aktivitätsbereich, durch Modifikation der Verfahrensparameter (wie Analyt-, Reagenz- und Küvettenvolumina, Inkubations- oder Messzeiten) nicht weiter steigern ließ. Die Bestimmungen aus Urin oder Serum erfolgten jeweils im gleichen Messkanal. Zur Anwendung der Serumverfahren auf Urinproben mussten in der Software der Geräte und der Labor-EDV jeweils spezifische Verfahrenskürzel angelegt werden.

Alle enzymatisch-photometrischen Testansätze wurden aus 1:5 vorverdünnter Probe (Vorverdünnung 50µl Primärprobe (Urin, Serum) + 200µl CH-Diluent im Atellica-CH-Modul) durchgeführt. Für die Kreatinin-Bestimmung im Urin wurde die Urinprobe höher vorverdünnt (5µl Urin + 245µl CH Diluent). Im Atellica CH Modul wurden die Tests wie folgt durchgeführt:

Tab. 5: Testansätze der enzymatisch-photometrischen Messverfahren

GGT (Urin, Serum)	
80µl Reagenz 1 +10µl vorverdünnte Probe +80µl Reagenz 2 Inkubation bei 37°C Kinetische Messung bei 410/478 nm Testdauer 10 min	Methode von Shaw, LM et.al. (Shaw et al. 1983) Extinktionszunahme durch Freisetzung des Chromophors ANB (für Einzelheiten s. Text).
LDH (Urin, Serum)	
80µl Reagenz 1 +14µl vorverdünnte Probe +32µl Reagenz 2 Inkubation bei 37°C Zweipunktmessung bei 340/410 nm Testdauer 9 min	Für die Automatisierung modifizierte Methode nach Amador, Dorfman und Wacker (Amador et al. 1963) Extinktionszunahme durch Bildung von NADH
AP (Urin, Serum)	
26,9µl Reagenz 1 +53µl Systemwasser +10µl vorverdünnte Probe +17µl Reagenz 2 Inkubation bei 37°C Zweipunktmessung bei 310/478 nm Testdauer 8 min	Für die Automatisierung modifizierte Methode nach IFCC (Bowers and McComb 1966; Schumann et al. 2011) Extinktionszunahme durch Bildung des Chromophors p-NB (für Einzelheiten s. Text).
Kreatinin (Urin, Serum)	
80µl Reagenz 1 +13µl vorverd. Probe (Serum1:5, Urin 1:50) +27µl Reagenz 2 Inkubation bei 37°C Zweipunktmessung bei 596/694 nm Testdauer 10 min	Enzymatische Bestimmung nach der Methode von Fossati, Prencipe und Berti (Fossati et al. 1983) Extinktionszunahme durch Bildung eines Chromophors (für Einzelheiten s. Text).
pH-Bestimmung im Urin	
Photometrische Bestimmung (596nm) mit einem Indikatorgemisch (Thymolblau, Bromphenolblau, Bromkresolpurpur, m-Kresolpurpur) durch Vergleich mit 5 pH-Kalibratoren (Siemens 2012)	

2.4.1 Vorbereitung und Messung der Proben

Nach Abgabe des morgendlichen Mittelstrahlurins in der Praxis gingen die Urinproben im Lauf des Vormittags im Labor ein und wurden noch am Abgabetag entsprechend den Versuchsbedingungen verarbeitet. Die 10ml Urin Monovetten wurden anonymisiert und in 0,5 ml Aliquots portioniert. Diese wurden je nach Versuchsbedingung gemessen oder gelagert. Vor Aktivitätsmessungen wurden die Proben ggfs. aufgetaut und mit Hilfe einer Rüttelplatte gut gemischt. Gemessen wurde auf dem Gerätesystem Atellica CH Analyzer (Siemens Healthineers, Deutschland) mit automatischer Probenzufuhr (Atellica Solution). Dieses System ermöglicht eine parallele automatisierte klinisch-chemische Analyse aller 4 Parameter (GGT, LDH, pH-Wert, Kreatinin) im Urin und die Übertragung und Verarbeitung der Resultate in das Labor-EDV-System MOLIS. Dazu mussten die Urin-Messverfahren für GGT und LDH in der Software der Atellica und im Labor-EDV System als eigene Messkanäle definiert werden. Die eigentliche Messung erfolgte jedoch mit den Reagenzien, den Qualitätskontrollen und in den unveränderten Messkanälen der Serumverfahren. Die komplette Messung der vier Parameter dauert ca. 10 Minuten im Routinebetrieb. Stark verdünnte Urine (absolute Urin-Kreatinin Konzentration < 0.20 g/l) wurden aus der weiteren Analytik ausgeschlossen. Die Enzymaktivitäten wurden auf Urin-Kreatinin bezogen und in der Einheit U/g Krea ausgegeben, um den Einfluss von stark schwankenden Urinkonzentrationen auszugleichen.

Die Testcharakteristika der Verfahren für die vom Hersteller validierten Materialien sind in Tab. 6 zusammengefasst:

Tab. 6: Testcharakteristika der Serummethoden nach Herstellerangabe

	GGT	LDH	Kreatinin
	Siemens Atellica GGT Assay	Siemens Atellica LD L-P Assay	Siemens Atellica ECre_2 Assay
validiert für:	S, P	S, P	S, P, U
Probenmenge:	10 µl	14 µl	13 µl
Referenzintervall	M ≤ 73 U/l	M/F: 120 - 246 U/l	M 0,6 - 1,1 mg/dl

(Serum)	F \leq 38 U/l		F 0,5 - 0,8 mg/dl
Messbereich:	7 - 1200 U/l	20 - 4200 U/l	S: 0,1 - 30,0 mg/dl U: 1,0 - 245 mg/dl
Nachweisgrenze (LoD)	< 7 U/l	< 20 U/l	Serum \leq 0,1 mg/dl Urin \leq 1,0 mg/dl
Unpräzisionen (VK%):	0,1 - 2,6%	0,3 - 3,8%	0,3 - 2,5%

2.4.2 Messmethode GGT

Bei der GGT-Aktivitätsmessung mit dem Atellica CH Analyzer (Siemens Healthineers, Deutschland) handelt es sich um eine quantitative Bestimmung der GGT-Aktivität im Humanserum und -plasma mittels photometrischer Extinktionsmessung. Die Analyse beruht auf einem Verfahren nach L.M. Shaw et al. (Shaw et al. 1983). Das synthetische Substrat L- γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid reagiert mit Glycylglycin zu 5-Amino-2-Nitrobenzoat (ANB) und L- γ -Glutamyl-Glycylglycin (GGG). GGG hat ein Extinktions-Maximum bei 400 nm. Die Reaktionsrate wird bei 410/478nm als Kinetik nullter Ordnung photometrisch gemessen.

2.4.3 Messmethode LDH

Die LDH Aktivität wird mit dem Atellica CH Analyzer (Siemens Healthineers, Deutschland) mittels einer photometrischen Extinktionsmessung quantitativ im Humanserum und -plasma bestimmt. Das Verfahren Atellica CH Lactate Dehydrogenase L-P (LDLP) beruht auf der Methode von Amador, Dorfman und Wacker (Amador et al. 1963). Die LDH katalysiert die Umwandlung von L-Laktat zu Pyruvat im Beisein von Nikotinamid-Adeninnukleotid (NAD). Je höher die LDH-Aktivität, desto mehr reduziertes NAD (NADH) wird gebildet. Die Menge des NADH wird mit einem Extinktionsanstieg bei 340/410 nm gemessen.

2.4.4 Messmethode Kreatinin im Urin

Kreatinin in Serum und Urin wird mit dem Atellica CH Enzymatic Enzyme_2 (Siemens Healthineers, Deutschland) Assay gemessen. Der Test beruht auf der enzymatischen Reaktion nach Fossati, Prencipe und Berti (Fossati et al. 1983). Aus Kreatinin, das von der Kreatininkinase in Kreatin umgewandelt und hydrolysiert wird, bildet sich Sarkosin. Dieses wird durch die Sarkosinoxidase in Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid aufgespalten. Mit Wasserstoffperoxid erzeugt die Peroxidase in Anwesenheit von N-3-methoxy-5-methylalanin und 4-Aminotranthypyrin in einer quantitativen Kondensationsreaktion ein blaues Pigment. Durch Messung der Extinktion der blauen Farbe bei 596/694 nm wird die Kreatininkonzentration quantitativ bestimmt, die Extinktion ist proportional zur Kreatininkonzentration.

2.4.5 Messmethode pH im Urin

Der pH-Wert des Urins im Bereich von pH 2,0 bis 12,0 wird mit dem Syva pH Validity Test (Siemens Healthineers, Deutschland) auf dem Atellica CH-Modul bestimmt. Das Probenmaterial wird mit vier Indikatorsubstanzen (Thymolblau (2,8 µg/mL), Bromphenolblau (4,1 µg/mL), Bromcresolpurpur (3,0 µg/mL) und M-Kresolpurpur (2,9 µg/mL)) vermischt. Gemäß der Konzentration von Wasserstoffionen im Urin zeigt der Indikator einen Farbwechsel an. Dieser wird spektrophotometrisch bei 596 nm erfasst (Siemens 2012).

2.4.6 Validierung der Messverfahren für Urin

2.4.6.1 Kontrollmaterialien

Zur Validierung der Verfahren wurde nachstehende Messlösungen durch Verdünnung vom kommerziellen Qualitätskontrollmaterial (BioRad Multiquel Liquid Assayed Level 2, Ref.Nr. 4737-04, Lot-Nr. 45812 und Level 3. Ref.Nr. 4738-04, Lot.-Nr. 45813) mit Wasser hergestellt, aliquotiert und für max. 7 Tage im Kühlschrank gelagert:

Tab. 7: Materialien und Verdünnungsstufen zur Bestimmung von Linearität, Präzision und Richtigkeit

	GGT				LDH				AP			
	QK L (85 U/l)		QK H (134 U/l)		QK L (182 U/l)		QK H (415 U/l)		QK L (151 U/l)		QK H (286 U/l)	
	Verd.	ZW	Verd.	ZW	Verd.	ZW	Verd.	ZW	Verd.	ZW	Verd.	ZW
Level 0	BLANK	0			BLANK	0			BLANK	0		
Level 1	L1:80	1,06			L1:80	2,28			L1:80	1,89		
Level 2	L1:40	2,12			L1:40	4,55			L1:40	3,78		
Level 3	L1:30	3,18			L1:30	6,06			L1:30	5,03		
Level 4	L1:20	4,25			L1:20	9,1			L1:20	7,55		
Level 5			H1:20	6,7	L1:10	18,2					H1:20	14,3
Level 6	L1:10	8,5					H1:20	20,75	L1:10	15,1		
Level 7			H1:10	13,4	L 1:5	36,4					H1:10	28,6
Level 8	L 1:5	17,0					H1:10	41,5	L 1:5	30,2		
Level 9			H1:5	26,8	L 1:2	91,0						
Level 10	L 1:2	42,2										
Level 11			H1:2	67,0								

Tab. 8: Verwendete Materialien und Verdünnungsstufen zur Bestimmung der Nachweis- und Leerwertgrenzen

GGT		LDH		AP	
QK L (85 U/l)		QK L (182 U/l)		QK L (151 U/l)	
Verd.	ZW (U/l)	Verd.	ZW (U/l)	Verd.	ZW (U/l)
L1:20	4,25	L1:20	9,1	L1:20	7,55
L1:30	3,18	L1:30	6,06	L1:30	5,03
L1:40	2,12	L1:40	4,55	L1:40	3,78
L1:80	1,06	L1:80	2,28	L1:80	1,89
BLANK	0	BLANK	0	BLANK	0

2.4.6.2 Bestimmung der Bestimmungs-, Nachweis- und Leerwertgrenzen

Die Ermittlung der Bestimmungsgrenzen (Quantifizierungsgrenzen, Limit of Quantification, LoQ) erfolgte nach CLSI EP17-A2 aus dem Präzisionsprofil (Pierson-Perry et al. 2012). Dazu wurden die Kontrollmaterialien und eine Leerprobe (Blank, Wasser) in Serien von 5 Replikaten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen in aufsteigender Konzentration gemessen.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) ist dabei als kleinste Enzymaktivität definiert, die mit einer für den Verwendungszweck ausreichenden und vordefinierten Güte gemessen werden kann. In der vorliegenden Untersuchung wurde die maximale Unpräzision auf einen VK von $\leq 20\%$ festgelegt.

Die Ermittlung der Nachweisgrenzen (Limit of Detection LoD) und Leerwertgrenzen (Limit of Blank, LoB) erfolgte nach Protokoll CLSI EP 17-A2 in einer *classical approach analytical sensitivity study* (Pierson-Perry et al. 2012). Dazu wurden 4 Leerwertproben und 4 Proben mit sehr niedriger Enzymaktivität an 5 aufeinanderfolgenden Tagen in jeweils 5 Wiederholungsmessungen gemessen.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde als dasjenige Aktivitätsniveau bestimmt, bei dem 95% der Messwerte wahrscheinlich oberhalb der Leerwertgrenze (LoB) liegen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei diesem Aktivitätsniveau ein falsch negatives Ergebnis auftritt (Beta-Fehler) liegt bei maximal 5%. Das zugrundeliegende statistische Verfahren ist in (Currie 1999), (Linnet and Kondratovich 2004) beschrieben.

Als Leerwertgrenze (LoB) wurde die 95.-Perzentile der Leer-Messwerte bestimmt.

Auswertung und Darstellung erfolgt mit dem Programm Validation Manager, das die Statistik-Algorithmen der genannten CLSI-Protokolle verwendet.

2.4.6.3 Bestimmung von Unrichtigkeit, Unpräzision und quadratischem Mittelwert der Messabweichung

Die Ermittlung von Unrichtigkeit und Unpräzision erfolgte nach den Protokollen CLSI-EP10-A3 (Unrichtigkeit) (Krouwer et al. 2014) bzw. CLSI-EP15-A3 (Unpräzision) (Carey et al. 2014).

Dazu wurden die Kontrollmaterialien mit bekannten Zielwerten in aufsteigender Enzymaktivität in Serien von 5 Replikaten pro Tag an 5 aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Der quadratische Mittelwert der Messwertabweichung (QUAMM) ergibt sich aus den Einzelmesswerten nach der unten angegebenen Rechenvorschrift.

Die genannten Testcharakteristika wurden im Einzelnen wie folgt ermittelt:

Unrichtigkeit (Bias%):

$$Bias(\%) = \left(\frac{\text{Mittelwert} - \text{Zielwert}}{\text{Zielwert}} \right) * 100$$

Unpräzisionen:

Die Gesamtunpräzision und ihre Komponenten Wiederholunpräzision (in der Serie) und Intermediärunpräzision (von Tag zu Tag) wurden aus den jeweils 25 Wiederholungsmessungen mittels two-way ANOVA-Varianz-Analyse ermittelt, wie im CLSI-Protokoll vorgegeben

Quadratischer Mittelwert der Messwertabweichung (QUAMM, Δ):

Dieses Abweichungsmaß kombiniert die zufälligen (Unpräzision) und die systematischen Abweichungen (Unrichtigkeit) der Einzelmesswerte vom Zielwert der Kontrollmaterialien und stellt ein Maß für die Streuung der Messwerte um den Zielwert der Probe dar. Der QUAMM wurde wie folgt berechnet.

Berechnung QUAMM

$$\Delta = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - x_0)^2}$$

(x_0 = Zielwert des Kontrollmaterials

x_i = Wert der Einzelmessung

n = Anzahl der Einzelmessergebnisse)

Die Auswertung und Darstellung erfolgt mit dem Programm Validation Manager, das die Statistik-Algorithmen der genannten CLSI-Protokolle verwendet.

2.4.6.4 Überprüfung der Linearität

Die Überprüfung der Linearität erfolgte nach CLSI-EP10-A3 aus den Daten der Wiederholungsmessungen mit Kontrollmaterialien aufsteigender Enzymaktivität (Krouwer et al. 2014).

In dieser Methode wird für die Messdaten durch Regressionsrechnung eine optimale Ausgleichskurve ermittelt und mit einem hypothetischen linearen Modell verglichen. Die Abweichung zwischen Regressionskurve und linearem Modell wird als Non-Linearitätsfehler ermittelt. Im Linearitätsbereich der Methode ist als Akzeptanzkriterium ein Non-Linearitätsfehler von maximal 20% vorgegeben.

Die Auswertung und Darstellung erfolgt mit dem Programm Analyse-It, das die Statistik-Algorithmen des genannten CLSI-Protokolls verwendet.

2.4.7 Lagerungsstabilität der Enzymaktivitäten

Dazu wurden von 20 augenscheinlich nierengesunden Probanden aus dem Labor frische Urinproben in ausreichender Menge gewonnen, in 0,5 ml Portionen aliquotiert, und in den temperaturüberwachten Einrichtungen des Labors unter folgenden Bedingungen gelagert:

- a. Raumtemperatur (RT, auf 20+/-2°C klimatisierte Laborräume)
- b. Kühlschrank (4-8 °C, KS)
- c. Gefrierschrank (-18 °C, GF)
- d. Tiefkühlschrank (-80 °C, TK).

Um einen zeitlichen Verlauf zu untersuchen, wurden die Enzymaktivitäten jeweils frisch (0d), nach einem Tag (1d), nach drei Tagen (3d), nach sieben Tagen (7d), nach vierzehn Tagen (14d), nach einundzwanzig Tagen (21d) und nach achtundzwanzig Tagen (28d) aus einem Aliquot der Lagerungsreihe bestimmt.

2.4.8 Enzymstabilität bei mehrmaligem Einfrieren

Dazu wurden von 10 Probanden aus dem Labor frische Urinproben in ausreichender Menge gewonnen, in 0,5 ml Portionen aliquotiert, und am Untersuchungstag entsprechend den Versuchsbedingungen entweder frisch oder nach ein bis drei wiederholten Einfrierzyklen gemessen.

Dafür wurden separate Aliquots für die angegebene Anzahl von Zyklen jeweils 15 min bei -18°C eingefroren und dann über 10 min bei 22°C im Wasserbad aufgetaut, nach Erreichen der Zyklenzahl gemischt und anschließend gemessen.

2.4.9 Empfindlichkeit gegen pH-Änderung als Verfälschungsstrategie

Dazu wurde von einem Probanden in ausreichender Menge Urin gewonnen und in drei 50 ml Portionen aufgeteilt und entweder nativ belassen oder auf

basischen oder sauren pH-Wert eingestellt (Tab. 9). Die Bestimmung erfolgte aus 0,5 ml Aliquots unter den jeweiligen Versuchsbedingungen.

Tab. 9: Basische und angesäuerte Urine

Basischer Urin (50 ml), 5% Na ₂ CO ₃ (w/v)	Angesäuertes Urin (50 ml) 0,5% Ascorbinsäure (w/v)
Versetzt mit 2,5 g Natriumcarbonat / 50 ml	Versetzt mit 250 mg Ascorbinsäure / 50 ml
pH: 12,0	pH: 3,5

2.4.10 Ermittlung der Referenzbereichsgrenzen

Die Ermittlung der Referenzbereichsgrenzen erfolgte nach CLSI-EP28-A3 (non parametric quantile method des CLSI-Protokolls) aus der Verteilung der Messwerte von 50 Nierengesunden als 2,5%- und 97,5%-Perzentile der Daten nach Transformation in eine annähernde Normalverteilung (Horowitz 2010).

Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte bei Original- und transformierten Daten durch QQ-Plot und im Shapiro-Wilk-Test.

Die Auswertung und Darstellung erfolgt mit dem Programm Analyse-It, das die Statistik-Algorithmen des genannten CLSI-Protokolls verwendet.

2.4.11 Ermittlung der Entscheidungsgrenzen und der Trennleistung

Die Entscheidungsgrenzen wurden aus 100 Urinproben ermittelt, bei denen die Enzymaktivitäten in frischem, nativem und nach gefroren-gelagertem (7 Tage, -18°C) Zustand bestimmt wurde. In Anlehnung an Protokoll CLSI EP24-A2 wurden Verteilung und die Überlagerung der Messwerte in beiden Zuständen durch Histogramme dargestellt (Kroll 2011). Die Entscheidungsgrenze, die gute Spezifität bei gleichzeitiger hoher Sensitivität in der bestmöglichen Weise verbindet, wurde durch ROC (receiver-operating-characteristics)-Analyse und Ermittlung des optimalen Youden-Index ermittelt.

Auswertung und Darstellung erfolgt mit dem Programm Analyse-It das die Statistikalgorithmen der genannten CLSI-Protokolle und Auswerteverfahren verwendet.

2.5 Datenerfassung und -übermittlung

Die gemessenen Werte wurden mittels dem Laborinformationssystem Molis (CompuGroup Medical, Deutschland) erfasst und übermittelt. Die Rohdaten wurden anschließend in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) importiert.

Die graphischen Darstellungen wurden in Excel erstellt oder als Excel-Dateien in die verwendeten Statistikprogrammen exportiert, dort ausgewertet und dargestellt.

2.6 Statistik

Statistische Analysen erfolgten mit den Statistikprogrammen ValidationManager V.65.11 (FinBiosoft, Espoo, Finnland) oder Analyse-It V.5.11 (Analyse-It Software, Leeds, Großbritannien).

Beide Statistikprogramme sind für analytische und labormedizinische Fragestellungen konzipiert und in den Anforderungen an Datenimport und in den verwendeten Statistik-Algorithmen eng an CLSI-Protokolle und andere Regelwerke im qualitätskontrollierten und regulierten Umfeld zugeschnitten.

Wertelagen und Werteverteilungen wurden in der Regel als arithmetische Mittelwerte (MW) +/- Standardabweichung (SD) angegeben oder in Boxplot-Darstellung mit Kennzeichnung von Median, Mittelwert, zentralem Interquartilsabstand (IQR) und der Kennzeichnung von möglichen nahen Ausreißern (near outlier, $1,5 \leq 3,0 \times \text{IQR}$ von der oberen/unteren zentralen Quartilsgrenze entfernt) und von fernen Ausreißern ($> 3,0 \times \text{IQR}$ entfernt).

Die statistische Beratung zur Auswertung erfolgte durch Frau Dr. Y.-S. Feng vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen. Die Vergleiche zwischen den Gruppen erfolgte durch Varianzanalyse

(ANOVA) der einzelnen Versuchsbedingungen und Überprüfung der Unterschiede in den Mittelwertlagen durch den Dunnett post-hoc Test (Dunnett 1955; Dunnett 1964).

Dieses Verfahren ist für multiple Vergleiche von Versuchsbedingungen mit jeweils derselben Kontrollbedingung (many-to-one comparisons, $k-1$ Vergleiche) konzipiert, wie sie auch in der vorliegenden Untersuchung durchgeführt werden. So werden z.B. verschiedene Lagerzeitpunkte jeweils mit denselben Ausgangsdaten verglichen. Der Test überprüft die notwendigen Voraussetzungen Normalität und Varianzhomogenität der Datensätze für die Durchführung einer One-Way Analysis of Variance (ANOVA) und vergleicht dann die Mittelwerte der Datengruppen in einer Student's t-Teststatistik. Dabei wird auf die Wahrscheinlichkeit eines Typ-I Fehler korrigiert, der bei Vielfachvergleichen zu einer Überschätzung der Signifikanzen der Unterschiede führen würde (Mackridge und Rowe 2018). Der Dunnett post-hoc Test löst das Problem von statistischen Vielfachvergleichen (Typ I-Fehler, scheinbar signifikante Unterschiede können sich bereits allein durch die hohe Zahl der durchgeführten Vergleiche ergeben) für Vergleiche mit jeweils derselben Kontrollgruppe (many-to-one comparisons, $k-1$ Vergleiche) besser und ergibt in den Teststatistiken engere Konfidenzintervalle als andere post-hoc Verfahren (z.B. das Tukey- oder Tukey-Kramer-Verfahren). Letztere sind für Vergleiche zwischen *allen* Datensätzen (many-to-many comparisons, $k(k-1)/2$ Vergleiche) konzipiert (Mackridge und Rowe 2018; Dunnett 1955; Dunnett 1964).

Die Berechnungen der Varianzanalysen und Teststatistiken erfolgte mit dem Statistikprogramm Analyse-It.

3 ERGEBNISSE

3.1 Validierung der GGT-Aktivitätsbestimmung für Urin

Aus Voruntersuchungen hatte sich ergeben, dass sich die analytische Leistung der Serum-Messverfahren für GGT und LDH durch Modifikation der Verfahrensparameter (wie Analyt-, Reagenz-, Küvettenvolumina, Inkubations- oder Messzeit) nicht wesentlich steigern lässt. Die Messverfahren wurden deshalb unmodifiziert für den erwarteten niedrigen Aktivitätsbereich im Urin und für die Anwendung in dieser Probenmatrix validiert.

3.1.1 Erstellung eines Präzisionsprofils.

Kontrollmaterialien, die GGT in 11 Enzymaktivitäten im Bereich von 1,06 U/l bis 67,0 U/l (Level 1 bis 11) enthielten und eine Leerprobe (Blank) wurden in Serien von 5 Replikaten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Über den Verlauf der Messserie erfolgte die Lagerung der Messaliquots bei 4-8°C im Kühlschrank. In Abb. 4 ist die Verteilung der Messergebnisse dargestellt. Tab. 10 zeigt Mittelwerte und die Streuung der Messergebnisse als Maß für die Unpräzisionen bei den jeweiligen Aktivitätsniveaus.

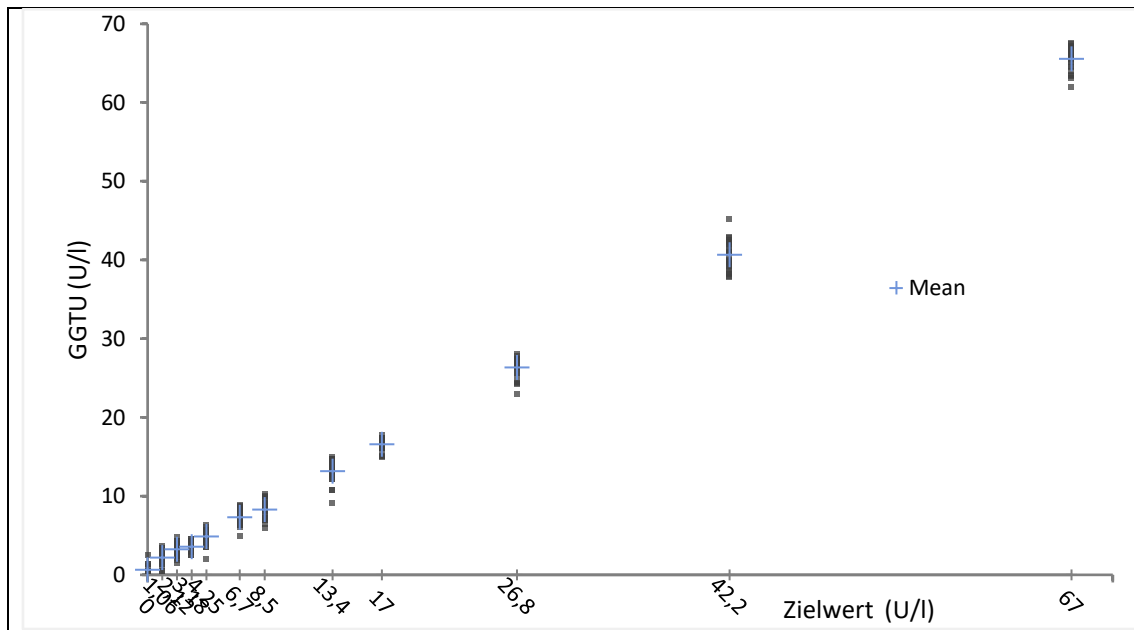


Abb. 4: GGT-Aktivitätsmessung. Graphische Darstellung der Wiederholungsmessungen, n=25 pro Level (5 Tage, 5 Replikate pro Tag, Lagerung der Messaliquots bei 4-8°C im Kühlschrank)

Tab. 10: GGT-Aktivitätsbestimmung im Konzentrationsbereich von 1,06 bis 67 U/l

Kontrollmaterial	Zielwert (GGT U/l)	n	Mittelwert	VK	SD	Akzeptanzkriterium (VK)
Blank	0	25	0,68	71,1%	0,49	20,0%
Level 1	1,06	25	2,23	39,9%	0,89	20,0%
Level 2	2,12	25	3,29	24,4%	0,80	20,0%
Level 3	3,18	25	3,63	15,8%	0,57	20,0%
Level 4	4,25	25	4,93	19,3%	0,95	20,0%
Level 5	6,7	25	7,39	13,0%	0,96	20,0%
Level 6	8,5	25	8,30	13,9%	1,15	20,0%
Level 7	13,4	25	13,22	10,6%	1,40	20,0%
Level 8	17	25	16,62	4,6%	0,76	20,0%
Level 9	26,8	25	26,42	4,8%	1,26	20,0%
Level 10	42,2	25	40,73	4,6%	1,87	20,0%
Level 11	67	25	65,63	2,2%	1,47	20,0%

3.1.2 Ermittlung der Bestimmungsgrenze (LoQ) aus dem Präzisionsprofil

Abb. 5: zeigt das Präzisionsprofil im gemessenen Aktivitätsbereich. Aus dem Schnittpunkt der Ausgleichsgerade mit dem maximal zulässigen VK von 20% ergibt sich eine untere Quantifizierungsgrenze für die GGT von 4,5 U/l. Gemessene Aktivitäten unterhalb dieses Bereiches werden nicht mehr quantitativ

angegeben, da sie nicht mehr mit der geforderten Präzision bestimmt werden können.

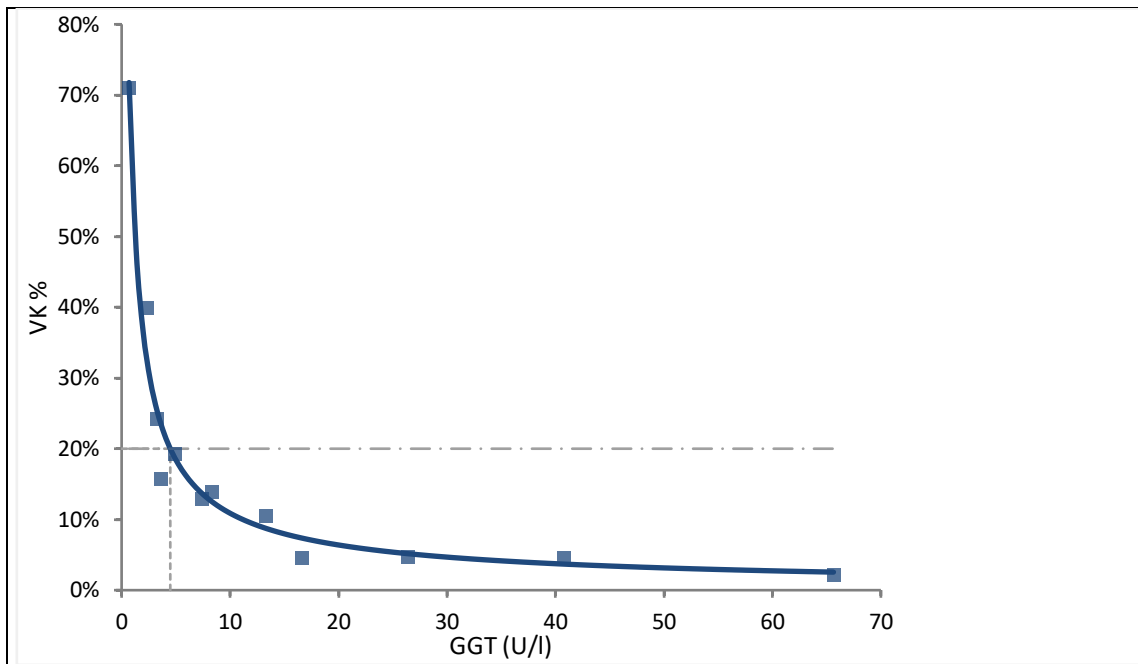


Abb. 5: Präzisionsprofil der GGT-Aktivitätsmessung. Bei GGT-Aktivitäten unter 4,5 U/l (LoQ) steigt die Unpräzision über einen VK von 20%.

3.1.3 Ermittlung von Leerwertgrenze (LoB) und Nachweisgrenze (LoD)

Die Bestimmung erfolgte entsprechend der in Protokoll CLSI EP 17-A2 vorgeschlagenen *classical approach analytical sensitivity study* (Pierson-Perry et al. 2012) mit 4 Leerwertproben und 4 Proben sehr niedriger Enzymaktivität (GGT 1,01 bis 4,25 U/l), die an 5 aufeinanderfolgenden Tagen in jeweils 5 Wiederholungsmessungen bestimmt wurden. Abb. 6 zeigt die Verteilung der Messwerte.

Die Leerwertgrenze (Level of Blank, LoB) wurde als 95.-Perzentile der Leer-Messwerte bestimmt. Damit liegen die Messwerte bei Abwesenheit von GGT mit hoher Wahrscheinlichkeit unter diesem Grenzwert. Für das GGT-Verfahren eine LoB von 1.5 U/l ermittelt. Damit ist die Stärke des Grundrauschens bei analytfreier Probe beschrieben.

Die untere Nachweisgrenze (Level of Detection, LoD) wird bestimmt als das Aktivitätsniveau bei dem 95% der Messwerte wahrscheinlich oberhalb des LoB liegen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei diesem Aktivitätsniveau ein falsch negatives Ergebnis auftritt (Beta-Fehler) liegt bei maximal 5%. Das zugrundeliegende statistische Verfahren ist in (Pierson-Perry et al. 2012) beschrieben. Für das GGT Verfahren liegt die so gefundene Nachweisgrenze bei 2,75 U/l. Werte unterhalb dieser Aktivität werden als nicht nachweisbar oder negativ resultiert, da sie nicht mehr mit ausreichender Sicherheit detektiert werden können.

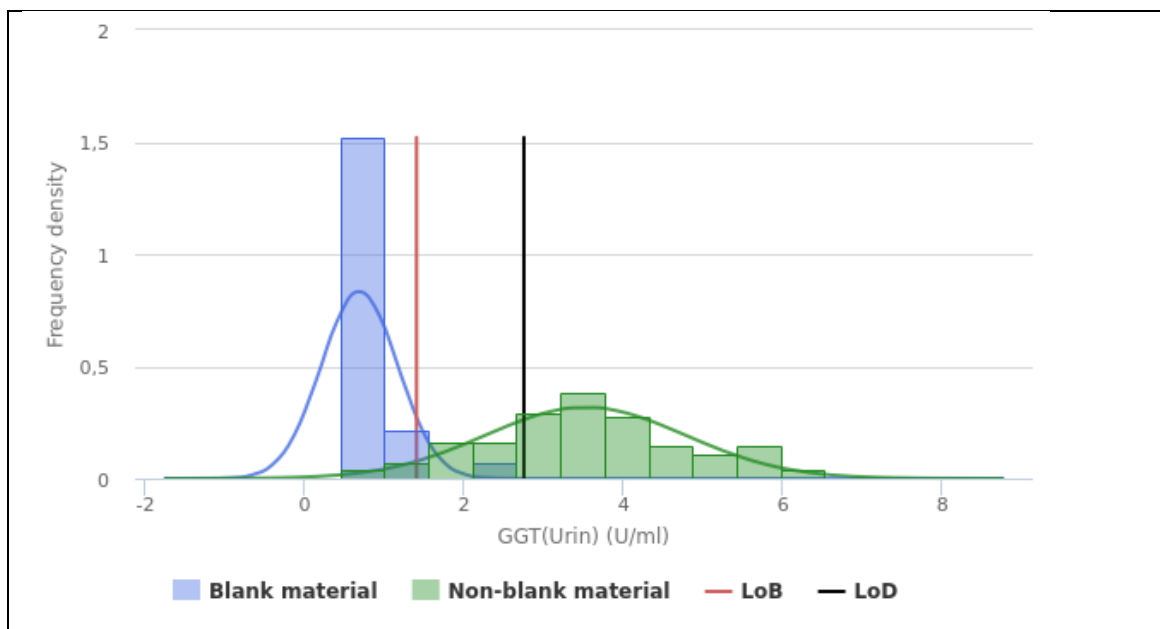


Abb. 6: GGT-Messverfahren. Bestimmung von Nachweisgrenze (Level of Detection, LoD) und Leerwertgrenze (Level of Blank, LoB) aus der Wiederholungsmessung von Leerproben (Blank material) und von Proben niedriger Konzentration (Non-blank material)

Tab. 11: GGT. Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach CLSI EP17-A2 (precision profiling und classical approach analytical sensitivity study).

Leerwertgrenze (Level of Blank, LoB): (95%-Perzentile der Leerwertmessungen)	GGT 1,4 U/l
Nachweisgrenze (Level of Detection, LoD): (niedrigste nachweisbare Aktivität mit einem β -Fehler $\leq 5\%$)	GGT 2,8 U/l
Bestimmungsgrenze (Level of Quantification, LoQ): (niedrigste bestimmbare Aktivität mit einem VK $\leq 20\%$)	GGT 4,5 U/l

3.1.4 Ermittlung von Unrichtigkeit, Unpräzision und QUAMM

Als Akzeptanzkriterien für die GGT-Aktivitätsmessung wurden eine maximal zulässige Unpräzision mit einem VK von 20%, eine maximale Unrichtigkeit von +/-20% und als Maß für den kombinierten Fehler ein maximaler quadratischer Mittelwert der Messabweichung (QUAMM, Δ) von +/-20% vorgegeben.

11 Kontrollproben mit bekannter GGT-Enzymaktivität (Level 1 bis Level 11, Bereich von 1,06 U/l bis 67 U/l) wurden in Wiederholungsmessungen in folgendem Schema bestimmt: Pro Level wurde 1 Probe (1 Replik) 5 mal pro Tag an 5 aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Aus den insgesamt 25 Einzelmesswerten der Probe lassen sich durch Vergleich mit dem Zielwert pro Aktivitätsniveau die Richtigkeit, die Gesamtunpräzision des Verfahrens im Labor und der Beitrag der einzelnen Komponenten Wiederholunpräzision (in der Serie), Intermediär-Unpräzision (Tag zu Tag) und der quadratische Mittelwert der Messabweichung (QUAMM) bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 dargestellt und anhand der vordefinierten Akzeptanzkriterien bewertet.

Zusammenfassend zeigt die Methode ab der Kontrollprobe Level 03 (Zielwert 3,18 U/l) eine ausreichend gute Richtigkeit und Präzision. Ab der Kontrollprobe Level 06 mit einem Zielwert von 6,7 U/l liegt auch der quadratische Mittelwert der Messwertabweichung (QUAMM) unter 20%. Damit ist das Messverfahren für

GGT im Urin für den erwarteten Wertebereich und die zu erwartende Wertelage um die Entscheidungsgrenze herum geeignet.

Tab. 12: GGT-Aktivitätsbestimmung: Ermittlung von Unrichtigkeit, Unpräzision und quadratischer Mittelwert der Messabweichung (QUAMM):

	Zielwert	n	Mittelwert	Unrichtigkeit	QUAMM (Δ)	Unpräzision (In der Serie)		Unpräzision (Tag zu Tag)		Unpräzision (Gesamt)	
						SD	%VK	SD	%VK	SD	%VK
Level00	0	25	0,684	N/A (N/A)	N/A (N/A)	0,481 (0,368 – 0,695)	70,3 (53,8 – 102)	0,0775 (N/A)	11,3 (N/A)	0,487 (0,38 – 0,681)	71,2 (55,5 – 99,5)
Level01	1,06	25	2,23	111 % (75 % – 146 %)	138 % (108 % – 190 %)	0,773 (0,591 – 1,12)	34,6 (26,5 – 50)	0,486 (0,245 – 3,93)	21,8 (11 – 176)	0,913 (0,681 – 1,39)	40,9 (30,5 – 62,1)
Level02	2,12	25	3,29	55,1 % (39,4 % – 70,8 %)	66,4 % (52,1 % – 91,6 %)	0,781 (0,598 – 1,13)	23,8 (18,2 – 34,3)	0,195 (N/A)	5,92 (N/A)	0,805 (0,626 – 1,13)	24,5 (19 – 34,4)
Level03	3,18	25	3,63	14,1 % (6,14 % – 22 %)	22,6 % (17,7 % – 31,2 %)	0,613 (0,469 – 0,885)	16,9 (12,9 – 24,4)	0 (N/A)	0 (N/A)	0,613 (0,478 – 0,853)	16,9 (13,2 – 23,5)
Level04	4,25	25	4,93	16 % (6,46 % – 25,4 %)	27,1 % (21,2 % – 37,4 %)	0,789 (0,604 – 1,14)	16 (12,3 – 23,1)	0,577 (0,303 – 3,39)	11,7 (6,15 – 68,9)	0,978 (0,717 – 1,54)	19,8 (14,5 – 31,2)
Level05	6,7	25	7,39	10,3 % (4,07 % – 16,6 %)	17,4 % (13,7 % – 24 %)	0,596 (0,456 – 0,861)	8,06 (6,17 – 11,6)	0,823 (0,474 – 2,82)	11,1 (6,42 – 38,1)	1,02 (0,678 – 2,02)	13,7 (9,17 – 27,3)
Level06	8,5	25	8,3	-2,4 % (-8,32 % – 3,52 %)	13,5 % (10,6 % – 18,7 %)	0,758 (0,58 – 1,1)	9,14 (6,99 – 13,2)	0,954 (0,545 – 3,39)	11,5 (6,57 – 40,9)	1,22 (0,824 – 2,32)	14,7 (9,93 – 28)
Level07	13,4	25	13,2	-1,34 % (-5,93 % – 3,25 %)	10,3 % (8,1 % – 14,3 %)	0,822 (0,629 – 1,19)	6,22 (4,76 – 8,98)	1,24 (0,721 – 4,12)	9,4 (5,45 – 31,2)	1,49 (0,982 – 3,06)	11,3 (7,42 – 23,2)
Level08	17	25	16,6	-2,24 % (-4,12 % – -0,346 %)	4,93 % (3,87 % – 6,81 %)	0,683 (0,523 – 0,987)	4,11 (3,15 – 5,94)	0,372 (0,179 – 4,78)	2,24 (1,08 – 28,8)	0,778 (0,588 – 1,15)	4,68 (3,54 – 6,93)
Level09	26,8	25	26,4	-1,4 % (-3,37 % – 0,567 %)	4,82 % (3,78 % – 6,65 %)	1,17 (0,893 – 1,69)	4,42 (3,38 – 6,38)	0,524 (0,232 – 19,2)	1,98 (0,876 – 72,7)	1,28 (0,978 – 1,85)	4,84 (3,7 – 6,99)
Level10	42,2	25	40,7	-3,49 % (-5,42 % – -1,55 %)	5,56 % (4,36 % – 7,68 %)	1,16 (0,885 – 1,67)	2,84 (2,17 – 4,1)	1,6 (0,924 – 5,48)	3,94 (2,27 – 13,4)	1,98 (1,32 – 3,93)	4,85 (3,24 – 9,64)
Level11	67	25	65,6	-2,05 % (-3 % – -1,1 %)	2,97 % (2,33 % – 4,1 %)	1,04 (0,796 – 1,5)	1,59 (1,21 – 2,29)	1,14 (0,642 – 4,36)	1,74 (0,979 – 6,65)	1,54 (1,07 – 2,79)	2,35 (1,63 – 4,24)
Akzeptanzkriterien				+/- 20%	+/- 20%		<20 %		<20 %		<20 %

(SD: Standardabweichung; VK Variationskoeffizient, N/A: nicht anwendbar, in Klammer angegeben sind die 90% Konfidenzintervalle)

3.1.5 Überprüfung der Linearität

Als Akzeptanzkriterien für die zulässige Nonlinearität wurden eine maximal zulässige Abweichung von 20% der besten Ausgleichskurve durch die Messwerte (bestes Regressionsmodell) vom der linearen Ausgleichsgerade definiert. Dies wird für GGT, wie in Tab. 13 und Abb. 7 dargestellt, im Bereich von 2,23 bis > 67 U/ml erreicht. Die untere Grenze des Linearitätsbereichs ergibt sich

aus Abb. 7 durch den Schnittpunkt der interpolierten Kurve mit dem Akzeptanzkriterium.

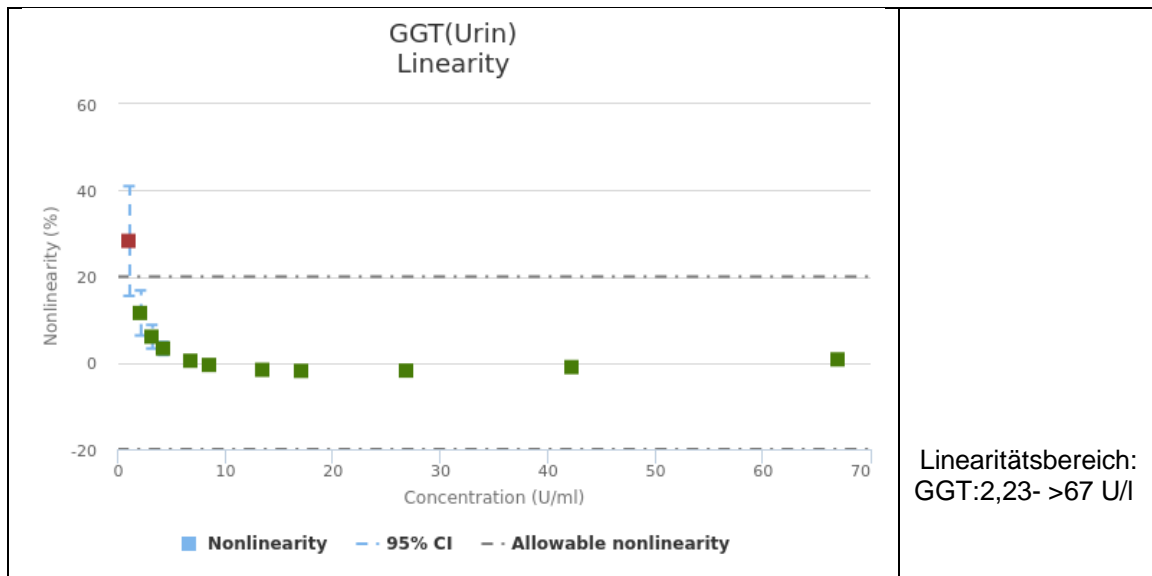


Abb. 7: GGT-Aktivitätsmessung. Überprüfung der Linearität.

Tab. 13: GGT-Bestimmung. Überprüfung der Linearität.

Verdünnung (GGT U/l)	n	Mittelwert	SD	VK	Linear fit	Nonlinear fit *	Absolute Nichtlinearität	Relative Nichtlinearität	Zulässige Nichtlinearität
1 (1,06)	25	2,23	4,3 2	193 %	1,71	2,01	0,3 (0,165 – 0,434)	28,3 % (15,5 % – 41 %)	±20 %
2 (2,12)	25	3,29	3,8 1	116 %	2,73	2,98	0,246 (0,135 – 0,356)	11,6 % (6,37 % – 16,8 %)	±20 %
3 (3,18)	25	3,63	2,7 6	76, 1 %	3,75	3,94	0,193 (0,106 – 0,28)	6,08 % (3,34 % – 8,8 %)	±20 %
4 (4,25)	25	4,93	4,2 8	86, 9 %	4,78	4,92	0,142 (0,0783 – 0,206)	3,35 % (1,84 % – 4,85 %)	±20 %
5 (6,7)	25	7,39	4,5 8	62 %	7,13	7,17	0,0333 (0,0183 – 0,0482)	0,497 % (0,273 % – 0,719 %)	±20 %
6 (8,5)	25	8,3	5,5 7	67, 1 %	8,86	8,82	-0,0405 (-0,0587 – -0,0223)	-0,476 % (-0,69 % – -0,263 %)	±20 %
7 (13,4)	25	13,2	6,3	47, 6 %	13,6	13,4	-0,213 (-0,31 – -0,118)	-1,59 % (-2,31 % – -0,879 %)	±20 %
8 (17,0)	25	16,6	3,5 7	21, 5 %	17	16,7	-0,315 (-0,456 – -0,174)	-1,85 % (-2,68 % – -1,02 %)	±20 %
9 (26,8)	25	26,4	5,6 5	21, 4 %	26,5	26	-0,479 (-0,695 – -0,264)	-1,79 % (-2,59 % – -0,986 %)	±20 %
10 (42,2)	25	40,7	8,9 6	22 %	41,3	40,8	-0,41 (-0,595 – -0,226)	-0,972 % (-1,41 % – -0,536 %)	±20 %
11 (67,0)	25	65,6	6,8 7	10, 5 %	65,1	65,6	0,544 (0,299 – 0,787)	0,811 % (0,446 % – 1,18 %)	±20 %

(* Nonlinear fit 2nd order polynomial. SD: Standardabweichung; VK Variationskoeffizient, in Klammer angegeben sind die 90%-Konfidenzintervalle)

3.2 Validierung der LDH-Aktivitätsbestimmung für Urin

3.2.1 Erstellung eines Präzisionsprofils

Die Ermittlung erfolgt nach CLSI EP17-A2 aus dem Präzisionsprofil.

Kontrollmaterialien, die LDH in 9 Enzymaktivitäten im Bereich von 2,28 U/l bis 40,5 U/l (Level 1 bis 9) enthielten und eine Leerprobe (Blank) wurden in Serien von 5 Replikaten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Über den Verlauf der Messserie erfolgte die Lagerung der Messaliquots bei 4-8°C im Kühlschrank. In Abb. 8 ist die Verteilung der Messergebnisse dargestellt. Tab. 14 zeigt Mittelwerte und die Streuung der Messergebnisse als Maß für die Unpräzisionen bei den jeweiligen Aktivitätsniveaus.

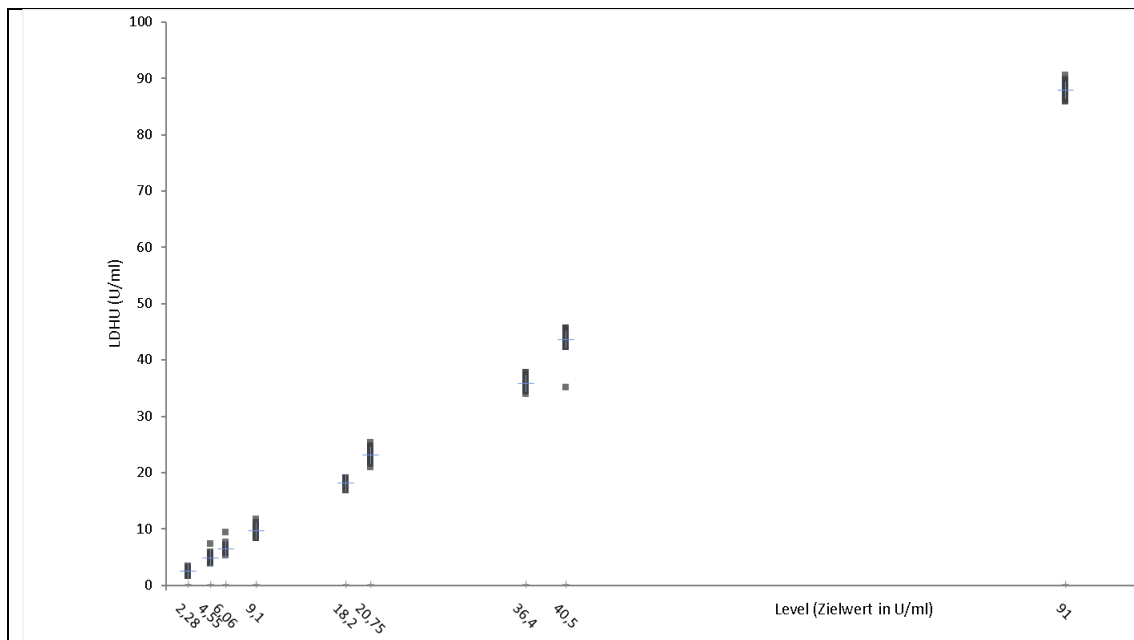


Abb. 8: LDH-Aktivitätsmessung. Graphische Darstellung der Wiederholungsmessungen.

n=25 pro Level (5 Tage, 5 Replikate pro Tag, Lagerung der Messaliquots bei 4-8°C im Kühlschrank)

Tab. 14: LDH-Aktivitätsbestimmung im Konzentrationsbereich von 2,28 bis 91 U/l

Kontrollmaterial	Zielwert (LDH U/l)	n	Mittelwert	VK	SD	Akzeptanzkriterium (VK)
Blank	0	25	0,60	46,3%	0,28	20,0%
Level 1	2,28	25	2,48	20,6%	0,51	20,0%
Level 2	4,55	25	4,90	14,9%	0,73	20,0%
Level 3	6,06	25	6,42	12,6%	0,81	20,0%
Level 4	9,1	25	9,65	9,2%	0,89	20,0%
Level 5	18,2	25	18,15	3,5%	0,64	20,0%
Level 6	20,75	25	23,20	4,7%	1,09	20,0%
Level 7	36,4	25	35,84	3,0%	1,07	20,0%
Level 8	40,5	25	43,56	4,8%	2,10	20,0%
Level 9	91	25	87,97	1,5%	1,29	20,0%

3.2.2 Ermittlung der Bestimmungsgrenzen (LoQ)

Abb. 9: zeigt das Präzisionsprofil im gemessenen Aktivitätsbereich. Aus dem Schnittpunkt der Ausgleichsgerade mit dem maximal zulässigen VK von 20% ergibt sich eine Bestimmungsgrenze (LoQ) für LDH von 2,9 U/l. Gemessene Aktivitäten unterhalb dieses Bereiches werden nicht mehr quantitativ angegeben, da sie nicht mit der geforderten Präzision bestimmt werden können.

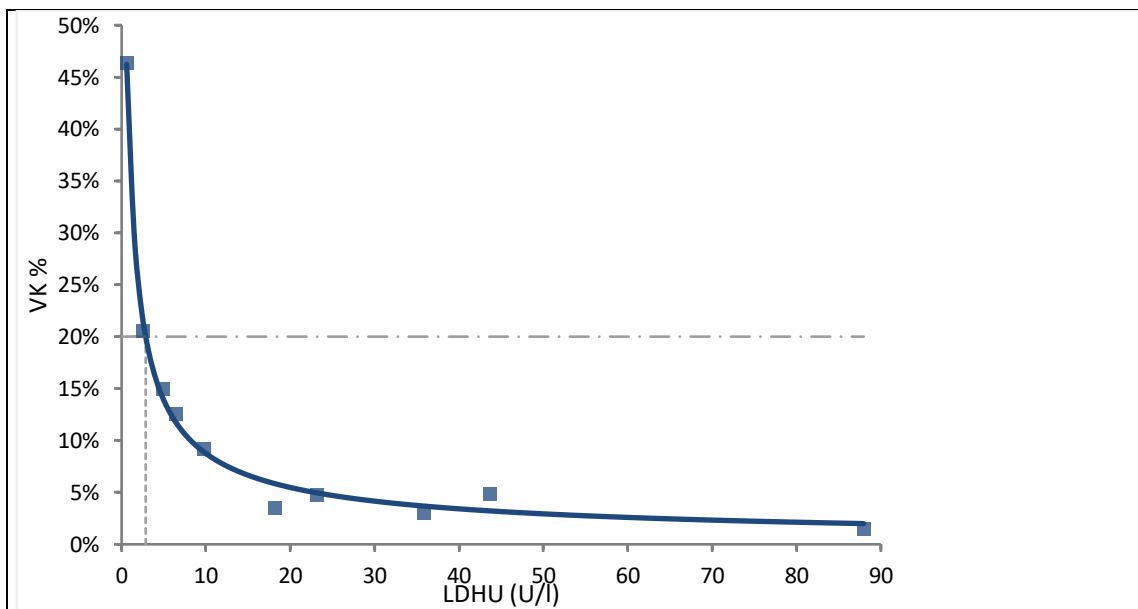


Abb. 9: Präzisionsprofil der LDH-Aktivitätsmessung, Bei LDH-Aktivitäten unter 2,9 U/l steigt die Unpräzision über einen VK von 20% an.

3.2.3 Ermittlung von Nachweisgrenze (LoD) und Leerwertgrenze (LoB)

Die Bestimmung erfolgte entsprechend der in Protokoll CLSI EP 17-A2 vorgeschlagenen *classical approach analytical sensitivity study (Pierson-Perry et al. 2012)* mit 4 Leerwertproben und 4 Qualitätskontrollproben sehr niedriger Enzymaktivität (LDH 2,28 bis 9,1 U/l), die an 5 aufeinanderfolgenden Tagen in jeweils 5 Wiederholungsmessungen bestimmt wurden. Abb. 10 zeigt die Verteilung der Messwerte.

Die Leerwertgrenze (LoB) wurde als 95%-Perzentile der Leer-Messwerte bestimmt. Damit liegen die Messwerte bei Abwesenheit von LDH mit hoher Wahrscheinlichkeit unter diesem Grenzwert. Für das LDH-Verfahren wurde ein LoB von 1,2 U/l ermittelt. Damit ist die Stärke des Grundrauschens bei analytfreier Probe beschrieben.

Die untere Nachweisgrenze (Level of Detection LoD) wurde bestimmt als das Aktivitätsniveau bei dem 95% der Messwerte wahrscheinlich oberhalb des LoB liegen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei diesem Aktivitätsniveau ein falsch negatives Ergebnis auftritt (Beta-Fehler) liegt bei maximal 5%. Für das LDH-Verfahren liegt die so gefundene untere Nachweisgrenze bei 2,43 U/l. Werte unterhalb dieser Aktivität werden als nicht nachweisbar oder negativ resultiert, da sie nicht mehr mit ausreichender Sicherheit detektiert werden können

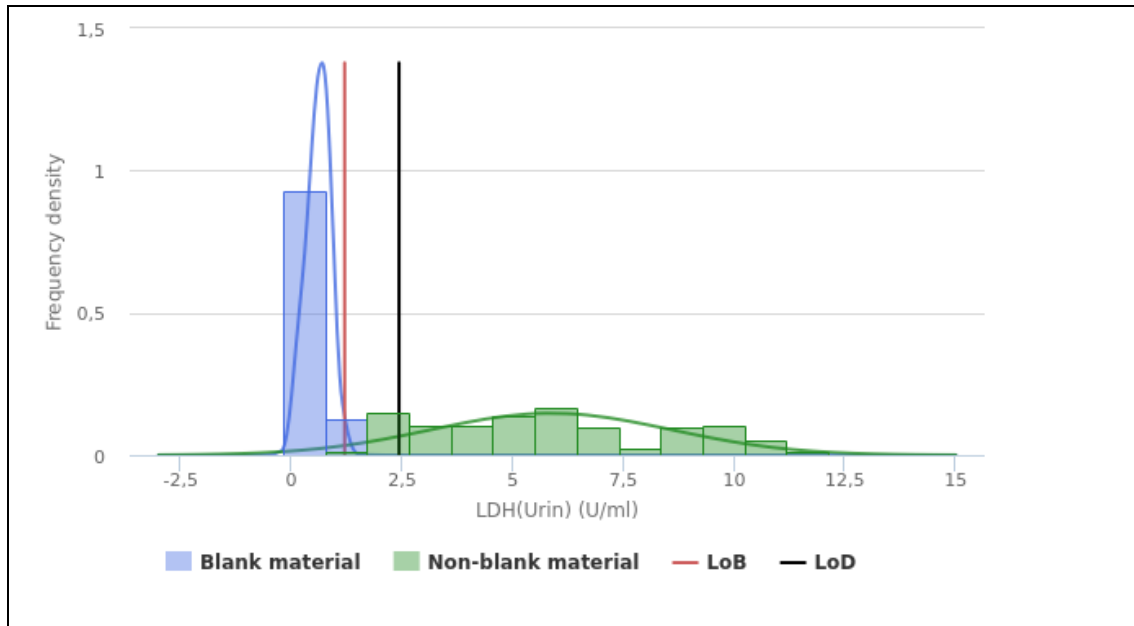


Abb. 10: LDH-Messverfahren. Bestimmung von Nachweisgrenze (Level of Detection, LoD) und Leerwertgrenze (Level of Blank, LoB) aus der Wiederholungsmessung von Leerproben (Blank material) und von Proben niedriger Konzentration (Non-blank material).

Tab. 15: LDH. Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach CLSI EP17-A2 (precision profiling und classical approach analytical sensitivity study).

Leerwertgrenze (Level of Blank, LoB): (95%-Perzentile der Leerwertmessungen)	LDH 1,2 U/l
Nachweisgrenze (Level of Detection, LoD): (niedrigste nachweisbare Aktivität mit einem β -Fehler $\leq 5\%$)	LDH 2,43 U/l
Bestimmungsgrenze (Level of Quantification, LoQ): (niedrigste bestimmbare Aktivität mit einem VK $\leq 20\%$)	LDH 2,9 U/l

3.2.4 Ermittlung von Unrichtigkeit, Unpräzision und kombiniertem Fehler

Als Akzeptanzkriterien für die LDH-Aktivitätsmessung wurden eine maximal zulässige Unpräzision mit einem VK von 20%, eine maximale Unrichtigkeit von $\pm 20\%$, und als Maß für den kombinierten Fehler ein maximaler quadratischer Mittelwert der Messabweichung (QUAMM, Δ) von $\pm 20\%$ vorgegeben.

9 Kontrollproben mit bekannter LDH-Enzymaktivität (Level 1 bis Level 9, Bereich von 2,28 U/l bis 91 U/l) wurden in Wiederholungsmessungen im folgendem Schema bestimmt: Pro Level wurde 1 Probe (1 Replikat) 5 mal pro Tag an 5 aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Aus den insgesamt 25 Einzelmesswerten der Probe lassen sich durch Vergleich mit dem Zielwert pro Aktivitätsniveau die Richtigkeit, die Gesamt-Unpräzision des Verfahrens im Labor und der Beitrag der einzelnen Komponenten Wiederholunpräzision (in der Serie), Intermediärpräzision (Tag-zu-Tag) und der quadratische Mittelwert der Messabweichung (QUAMM) bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 dargestellt und anhand der vordefinierten Akzeptanzkriterien bewertet.

Zusammenfassend zeigt die LDH-Methode ab der Kontrollprobe Level 01 (Zielwert LDH 2,28 U/l) eine ausreichend gute Richtigkeit und Präzision. Ab der Kontrollprobe Level 02 mit einem Zielwert von LDH 4,55 U/l liegt auch der quadratische Mittelwert der Messwertabweichung unter 20%. Damit ist auch das Messverfahren für LDH im Urin für den erwarteten Wertebereich und die zu erwartende Wertelage der Entscheidungsgrenze herum geeignet.

Tab. 16: LDH-Aktivitätsbestimmung: Ermittlung von Unrichtigkeit, Unpräzision und quadratischem Mittelwert der Messabweichung (QUAMM):

	Zielwert	n	Mittelwert	Unrichtigkeit	QUAMM (Δ)	Unpräzision (In der Serie)		Unpräzision (Tag zu Tag)		Unpräzision (Gesamt)	
						SD	%VK	SD	%VK	SD	%VK
	LDH (U/l)										
Level00	0	25	0,596	N/A (N/A)	N/A (N/A)	0,272 (0,208 – 0,393)	45,6 (34,9 – 65,9)	0,0518 (N/A)	8,69 (N/A)	0,277 (0,216 – 0,387)	46,5 (36,2 – 65)
Level01	2,28	25	2,48	8,95 % (0,16 % – 17,7 %)	22,6 % (17,7 % – 31,2 %)	0,475 (0,363 – 0,686)	19,1 (14,6 – 27,6)	0,101 (N/A)	4,07 (N/A)	0,485 (0,378 – 0,68)	19,5 (15,2 – 27,4)
Level02	4,55	25	4,9	7,69 % (1,04 % – 14,3 %)	17,5 % (13,8 % – 24,2 %)	0,728 (0,557 – 1,05)	14,9 (11,4 – 21,5)	0,0837 (N/A)	1,71 (N/A)	0,733 (0,571 – 1,02)	15 (11,7 – 20,9)
Level03	6,06	25	6,42	5,94 % (0,181 % – 11,7 %)	14,4 % (11,3 % – 19,8 %)	0,587 (0,449 – 0,848)	9,15 (7 – 13,2)	0,608 (0,34 – 2,42)	9,47 (5,3 – 37,6)	0,846 (0,589 – 1,49)	13,2 (9,18 – 23,3)
Level04	9,1	25	9,65	6,07 % (1,72 % – 10,4 %)	11,4 % (8,91 % – 15,7 %)	0,442 (0,338 – 0,638)	4,58 (3,5 – 6,61)	0,85 (0,499 – 2,66)	8,8 (5,17 – 27,6)	0,958 (0,613 – 2,16)	9,92 (6,35 – 22,3)
Level05	18,2	25	18,1	-0,286 % (-1,79 % – 1,22 %)	3,47 % (2,72 % – 4,79 %)	0,664 (0,508 – 0,959)	3,66 (2,8 – 5,28)	0 (N/A)	0 (N/A)	0,664 (0,518 – 0,925)	3,66 (2,85 – 5,1)
Level06	20,75	25	23,2	11,8 % (9,53 % – 14,1 %)	12,9 % (10,1 % – 17,8 %)	0,711 (0,544 – 1,03)	3,07 (2,35 – 4,43)	0,908 (0,52 – 3,21)	3,91 (2,24 – 13,8)	1,15 (0,778 – 2,21)	4,97 (3,35 – 9,54)
Level07	36,4	25	35,8	-1,62 % (-2,86 % – -0,37 %)	3,27 % (2,56 % – 4,51 %)	0,818 (0,626 – 1,18)	2,28 (1,75 – 3,3)	0,732 (0,401 – 3,29)	2,04 (1,12 – 9,2)	1,1 (0,783 – 1,84)	3,07 (2,19 – 5,13)
Level08	41,5	25	43,9	5,77 % (4,47 % – 7,08 %)	6,46 % (5,07 % – 8,92 %)	0,658 (0,503 – 0,95)	1,5 (1,15 – 2,16)	1,13 (0,662 – 3,64)	2,58 (1,51 – 8,28)	1,31 (0,849 – 2,84)	2,99 (1,93 – 6,46)
Level09	91	25	88	-3,33 % (-3,95 % – -2,71 %)	3,61 % (2,83 % – 4,98 %)	0,794 (0,608 – 1,15)	0,90 (0,691 – 1,3)	1,11 (0,641 – 3,78)	1,26 (0,728 – 4,3)	1,37 (0,909 – 2,72)	1,55 (1,03 – 3,09)
Akzeptanzkriterien				+/- 20%	+/- 20%		<20 %		<20 %		<20 %

(SD: Standardabweichung; VK Variationskoeffizient, N/A: nicht anwendbar, in Klammer angegeben sind die 90% Konfidenzintervalle)

3.2.5 Überprüfung der Linearität

Das Akzeptanzkriterien für die zulässige Nonlinearität, definiert als maximal zulässige Abweichung von 20% der besten Ausgleichskurve durch die Messwerte (bestes Regressionsmodell) von der linearen Ausgleichsgerade, wird für GGT, wie in Tab.17 und Abb.11 dargestellt, im Bereich von 2,48 bis > 91 U/ml erreicht. Die untere Grenze des Linearitätsbereichs ergibt sich in Abb. 11 durch den Schnittpunkt der interpolierten Kurve mit dem Akzeptanzkriterium.

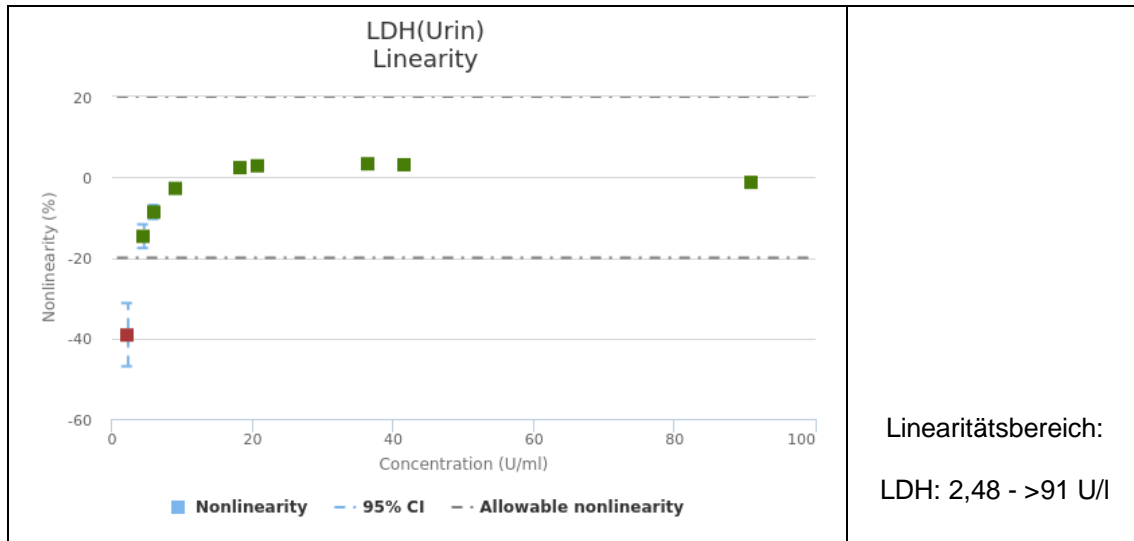


Abb. 11: LDH-Aktivitätsmessung. Überprüfung der Linearität.

Tab. 17: LDH-Bestimmung. Überprüfung der Linearität.

Verdünnung (LDH U/l)	n	Mittelwert	SD	VK	Linear fit	Nonlinear fit *	Absolute Nichtlinearität	Relative Nichtlinearität	Zulässige Nichtlinearität
1 (2,28)	2 5	2,48	2,3 5	94, 5 %	3,33	2,43	-0,893 (-1,07 – -0,712)	-39,2 % (-46,9 % – -31,2 %)	±20 %
2 (4,55)	2 5	4,9	3,2 7	66, 7 %	5,52	4,86	-0,668 (-0,8 – -0,533)	-14,7 % (-17,6 % – -11,7 %)	±20 %
3 (6,06)	2 5	6,42	3,3 2	51, 7 %	6,98	6,46	-0,524 (-0,628 – -0,418)	-8,65 % (-10,4 % – -6,9 %)	±20 %
4 (9,1)	2 5	9,65	4,2 8	44, 3 %	9,93	9,67	-0,252 (-0,302 – -0,201)	-2,77 % (-3,32 % – -2,21 %)	±20 %
5 (18,2)	2 5	18,1	3,0 5	16, 8 %	18,7	19,2	0,431 (0,346 – 0,518)	2,37 % (1,9 % – 2,85 %)	±20 %
6 (20,75)	2 5	23,2	5,2 8	22, 7 %	21,2	21,8	0,587 (0,471 – 0,706)	2,83 % (2,27 % – 3,4 %)	±20 %
7 (36,4)	2 5	35,8	5,0 4	14, 1 %	36,3	37,6	1,21 (0,969 – 1,45)	3,32 % (2,66 % – 3,99 %)	±20 %
8 (41,5)	2 5	43,9	5,9 4	13, 5 %	41,3	42,6	1,29 (1,03 – 1,55)	3,1 % (2,48 % – 3,72 %)	±20 %
9 (91,0)	2 5	88	6,2 5	7,1 1 %	89,2	88	-1,17 (-1,41 – -0,936)	-1,29 % (-1,54 % – -1,03 %)	±20 %

(* Nonlinear fit 2nd order polynomial. SD: Standardabweichung; VK Variationskoeffizient, in Klammer angegeben sind die 90%-Konfidenzintervalle)

3.3 Validierung der Aktivitätsmessung für Alkalische Phosphatase

Für die Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase (AP) ergaben sich die nachstehenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Insgesamt zeigte sich jedoch, dass die im menschlichen Urin ausgeschiedenen Enzymaktivitäten zu

niedrig liegen (MW +/- SD: 4,6 +/- 2,5 U/L). Darum wurden die Bestimmung der AP im Urin nicht weiterverfolgt.

Tab. 18: Alkalische Phosphatase im Urin. Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach CLSI EP17-A2 (precision profiling und classical approach analytical sensitivity study).

Leerwertgrenze (Level of Blank, LoB): (95%-Perzentile der Leerwertmessungen)	AP 0,6 U/l
Nachweisgrenze (Level of Detection, LoD): (niedrigste nachweisbare Aktivität mit einem β -Fehler $\leq 5\%$)	AP 1,1 U/l
Bestimmungsgrenze (Level of Quantification, LoQ): (niedrigste bestimmbare Aktivität mit einem VK $\leq 20\%$)	AP 2,9 U/l

3.4 Lagerungsstabilität bei verschiedenen Lagertemperaturen

Der Verlauf der Enzymaktivitäten von GGT und LDH unter verschiedenen Lagertemperaturen ist in Abb. 12 bis Abb. 15 dargestellt. Von der Analyse ausgeschlossen wurde eine Probe mit auffällig hohen LDH-Werten (73 U/l) als grober Ausreisser (far outlier, > 3 Interquartilsabstände oberhalb der oberen 75%-Perzentile). Diese Probe zeigte jedoch ein der Untersuchungsgruppe vergleichbares Lagerungsverhalten.

Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen (SD) und in Boxplotdarstellung auch die Mediane, zentralen Quartile und Ausreisser (near outlier, definiert als > 1,5 Interquartilsabstände entfernt von der oberen/unteren zentralen Quartilsgrenze).

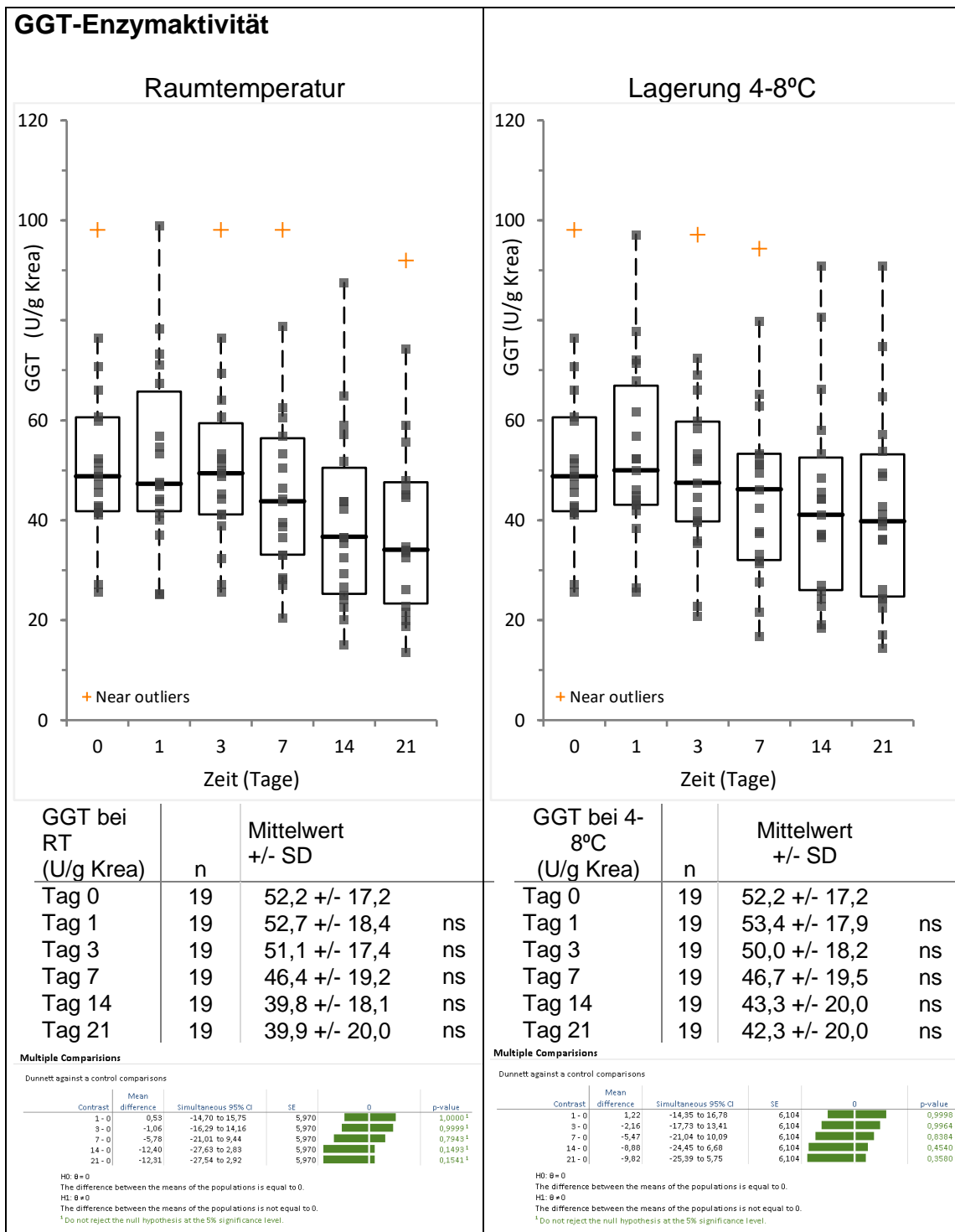


Abb. 12: Stabilität der GGT-Aktivität im Urin bei Raumtemperatur und bei Lagerung im Kühlschrank (4-8°C). Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen (SD) und als Boxplotdarstellung die Mediane, zentralen Quartile und Ausreisser (near outlier). Die Signifikanzniveaus der Mittelwertsunterschiede wurden gegen den Ausgangswert ermittelt (Teststatistik nach Dunnett, ns= nicht signifikant).

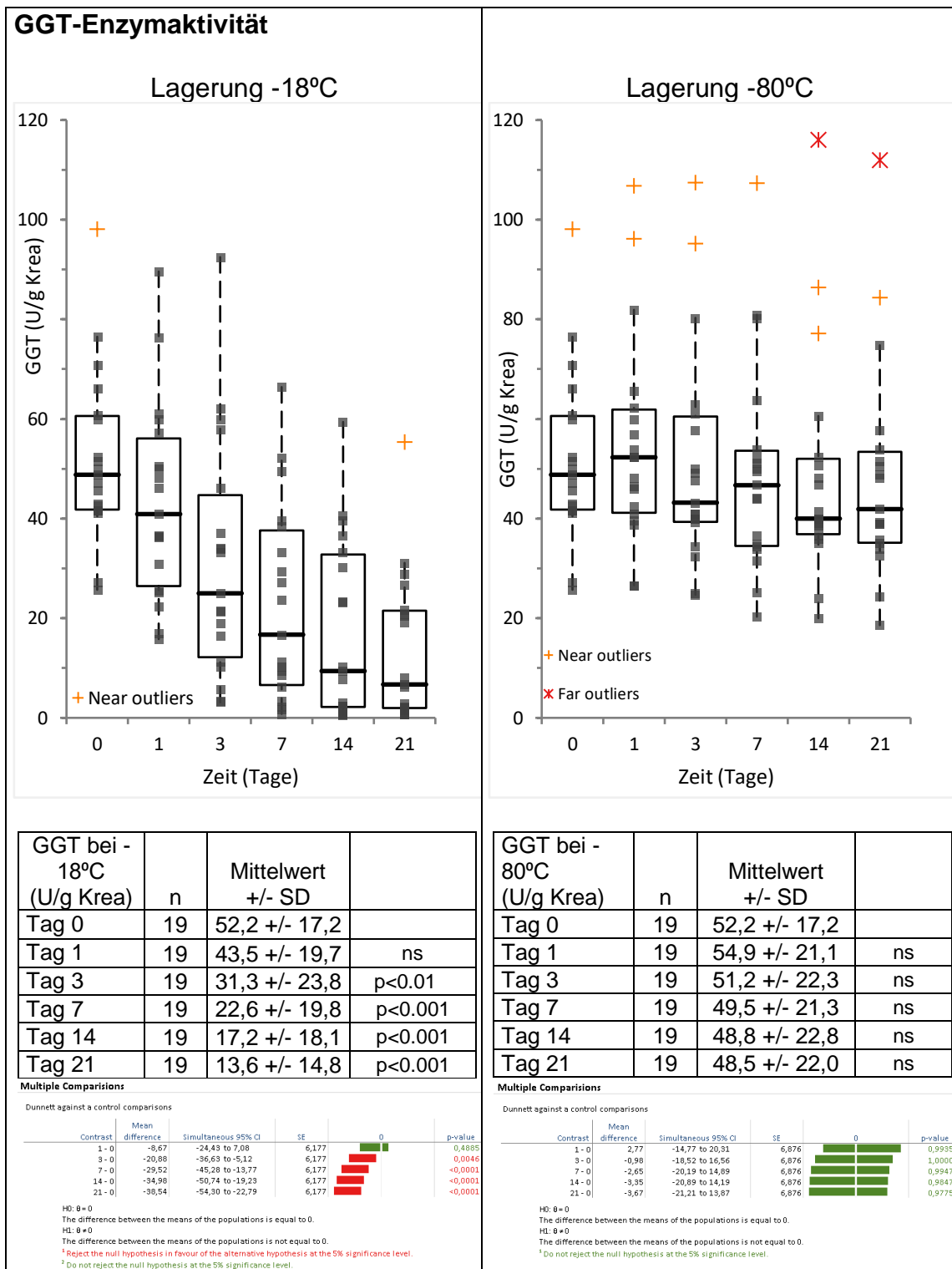


Abb. 13: Stabilität der GGT-Aktivität im Urin bei Lagerung im Gefrierschrank -18°C und bei -80°C.

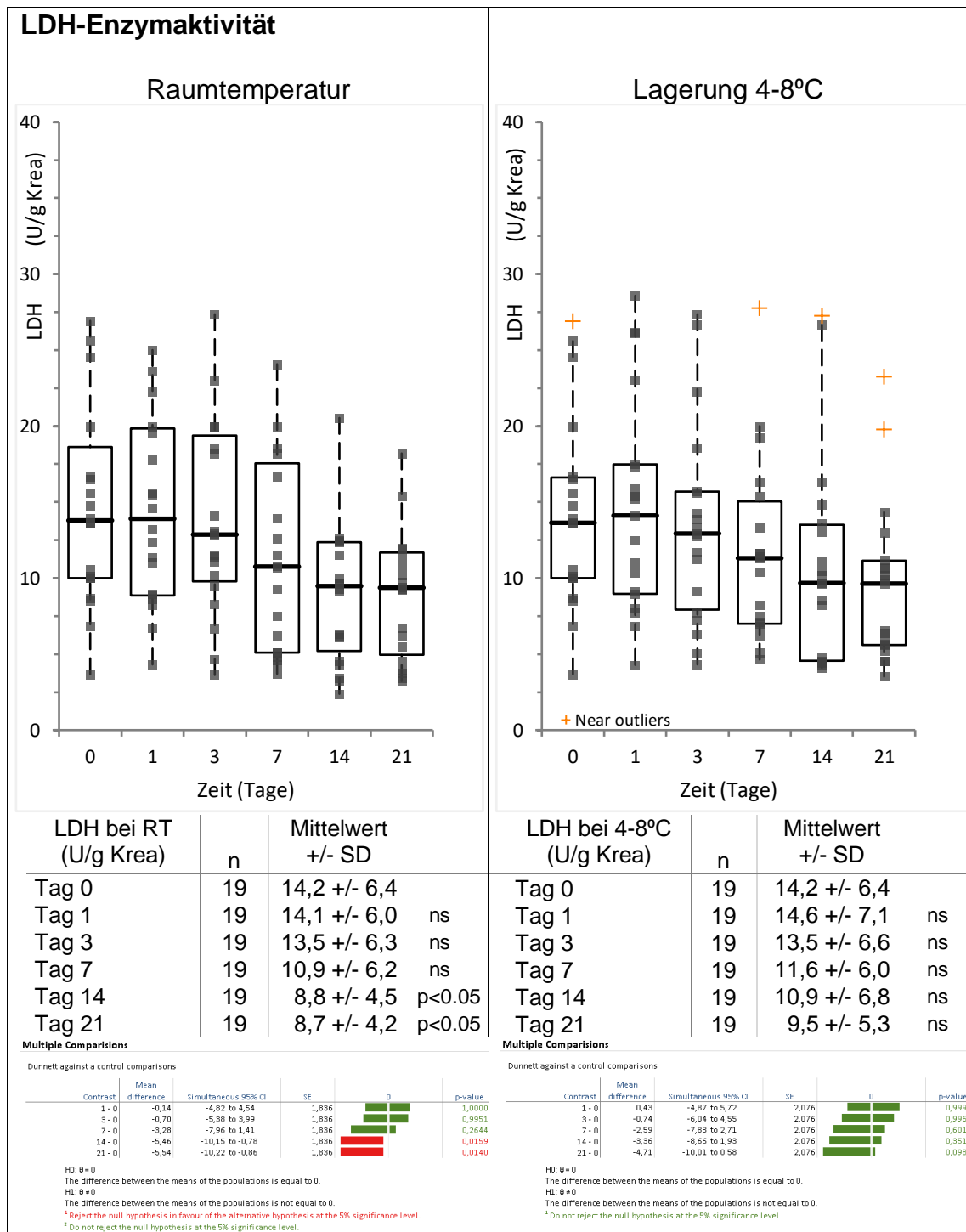


Abb. 14: Stabilität der LDH-Aktivität im Urin bei Raumtemperatur und bei Lagerung im Kühlschrank (4-8°C).

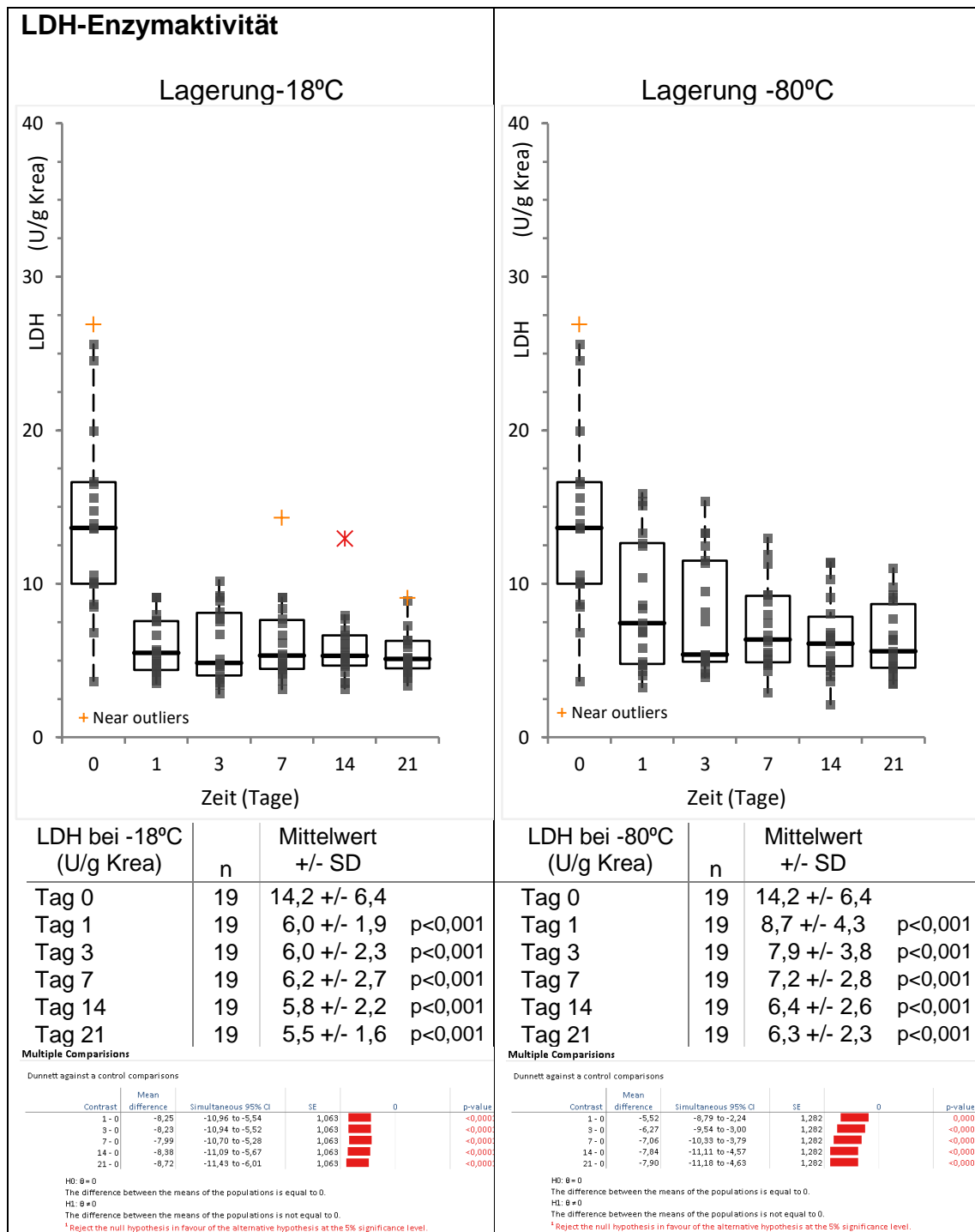


Abb. 15: Stabilität der LDH-Aktivität im Urin bei Lagerung im Gefrierschrank -18°C und bei -80°C.

Insgesamt zeigten die ausgeschiedenen Enzymaktivitäten von GGT und LDH eine breite Verteilung und für bis zu 7 Tage eine ausreichend gute und

vergleichbare Stabilität gegenüber der Lagerung bei Umgebungstemperatur oder im Kühlschrank (4-8°C).

Einfrieren im Gefrierfach (-18°C) führt bei GGT mit zunehmender Einfrierzeit zu einem kontinuierlichen Aktivitätsverlust, der nach 3-7 Tagen gegenüber dem Ausgangswert signifikant abgefallen ist. Das Einfrieren im Tiefkühlschrank zeigt einen unterschiedlichen Effekt auf beide Enzyme. Bei -80°C bleibt die GGT-Aktivität deutlich besser erhalten. LDH zeigt, wie bereits im Gefrierfach auch unter Tiefkühlbedingungen einen raschen und starken Aktivitätsverlust.

3.5 Enzymstabilität bei mehrmaligem Einfrieren (Freeze-Thaw Versuch)

Abb. 16 und Abb. 17 zeigen das Verhalten der Enzymaktivitäten für GGT und LDH unter kurzen (15min), bis zu dreimal wiederholten Einfrierzyklen (-18°C).

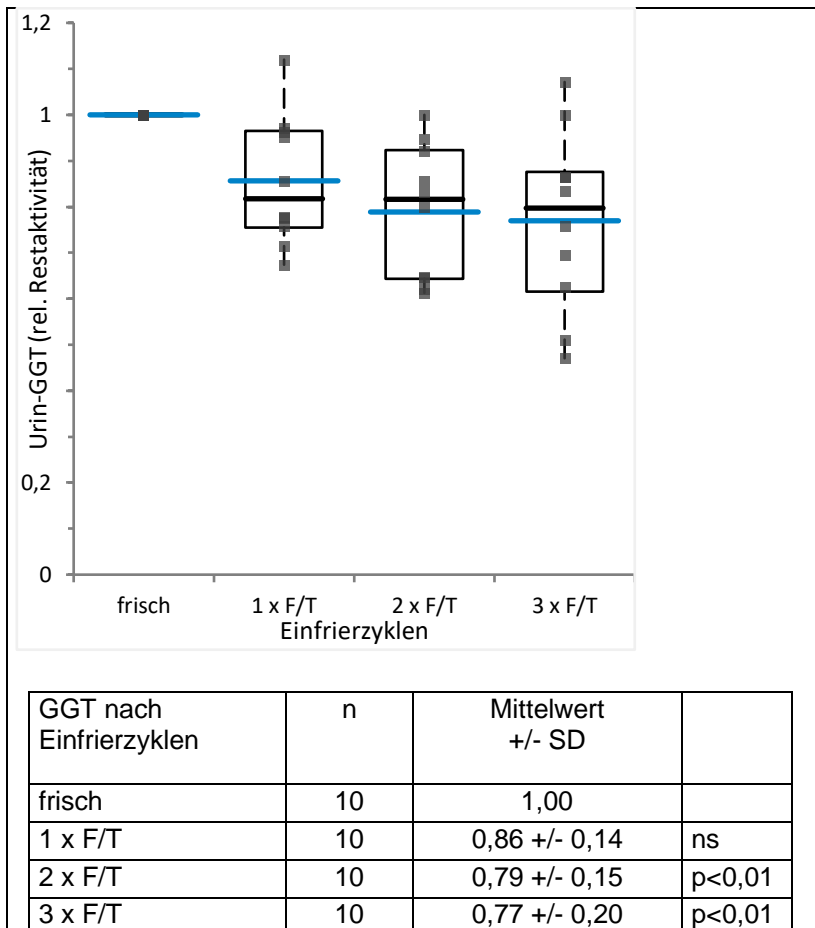


Abb. 16: GGT-Aktivität nach wiederholtem Einfrieren (Freeze-Thaw-Zyklus, F/T). Die Signifikanzniveaus der Mittelwertsunterschiede wurden gegen den Ausgangswert (frisch) ermittelt (Teststatistik nach Dunnet, ns= nicht signifikant).

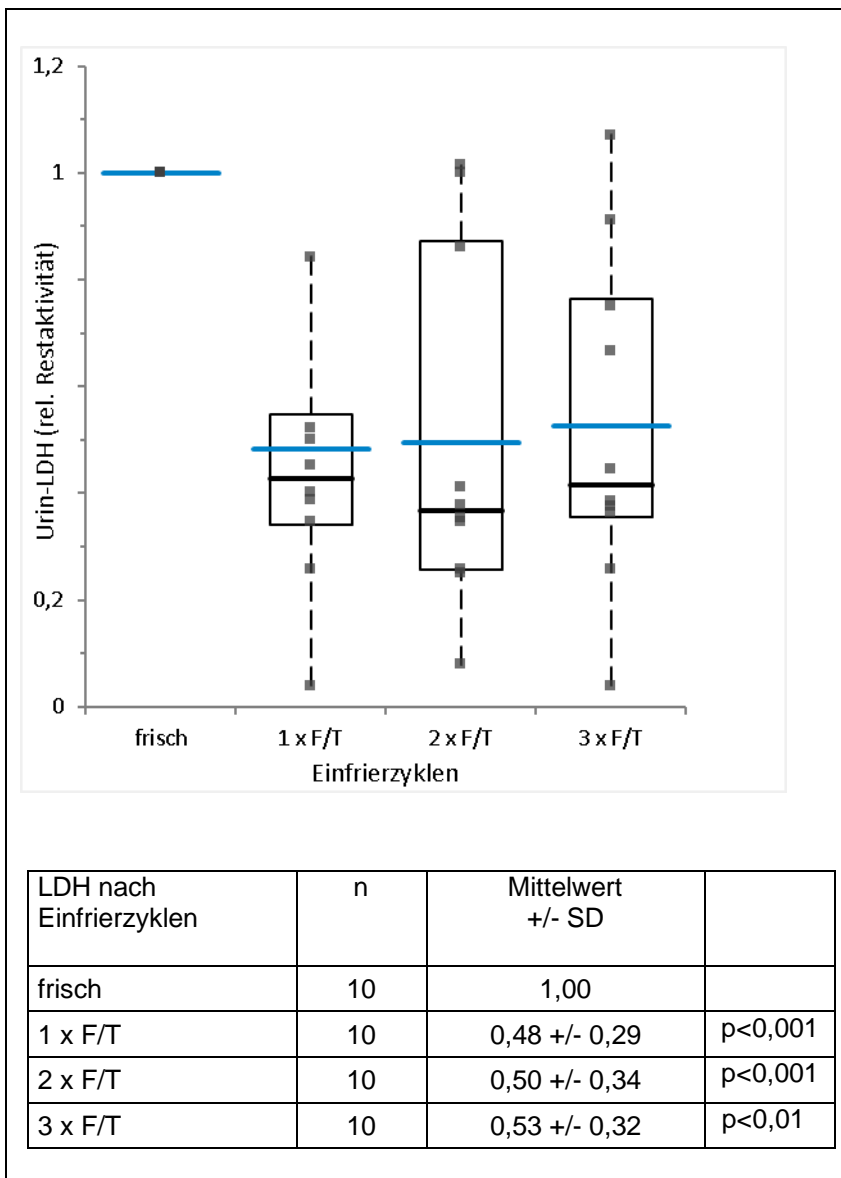


Abb. 17: LDH-Aktivität nach wiederholtem Einfrieren (Freeze-Thaw-Zyklus, F/T).

3.6 Enzymstabilität bei pH-Änderung

Abb. 18 und Abb. 19 zeigen den Einfluss des Urin pH-Werts auf die Enzymaktivität von GGT und LDH. Der Urin eines Probanden wurde entweder nativ belassen, mit Natriumcarbonat auf den pH 12,0 (basischer Urin) oder mit Ascorbinsäure auf den pH 3,5 (angesäuerter Urin) eingestellt und unter den angegebenen Bedingungen gelagert.

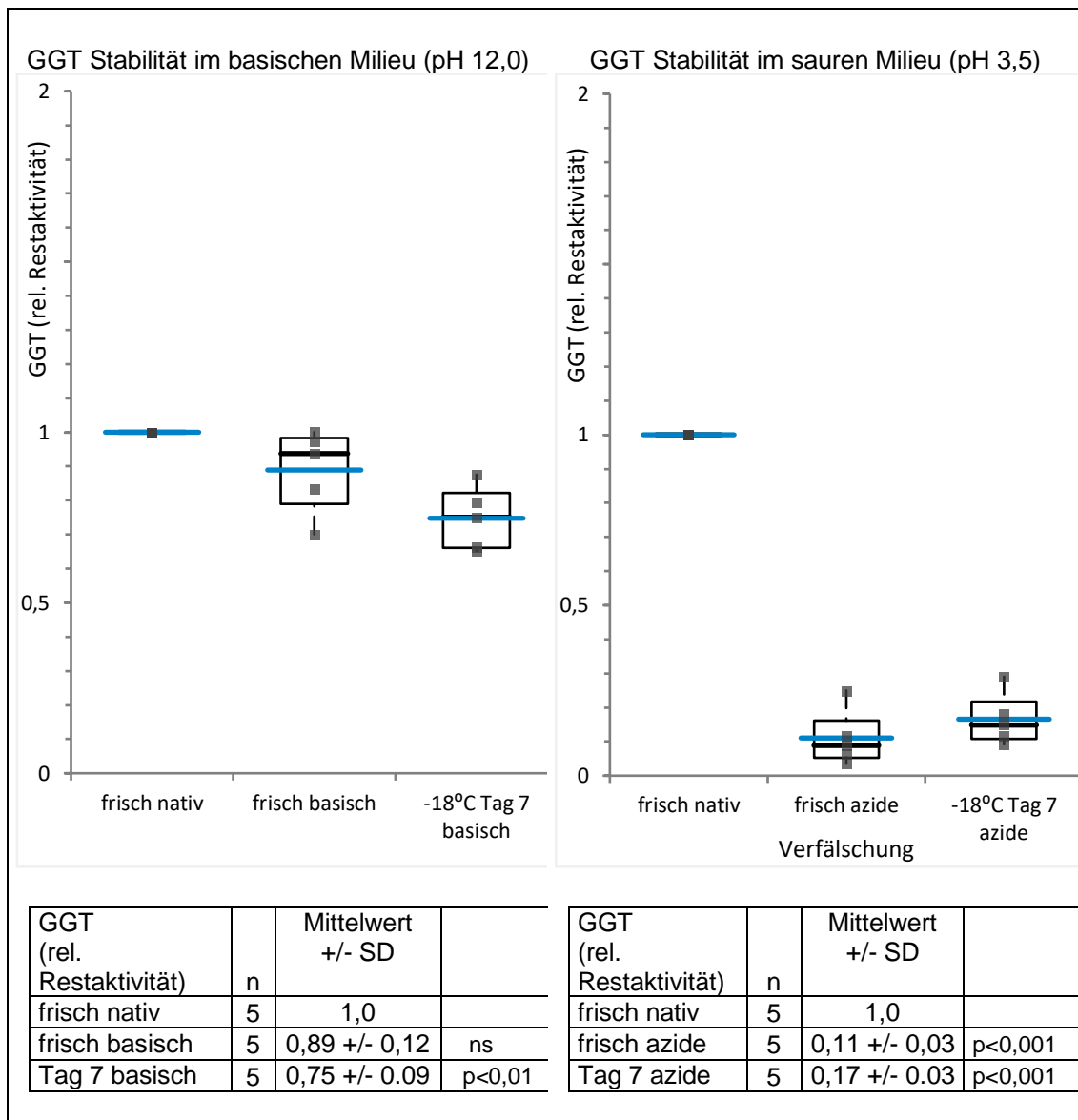


Abb. 18: Stabilität der GGT-Aktivität im Urin unter basischen (pH 12,0) und sauren (pH 3,5) Bedingungen

Wie dargestellt führt die Erhöhung des Urin-pHs durch basische Zusätze bei beiden Enzymen nur zu einer mässigen Änderung von gemessener Enzymaktivität oder der Lagerungsstabilität und reicht nicht aus, um das Ergebnis stark zu verfälschen.

Dagegen hat die Ansäuerung des Urins ausgeprägte und stark unterschiedliche Auswirkung auf beide Enzyme. Aus saurem Urin (pH 3,0) ist GGT generell kaum

noch messbar. Der LDH-Assay ergibt um 2- bis 3-fach höherer Messwerte, wenn aus angesäuerter Probe gemessen wird (Abb. 19).

Mögliche Ursache für diesen überraschenden, jedoch gut reproduzierbaren Befund könnte sein, dass LDH im Messansatz (in dem die Probe nach Vorverdünnung und Verdünnung in der Messküvette auf insgesamt 1:45 verdünnt wurde) beim pH-Optimum der Nachweisreaktion vorliegt. Insgesamt ist die Ursache dieser Beobachtung bislang unklar, hat aber auf die Wertigkeit des vorgestellten Verfahrens keine Auswirkung, da solche pH-Verschiebungen in der Drogensuchanalytik und der Substitutionskontrolle durch routinemäßige pH-Messung ausgeschlossen werden.

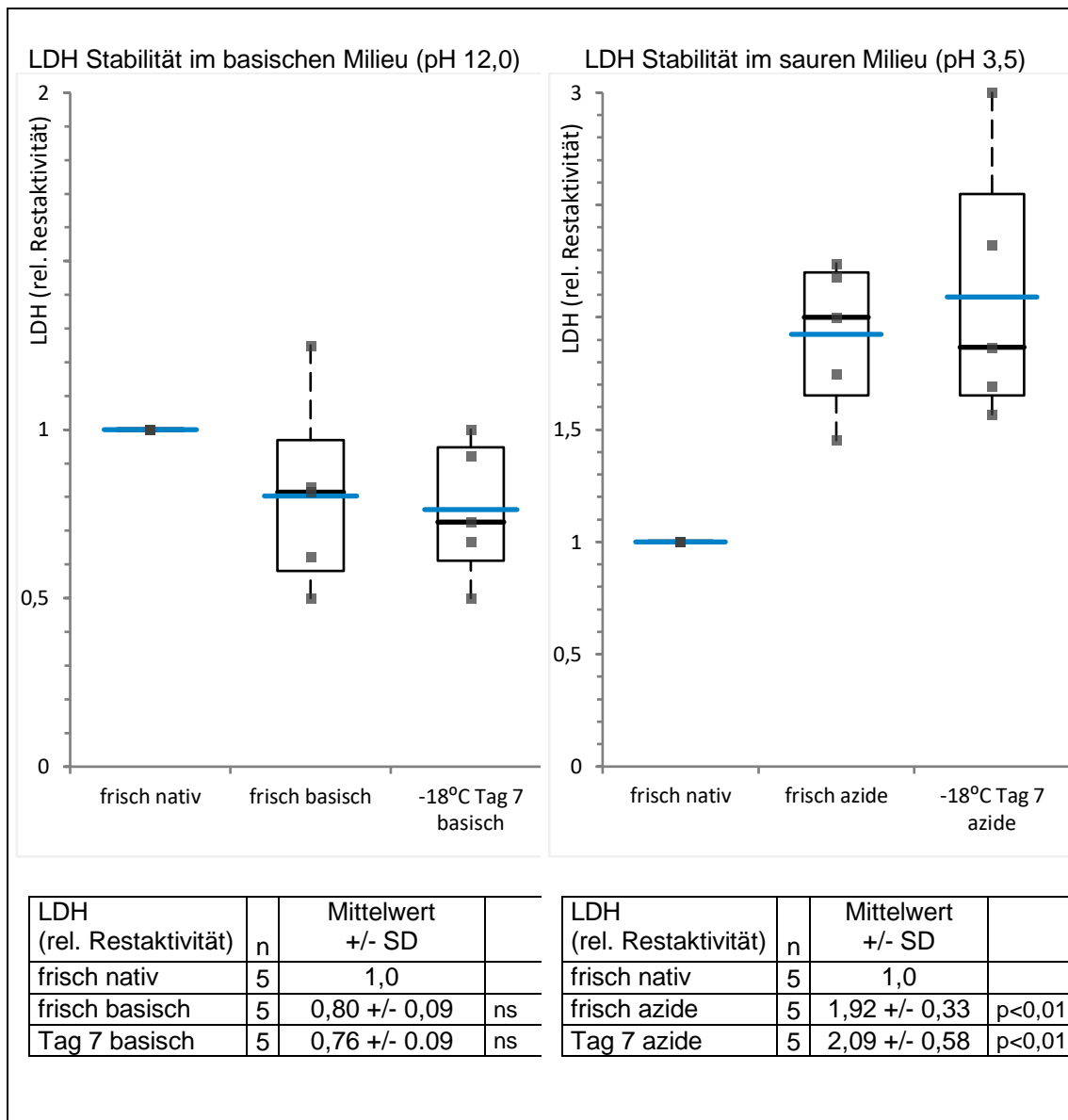


Abb. 19: Stabilität der LDH-Aktivität im Urin unter basischen (pH 12,0) und sauren (pH 3,5) Bedingungen

3.7 Bestimmung von Referenzbereichen

Die Referenzbereichsgrenzen wurden nach CLSI EP 28-A3 (non parametric quantile method) (Horowitz 2010) an einer Gruppe von 50 augenscheinlich nierengesunden Personen bestimmt. Alters- und Geschlechtsverteilung und die laborchemischen Basischarakteristika der Referenzgruppe sind nachfolgend zusammengefasst:

Tab. 19: Referenzkollektiv (n=50, MW +/- SD)

Geschlecht	M 23 / W 27		
Alter	53,5 +/- 14,2		
Kreatinin (Serum) (mg/dl)	0,77 +/- 0,17		
GGT (Serum) (U/l)	40,1 +/- 44,6	GGT-Ausscheidung: (U / g Krea)	53,6 +/- 19,0
LDH (Serum) (U/l)	192 +/- 95,90	LDH-Ausscheidung: (U / g Krea)	17,2 +/- 15,8
AP (Serum) (U/l)	72 +/- 23,2	AP-Ausscheidung: (U / g Krea)	4,6 +/- 2,5

Die Darstellung der Messwerte der Referenzgruppe im Häufigkeitshistogramm (Abb. 20 und Abb. 21, jeweils obere Darstellung) zeigt, dass für GGT- und LDH-Enzymaktivitäten im Urin eine linkssteile/rechtschiefe Verteilung vorliegt. Normalverteilung als Voraussetzung für das Quantilverfahren konnte erst durch geeignete Transformation der Messwerte (ln-Transformation bei GGT, höhergradige Transformation bei LDH) erreicht werden (Abb. 20 und Abb. 21, jeweils untere Darstellung). Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte durch Shapiro-Wilk Test und QQ-Plot (nicht dargestellt). Aus den transformierten Verteilungen wurden dann die 2,5%- und 97,5%-Perzentilen bestimmt.

Damit lassen sich die zentralen 95%-Referenzbereiche wie folgt angeben:

GGT (Urin): 24,4 bis 100,4 U / g Krea

LDH (Urin): 2,5 bis 48,8 U / g Krea

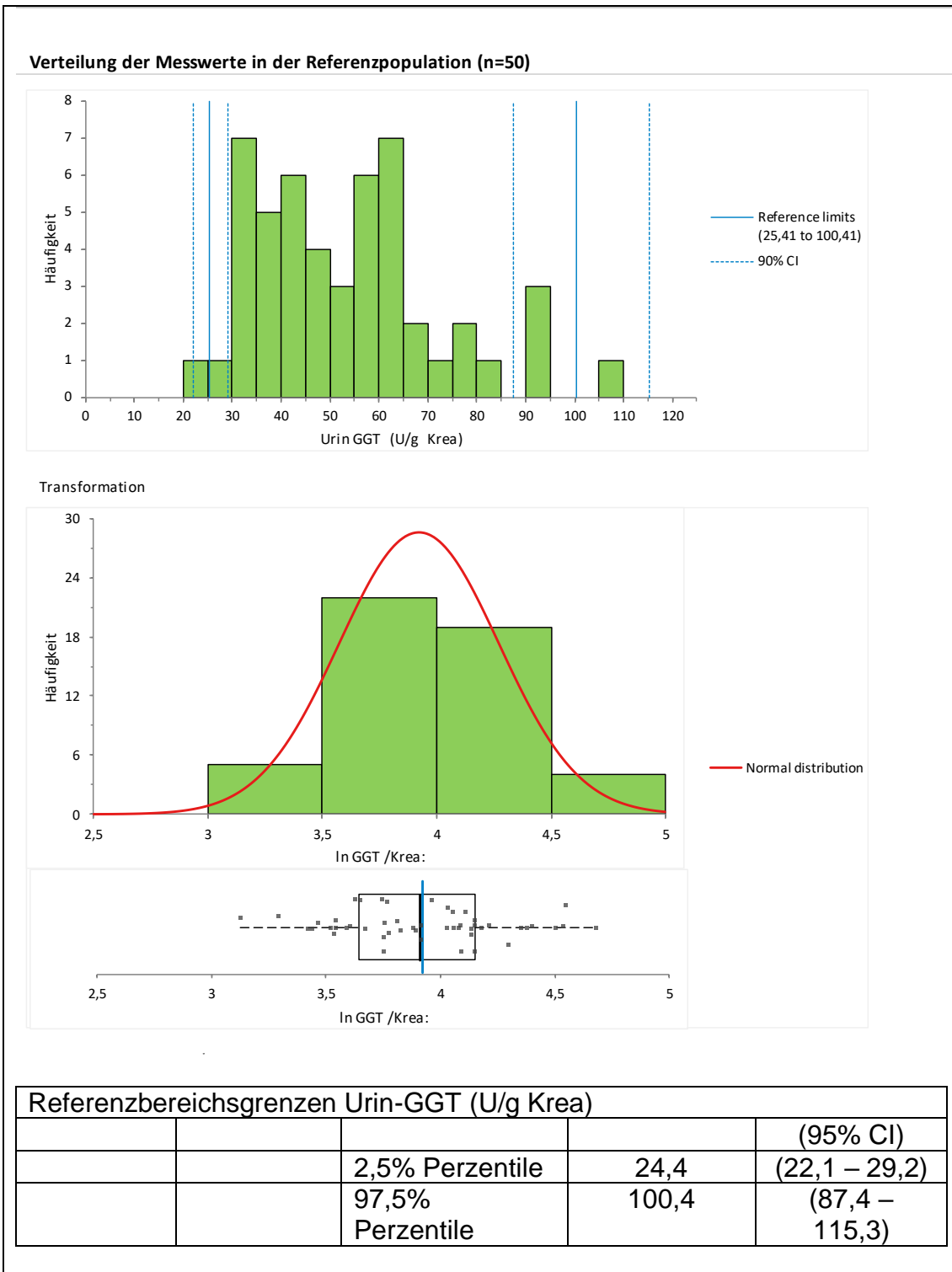


Abb. 20: GGT-Ausscheidung im Urin. Bestimmung der Referenzbereichsgrenzen aus einer Referenzgruppe (n=50) von Nierengesunden.

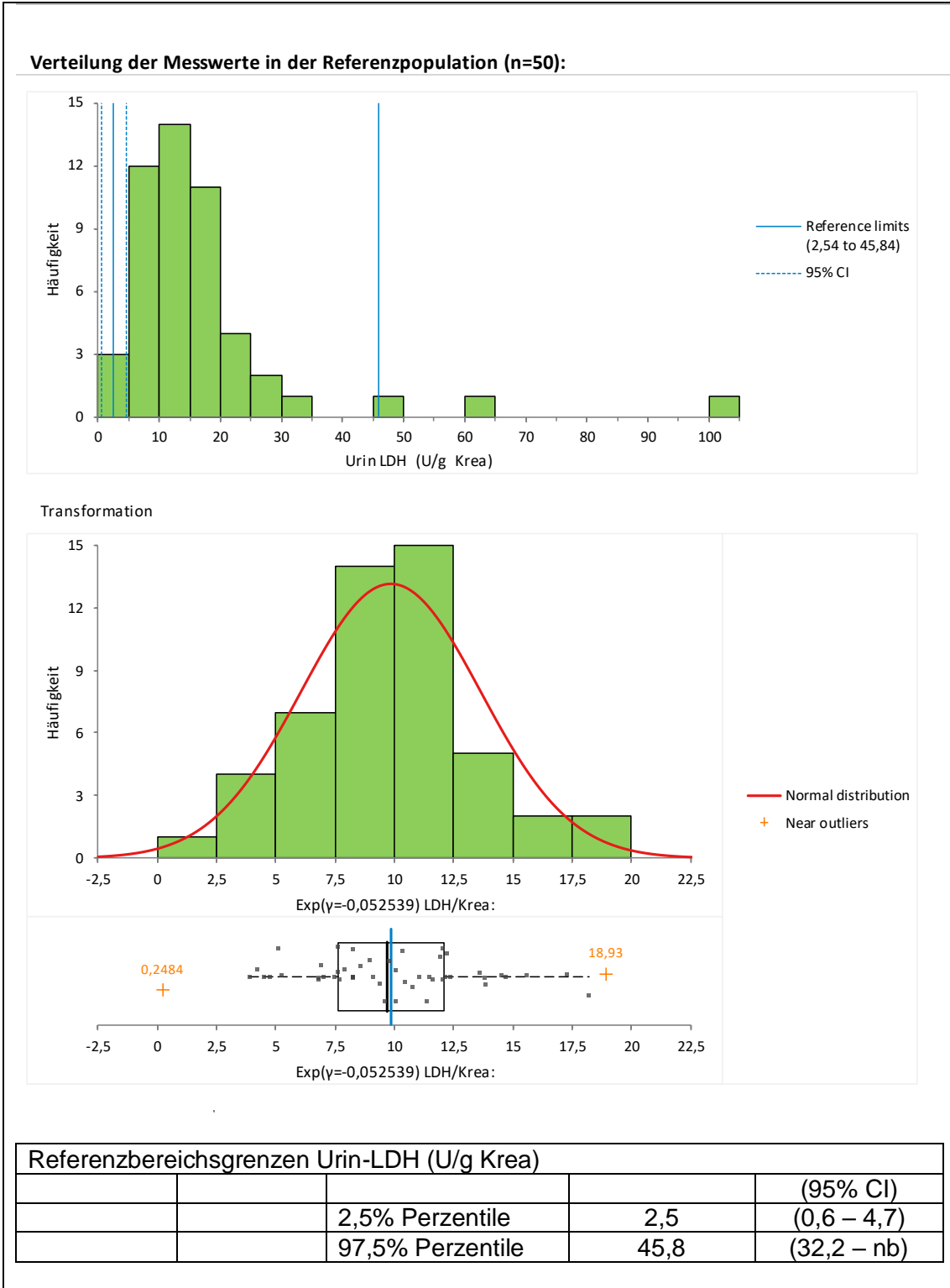


Abb. 21: LDH-Ausscheidung im Urin. Bestimmung der Referenzbereichsgrenzen aus einer Referenzgruppe (n=50) von Nierengesunden (nb = nicht bestimmbar), CI=Kofidenzintervall.

3.8 Korrelation Urin/Serum Enzymaktivitätswerte

Wie in Abb. 22 und Abb. 23 dargestellt korrelieren Serum- und Urinaktivitäten bei GGT und LDH nicht wesentlich miteinander (GGT: $r = 0,075$, LDH: $r = 0,396$).

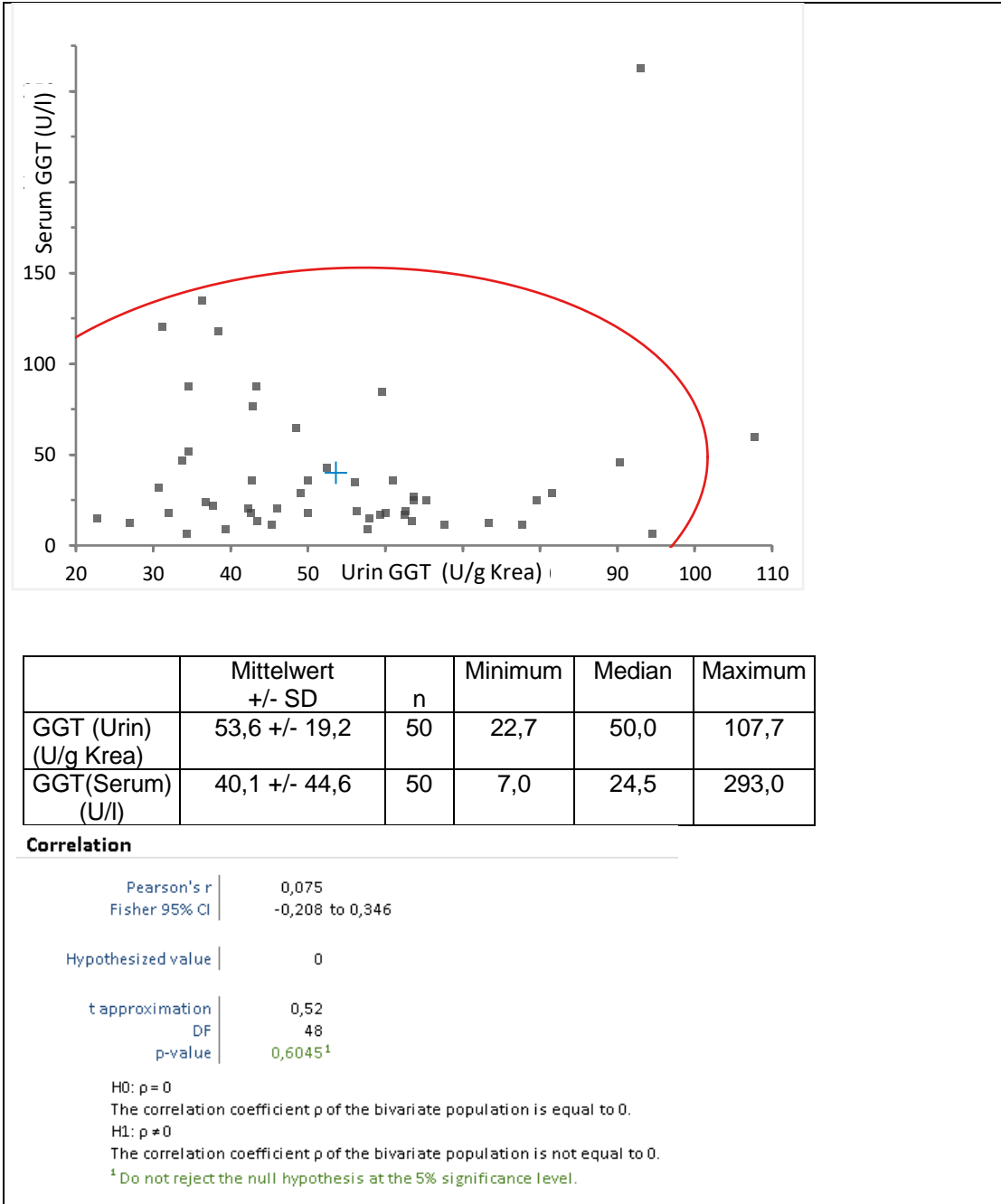


Abb. 22: Korrelation von Urin-GGT-Ausscheidung zur Serum-GGT-Aktivität (n=50 nierengesunde Normalpersonen).

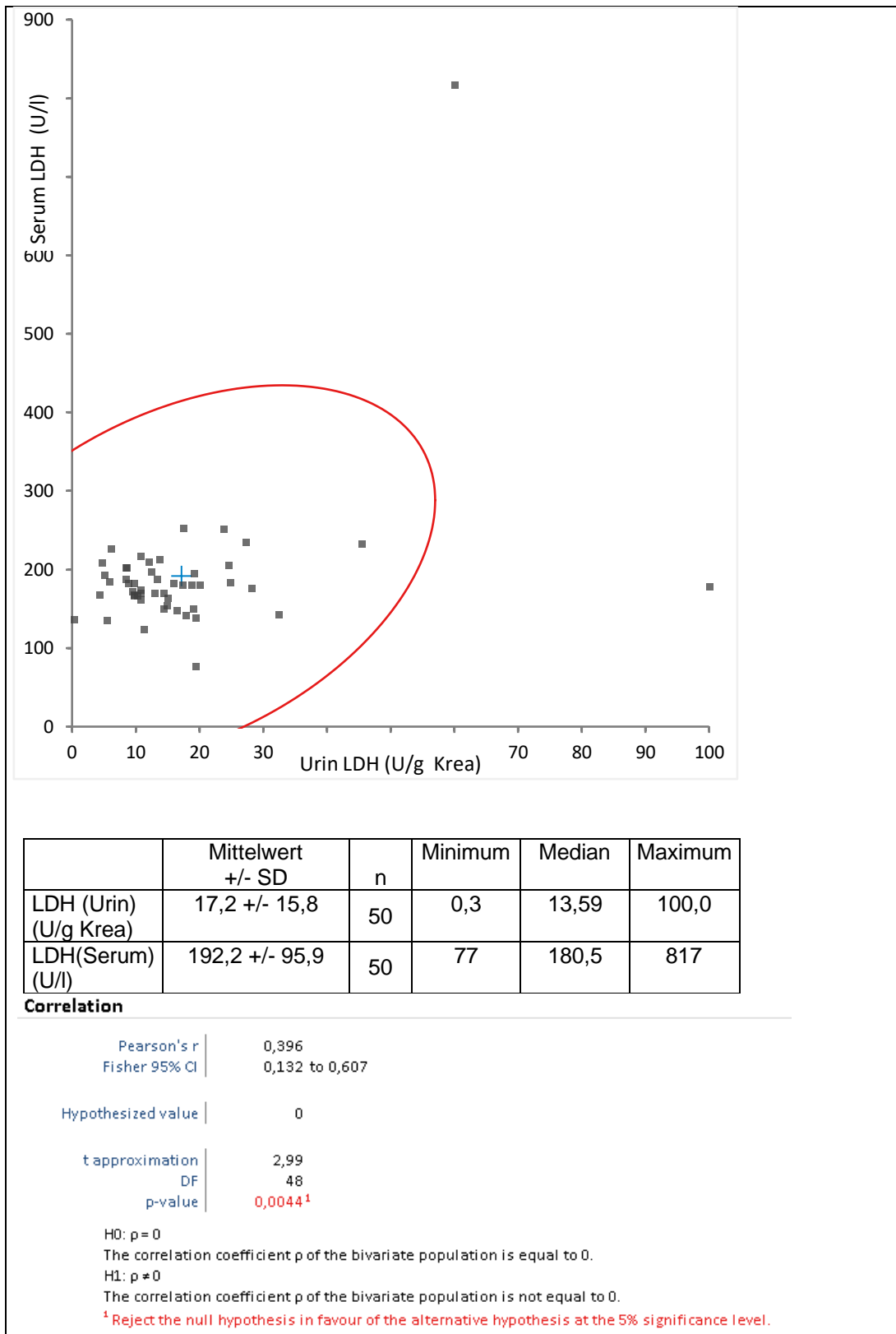


Abb. 23: Korrelation von Urin-LDH-Ausscheidung zur Serum-LDH-Aktivität (n=50 nierengesunde Normalpersonen).

3.9 Untersuchung der Enzymausscheidung im Langzeitverlauf

Abb. 24 zeigt die Ausscheidung von GGT und LDH bei 12 Probanden im Verlauf über 3 Monate. Dabei ergibt sich eine hohe intra- und interindividuelle Variabilität der ausgeschiedenen Enzymaktivitäten. Es ergibt sich kein klarer Hinweis auf individual-charakteristische Ausscheidungsniveaus oder -muster.

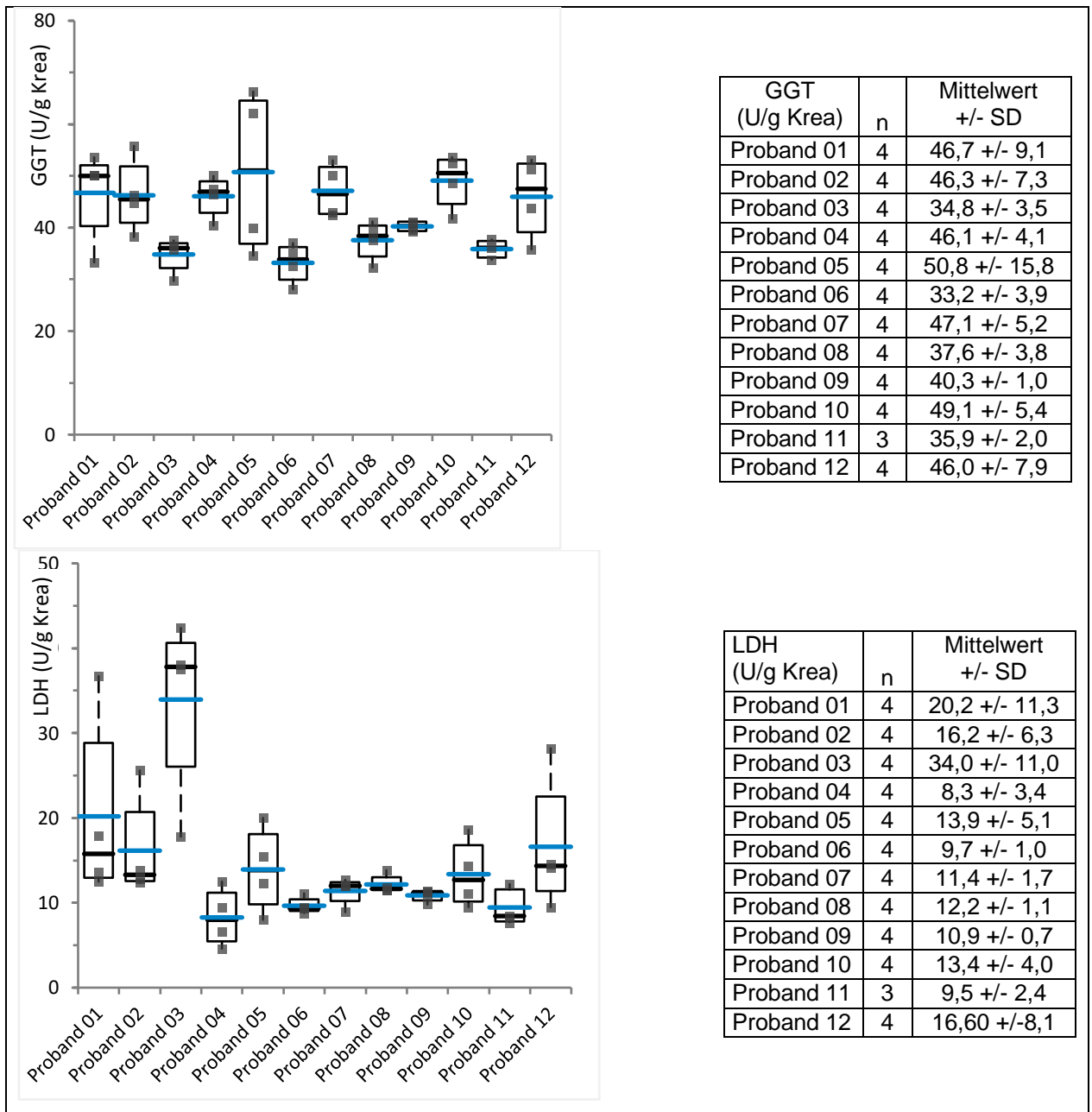


Abb. 24: Intraindividuelle und interindividuelle Variation von GGT Ausscheidung und LDH-Ausscheidung bei 12 nierengesunden Probanden (Beobachtungszeitraum 3 Monate). Boxplot-Darstellung mit Kennzeichnung von Median (schwarzer Balken), Mittelwert (blauer Balken), zentralem Interquartilsabstand (IQR, Box).

3.10 Vergleich von Normalkollektiv mit Substitutionskollektiv

In Abb. 25 bis Abb. 28 sind die messbaren Enzymaktivitäten im Normalkollektiv und bei Substitutionspatienten unter den ausgewählten Lagerungsbedingungen verglichen. Aufgrund der breiten Verteilung der Messwerte erfolgt die Darstellung direkt als ermittelte, Kreatinin-bezogene Enzymaktivitäten (Abb. 25-28, jeweils oben) und als relative Restaktivität, die auf den Ausgangswert der frischen Urinproben normiert wurde (Abb. 25-28, jeweils unten).

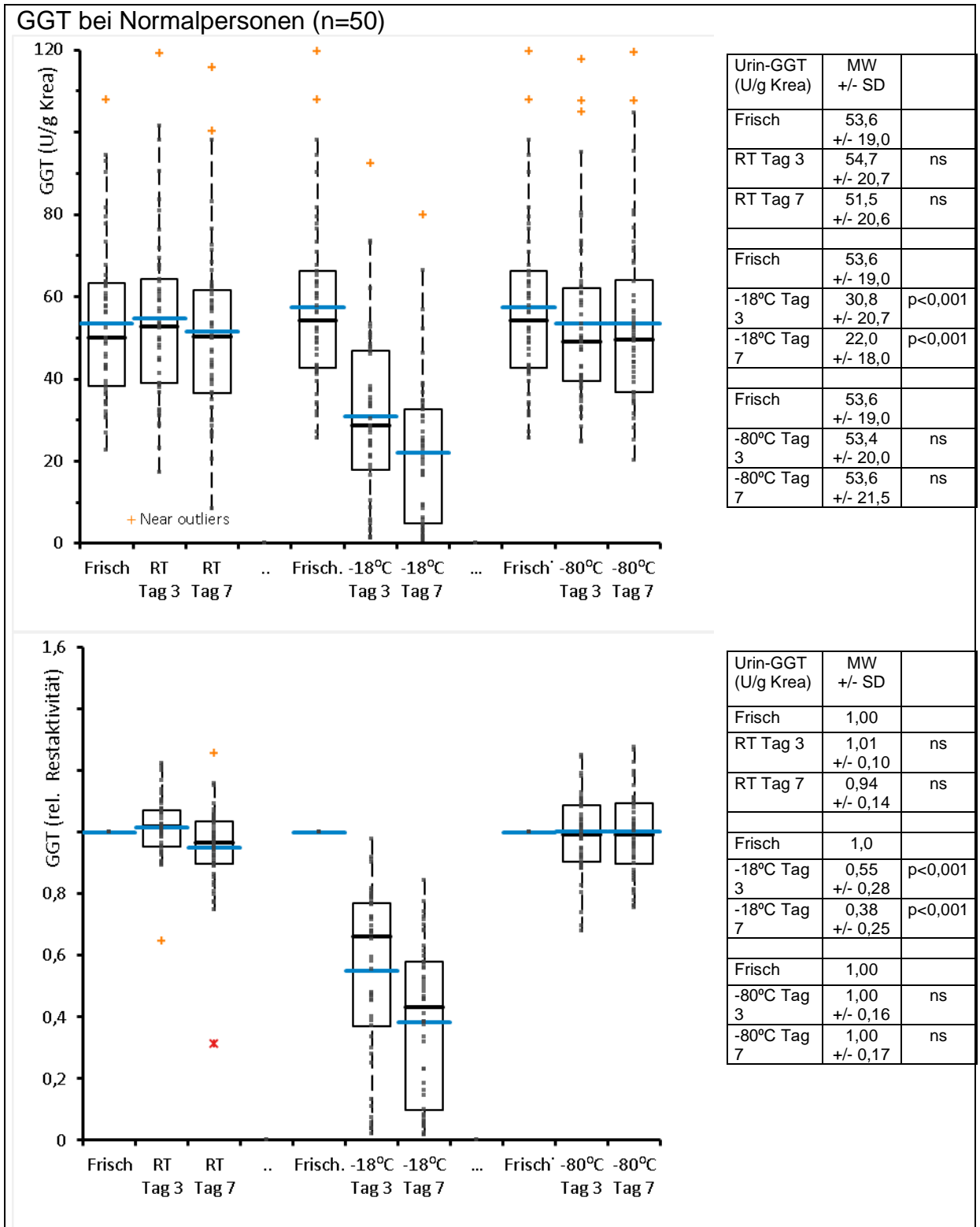


Abb. 25: Aktivitätsabnahme der GGT im Urin von Normalpersonen (n=50) unter unterschiedlicher Lagerung. Darstellung als absolute Restaktivität (in U/g Krea, oben) und relativ zum Ausgangswert (rel. Restaktivität, unten). Teststatistik nach Dunnett, jeweils gegen den Ausgangswert (frisch), ns= nicht signifikant. Boxplot-Darstellung mit Kennzeichnung von Median (schwarze Balken), Mittelwert (blaue Balken), zentralem Interquartilsabstand IQR, Box) und Ausreißern (+: near outlier, 1,5 bis ≤ 3,0 x IQR; x: far outlier > 3,0 x IQR).

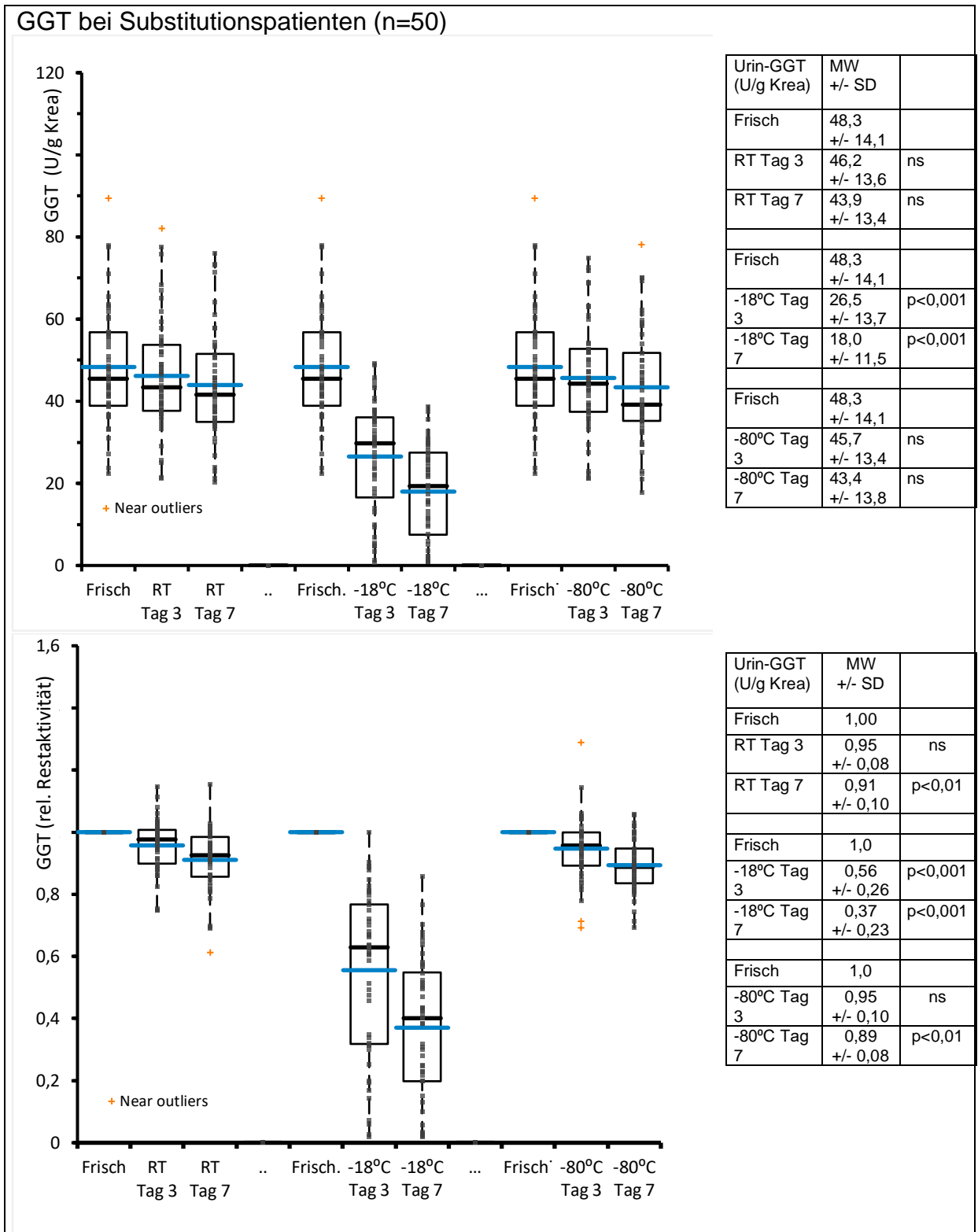


Abb. 26: Verteilung und Aktivitätsabnahme der GGT im Urin von Substitutionspatienten unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen.

(Aliquotierte Urine von n=50 Substitutionspatienten, Teststatistik nach Dunnett, jeweils gegen den Ausgangswert (frisch), ns= nicht signifikant, Legende wie oben)

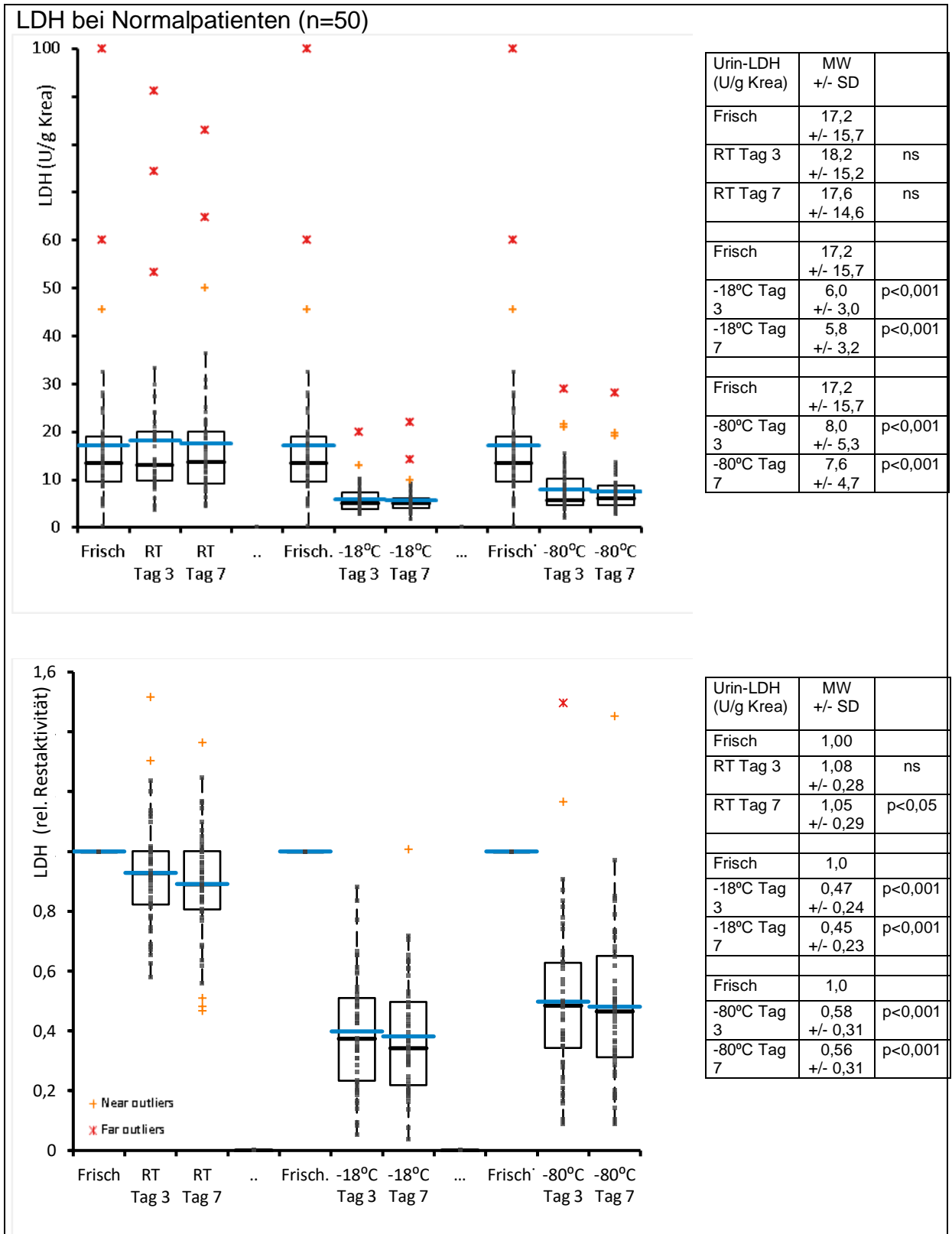


Abb. 27: Verteilung und Aktivitätsabnahme der LDH im Urin von Normalpersonen unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen. (Aliquotierte Urine von n=50 Normalpersonen, Teststatistik nach Dunnett, jeweils gegen den Ausgangswert (frisch), ns= nicht signifikant, Legende wie oben)

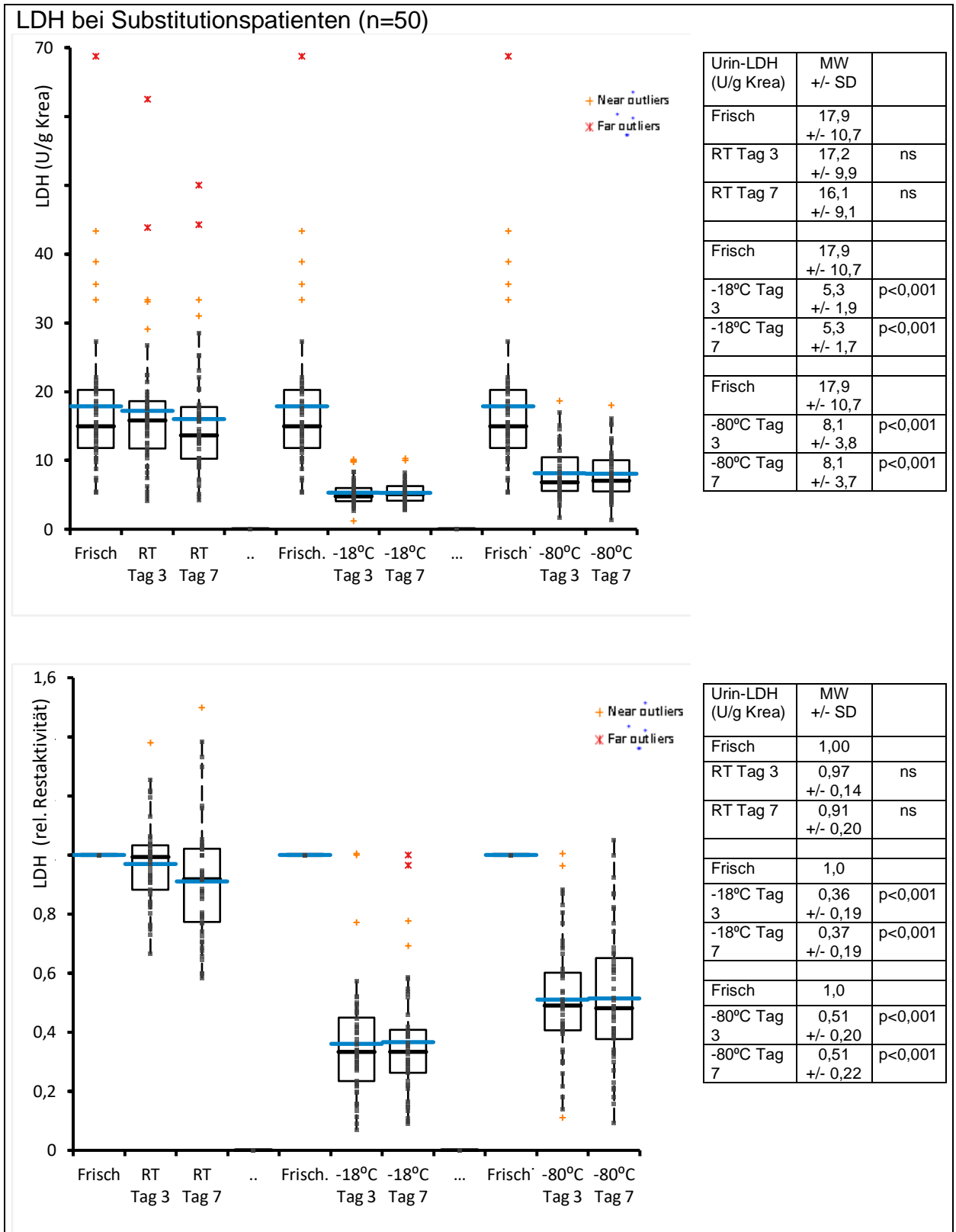


Abb. 28: Verteilung und Aktivitätsabnahme der LDH im Urin von Substitutionspatienten unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen. (Aliquotierte Urine von n=50 Substitutionspatienten, Teststatistik nach Dunnett, jeweils gegen den Ausgangswert (frisch), ns= nicht signifikant, Legende wie oben)

3.11 Bestimmung der Entscheidungsgrenzen für eingefrorene Proben

Die Grenzwerte der Enzymausscheidung, mit denen gefroren-gelagerte Urinproben von nativen Proben abgegrenzt werden können (Entscheidungsgrenze, Cut-off), wurden nach Protokoll CSLI EP24-A2 bestimmt (Kroll 2011).

Dazu wurden 100 Urinproben (50 Normalpatienten, Substitutionspatienten) nativ und nach 7-tägiger Lagerung bei -18°C gemessen und verglichen. Die Urine von Normal- und Substitutionspersonen konnten zusammengefasst werden, da sich, wie in Abschnitt 3.10 und den Abb. 25 bis 28 dargestellt, die Wertelage und der Verlauf der Enzymaktivitäten zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschieden hatte. Für GGT zeigt sich sowohl in frischen Proben (Normalpersonen (NP) $53,6 \pm 19,0$ vs. Substitutionspatienten (SP) $48,3 \pm 14,1$ U GGT/g Krea; ns) als auch in gefroren-gelagerten (-20° , 7 Tage) Proben (NP $22,0 \pm 18,0$ vs. SP $18,0 \pm 11,5$ U/g Krea; ns) kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Personengruppen. Auch der Vergleich der LDH-Aktivitäten zeigt keinen signifikanten Unterschied sowohl für frischen Urin (NP $17,2 \pm 15,7$ vs. SP $17,9 \pm 10,7$ U LDH /g Krea; ns) als auch in den gefroren-gelagerten (-20° , 7 Tage) Urinproben (NP $5,8 \pm 3,2$ vs. SP $5,3 \pm 1,7$ U/g Krea; ns).

Der gewählte Vergleichszeitpunkt (7 Tage Lagerung) wurde aufgrund der Beobachtung gewählt, dass die Aktivitätsabnahme unter Gefrierlagerung bei beiden Enzymen unterschiedlich rasch abläuft. Wie in den Untersuchungen zur Lagerstabilität (Abschnitt 3.4) dargestellt, sinkt die LDH-Aktivität im Gefrierschrank (-18°C) bereits innerhalb von 24 Stunden auf unter 40% der Anfangsaktivität ab (vgl. Abb. 15). Die Abnahme der GGT-Aktivität bei -18°C verläuft kontinuierlich und langsamer und hat erst nach 7 Tagen ein vergleichbares Niveau (unter 40% der Anfangsaktivität) erreicht (Abb. 13). Erst nach 7 Tagen Lagerung kann für beide Enzyme ein vergleichbarer und ausreichend großer Effekt (mindestens 60% Aktivitätsabnahme) genutzt werden, der eine sichere Trennung der Proben vor dem Hintergrund der intra- und interindividuell stark variierenden Enzymausscheidung ermöglichen kann.

Der gewählte lange Zeitpunkt (7 Tage Gefrierlagerung) bringt für die Fragestellung bei Substitutionspatienten keinen Nachteil. Substitutionspatienten können den in Täuschungsabsicht aufbewahrten eigenen drogenfreien Urin nur über einen längeren Zeitraum (von Wochen oder Monaten) vor der Abgabe gewonnen haben, eine kurzfristige Gewinnung und Einlagerung (von nur wenigen Tage zuvor) würde aufgrund der Halbwertszeiten der untersuchten Analyte und der Untersuchungsintervalle in den Überwachungsprogrammen keinen Sinn machen.

Die Messwertverteilungen für beide Probenzustände (frisch/gefroren-gelagert) sind für GGT in Abb. 29 (in U /g Krea und Abb. 30 (als relative Restaktivität) und für LDH in Abb. 31 (in U / g Krea) und Abb. 32 (als relative Restaktivität) dargestellt. In einer ROC (Receiver Operating Characteristics)-Analyse wurde der Grenzwert zwischen beiden Verteilungen so lange variiert bis die Fläche unter der ROC-Kurve und der Youden-Index ein Maximum erreicht. Beide Kennzahlen bilden ein Maß für den optimalen Kompromiss zwischen ausreichender Sensitivität und möglichst günstiger Spezifität. Das Auftreten falsch positiver und falsch negativer Werte wurde bei der Ermittlung gleich gewichtet.

Unter den genannten Voraussetzungen liegt die günstigste Entscheidungsgrenze für GGT bei 33,2 U/g Krea (Abb. 29) und für LDH bei 8.4 U/g Krea (Abb. 31). Sofern Zweipunktmessungen vorliegen und die relativen Restaktivitäten ermittelt werden können, liegt der optimale Cut-off für GGT bei einer Restaktivität von 0,69 (d.h. bei 69% vom Ausgangswert, Abb. 30) und für LDH bei einer Restaktivität von 0,63 (d.h. bei 63% vom Ausgangswert, Abb. 32).

GGT Enzymaktivität

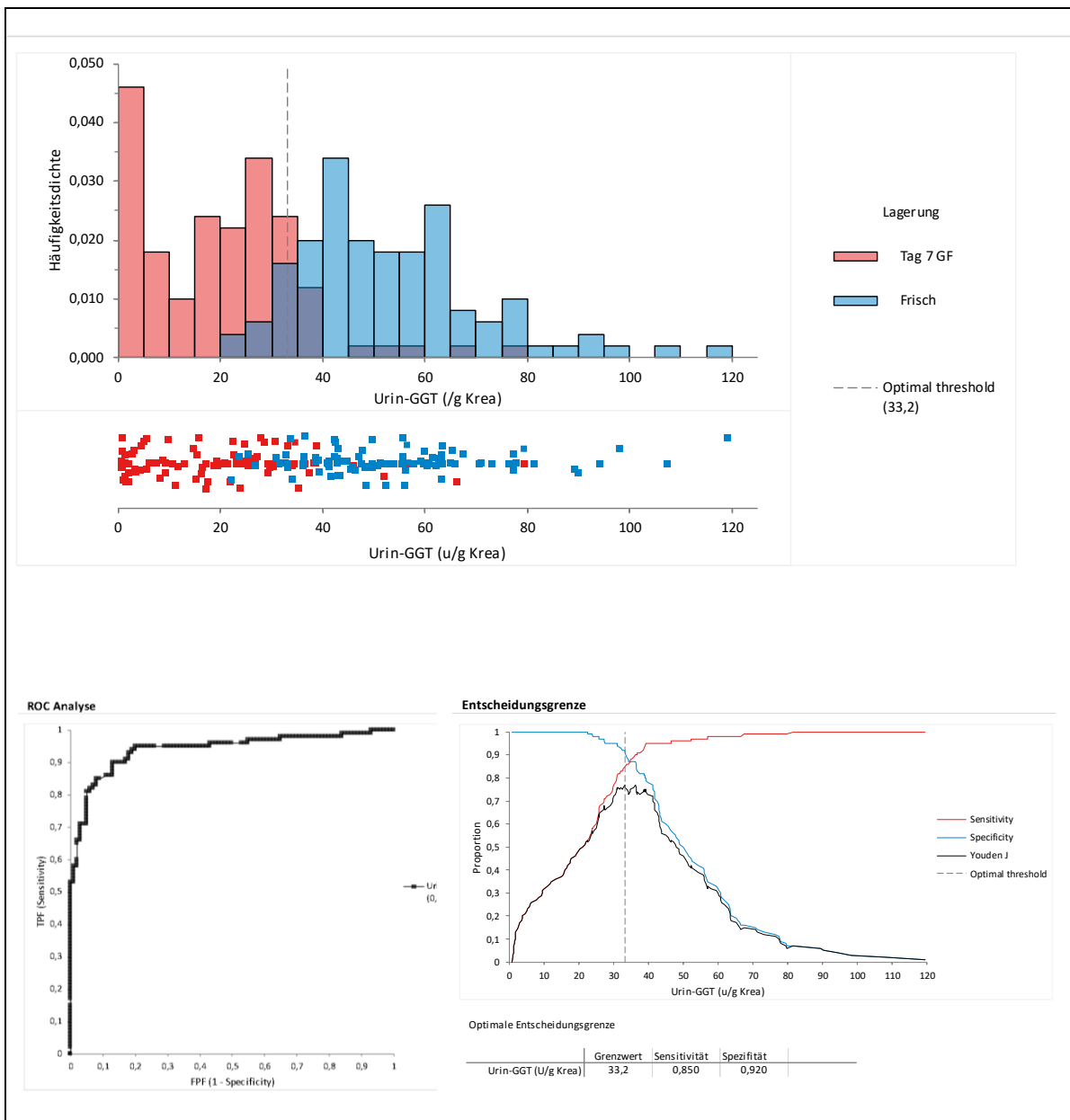


Abb. 29: GGT-Aktivität im Urin. Bestimmung der Entscheidungsgrenze zur Differenzierung von frischen und gefroren-gelagerte (-18°C, 7 Tage) Proben (gesplittete Urinprobenpaare von n=100 Individuen).

GGT relative Restaktivität

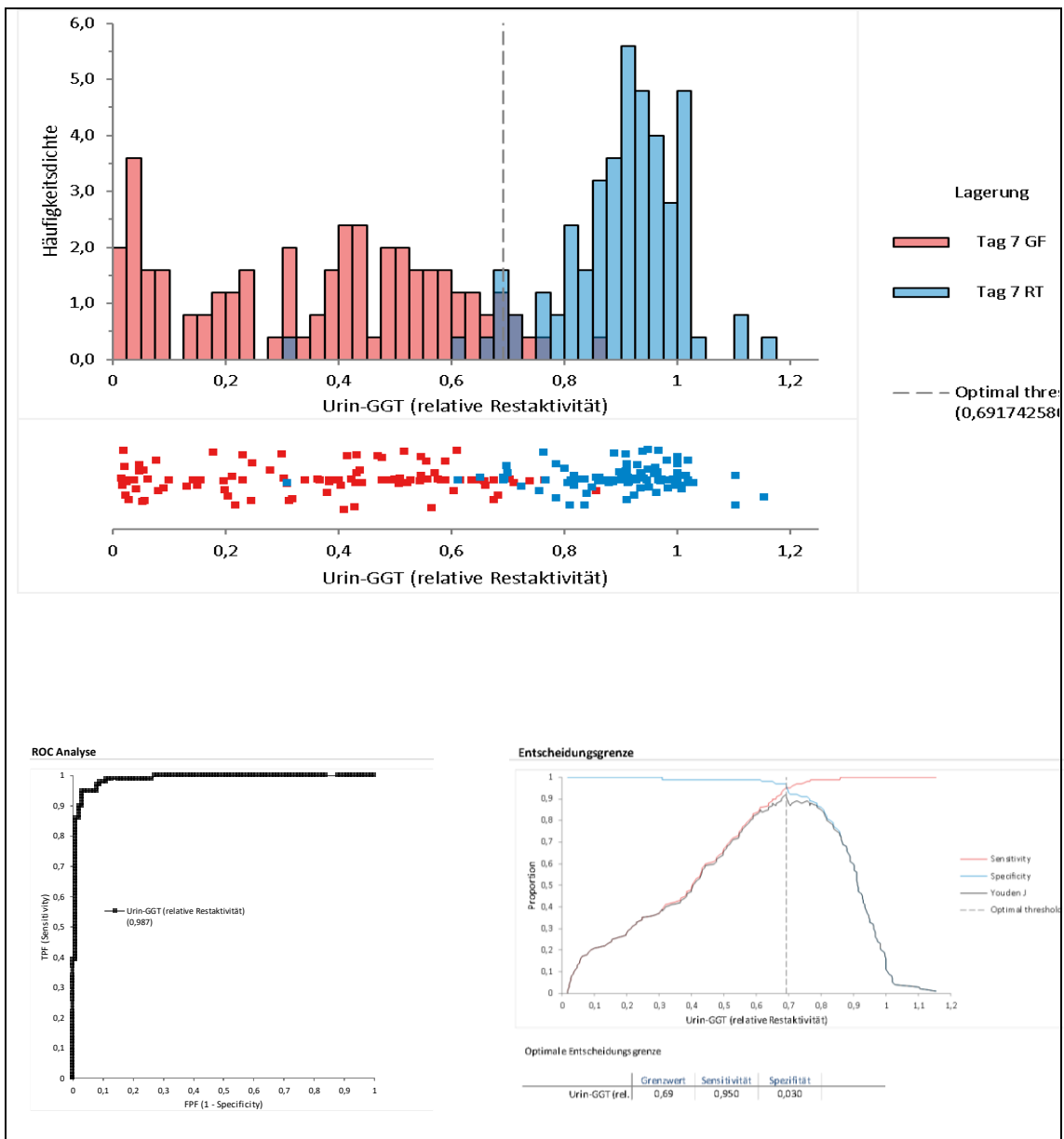


Abb. 30: Relative GGT-Restaktivität nach Lagerung. Bestimmung der Entscheidungsgrenze (als rel. Restaktivität im Verhältnis zum Ausgangswert) zur Differenzierung von frischen und gefroren-gelagerten (-18°C, 7 Tage) Proben (gesplittete Urinprobenpaare von n=100 Individuen).

LDH Enzymaktivität

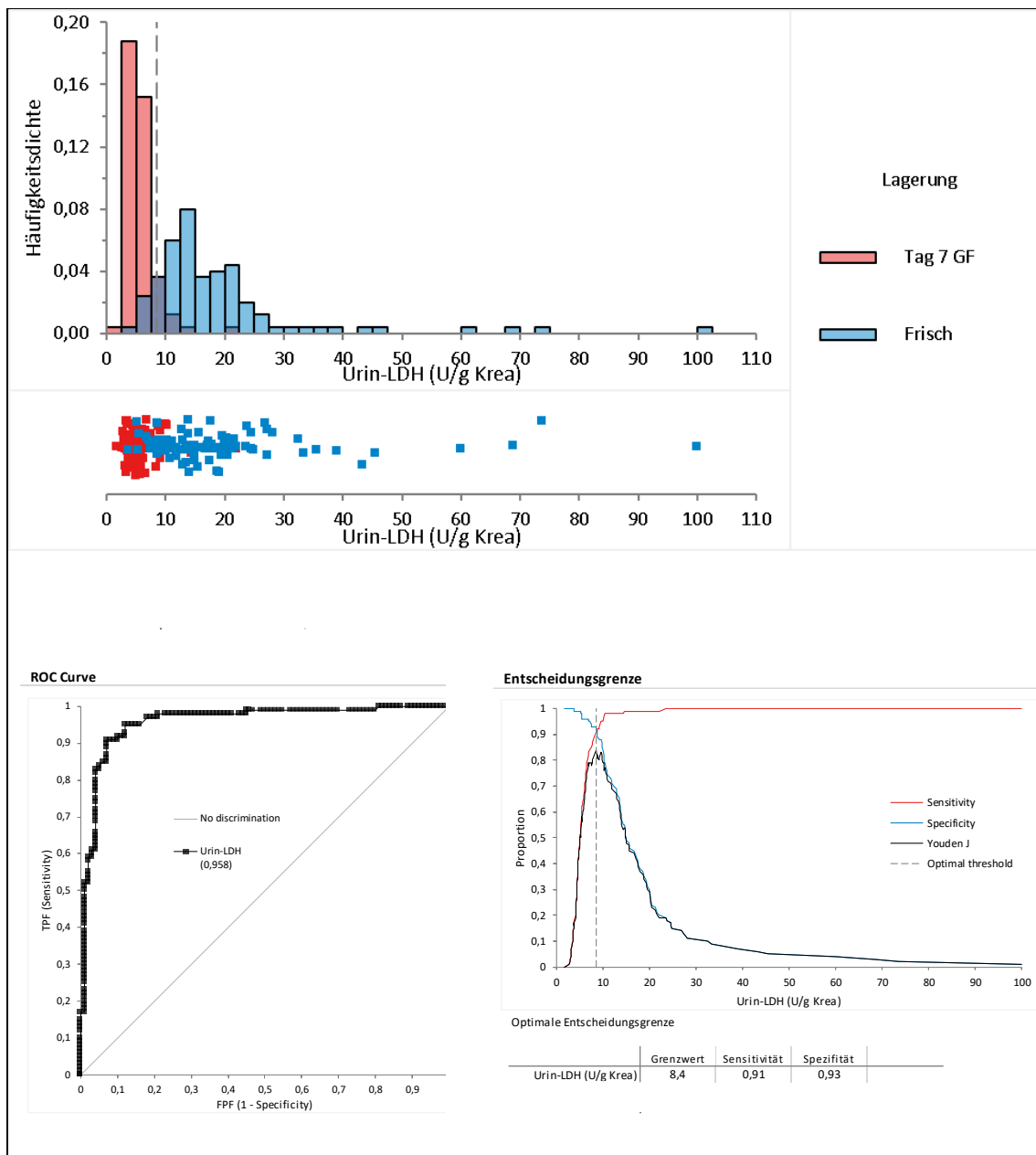


Abb. 31: LDH-Aktivität im Urin. Bestimmung der Entscheidungsgrenze zur Differenzierung von frischen und gefroren-gelagerten (-18°C, 7 Tage) Proben (gesplittete Urinprobenpaare von n=100 Individuen).

LDH relative Restaktivität

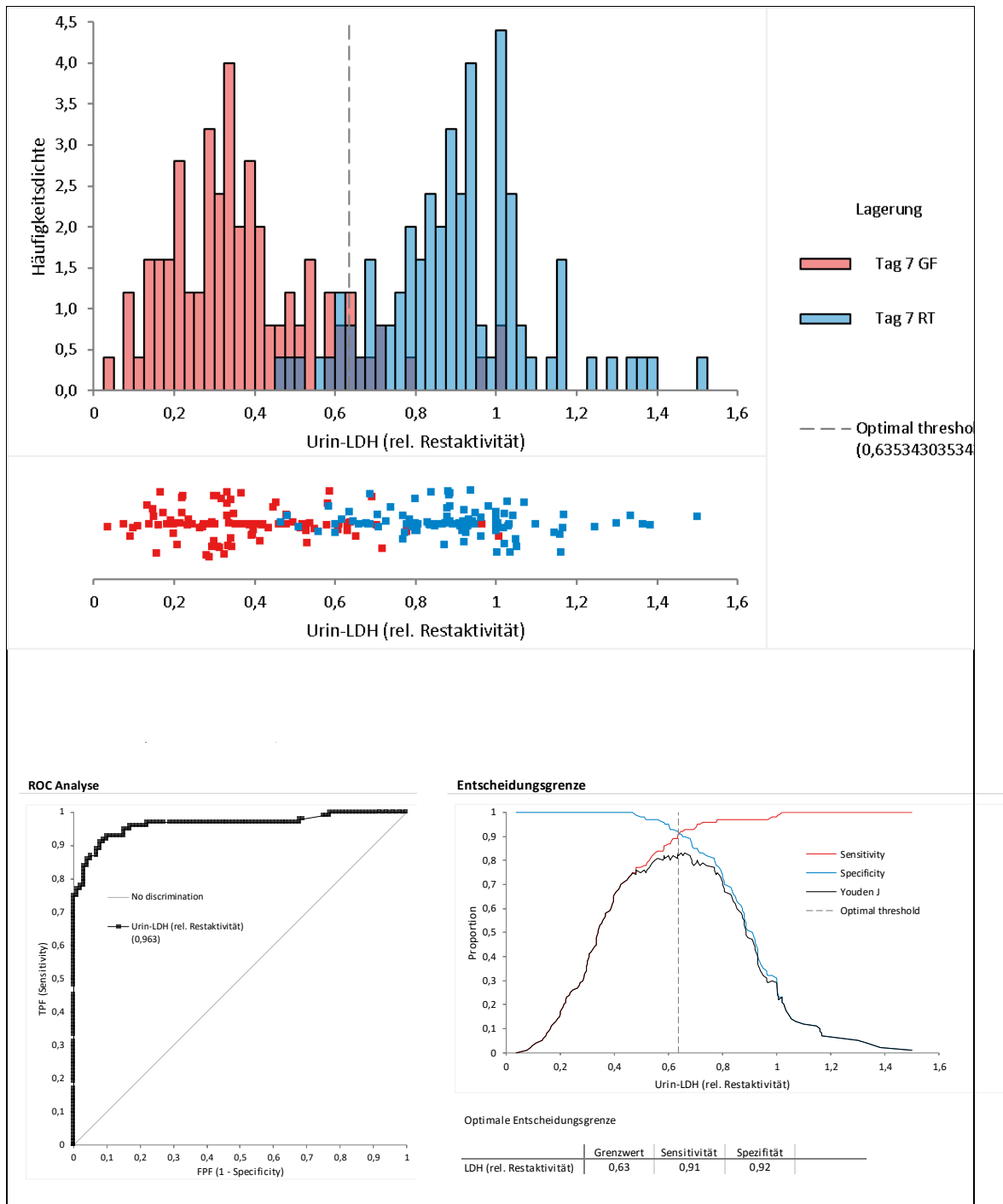


Abb. 32: Relative LDH-Restaktivität nach Lagerung. Bestimmung der Entscheidungsgrenze (als rel. Restaktivität im Verhältnis zum Ausgangswert) zur Differenzierung von frischen und gefroren-gelagerten (-18°C, 7 Tage) Proben (gesplittete Urinprobenpaare von n=100 Individuen).

3.11.1 Cut-off für LDH zur Erkennung von tiefgefrorenen Proben (-80°C)

In Abb. 33 ist die Trennleistung der LDH-Aktivitätsmessung zur Erkennung von unter Tiefkühlbedingungen (-80°C) gelagerten Proben dargestellt

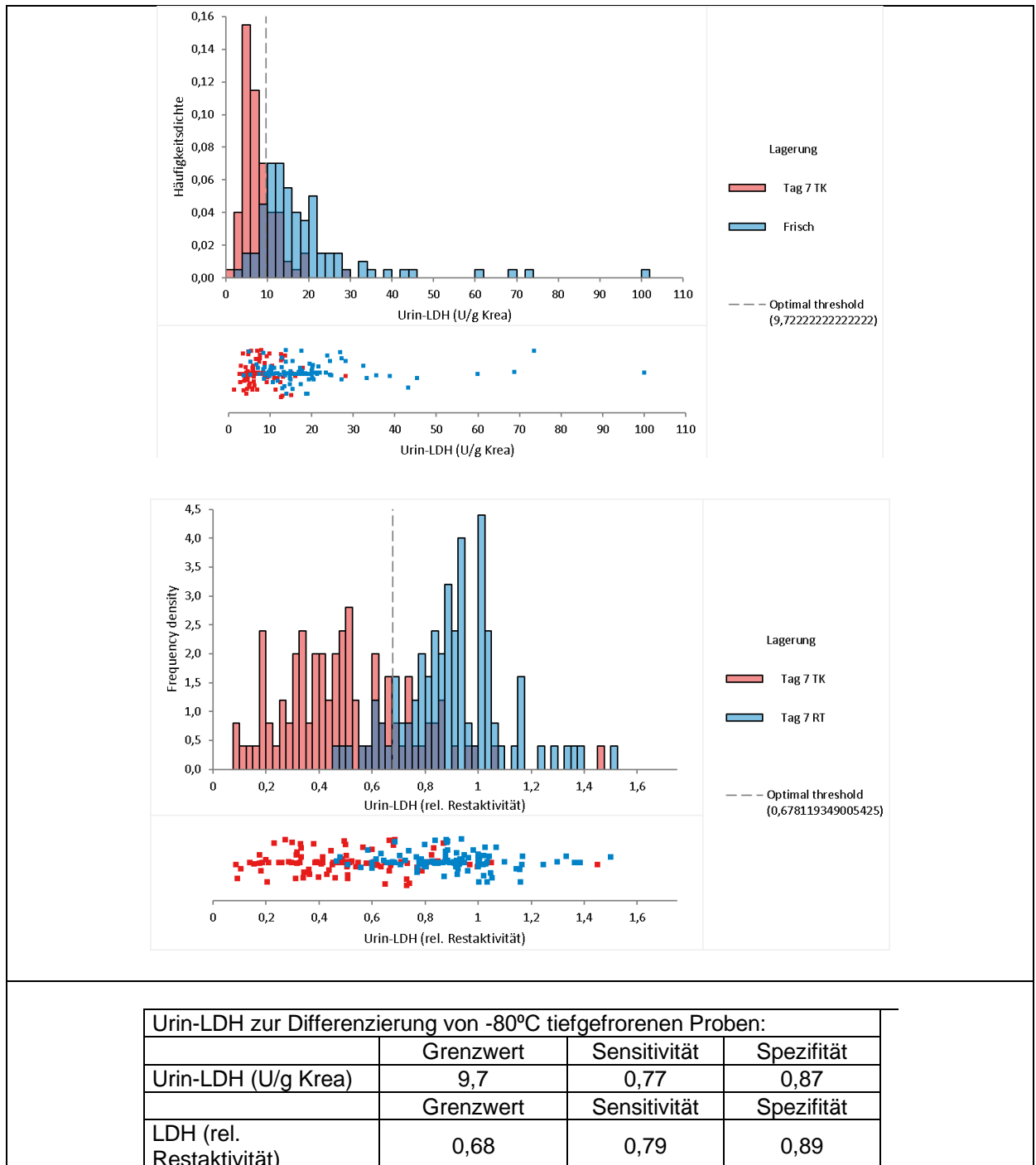


Abb. 33: Urin-LDH zur Erkennung von tiefgefroren (-80°C) gelagerten Proben (gesplittete Urinprobenpaare von n=100 Individuen).

3.12 Differenzierung von frischen und gefroren-gelagerten Urinproben

In Abb. 34 wurden die Messwertepaare (LDH/GGT-Enzymaktivität) aller 200 Urinbestimmungen aufgetragen und unter Zuhilfenahme der ermittelten Entscheidungsgrenzen bewertet.

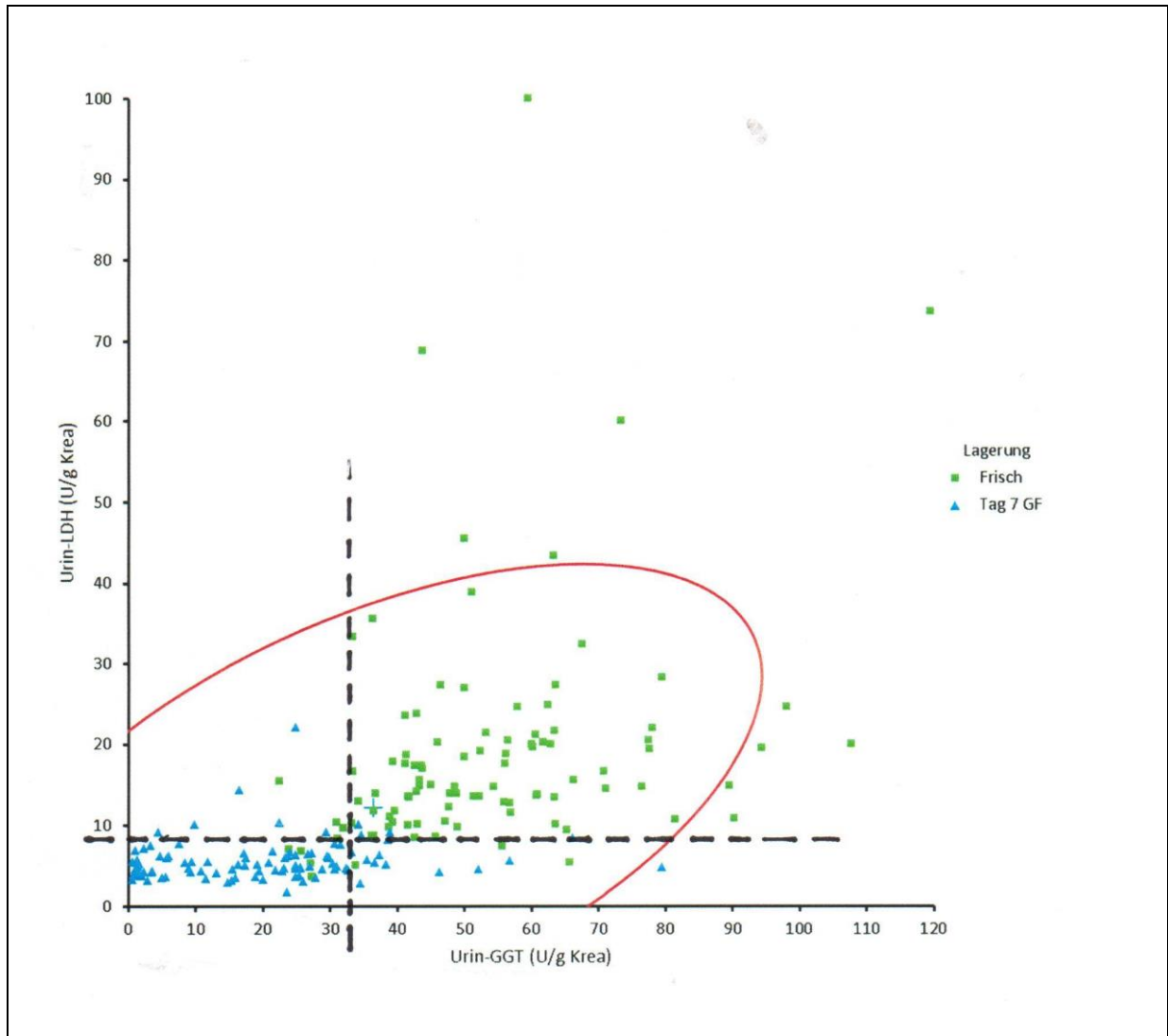


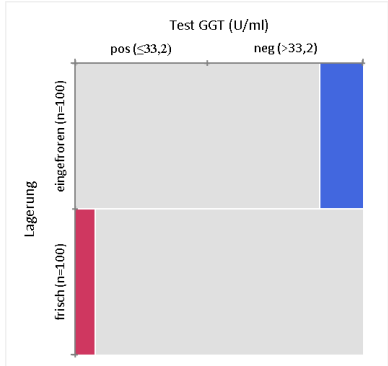
Abb. 34: Korrelation von Urin-GGT und Urin-LDH bei frischen und gefroren-gelagerten Proben. Aufgetragen sind n=200 Messwertepaare für GGT und LDH aus gesplittete Urinproben (frisch vs. gefroren-gelagert) von 100 Individuen.

3.12.1 Trennleistung von Einzelmarkerbestimmungen

Wenn nur eines der beiden Urinenzyme zur Entscheidung berücksichtigt wird, lassen sich die 200 Urinmessungen durch GGT bzw. LDH mit den nachfolgenden Leistungsdaten trennen (Tab. 20 und 21):

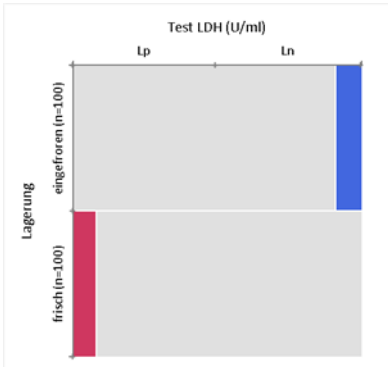
Tab. 20: Trennleistung der Urin-GGT zur Differenzierung frischer und gefroren-gelagerter (-18°C, entspricht „eingefroren“) Proben.

	Test GGT (U/g Krea)		Total
	pos ($\leq 33,2$)	neg ($> 33,2$)	
Eingefroren (-18°C)	85	15	100
Frisch	7	93	100
Total	92	108	200
Sensitivität:	85% (85/100)		
Spezifität:	93% (93/100)		



Tab. 21: Trennleistung der Urin-LDH zur Differenzierung frischer und gefroren-gelagerter (-18°C, entspricht „eingefroren“) Proben.

	Test LDH (U/g Krea)		Total
	pos ($\leq 8,4$)	neg ($> 8,4$)	
Eingefroren (-18°C)	91	9	100
Frisch	8	92	100
Total	99	101	200
Sensitivität:	91% (91/100)		
Spezifität:	92% (92/100)		



3.12.2 Trennleistung von Markerkombinationen

Einfache Rechenoperationen wie Summe, Produkte oder Quotienten der Enzymaktivitäten verbesserten Spezifität und/oder Sensitivität nicht.

Die kombinierte Bewertung beider Marker verbessert die Erkennungsraten. Tab. 22 zeigt die Trennleistung der Markerkombination GGT positiv/LDH positiv (GpLp), d.h. einen beobachteten Aktivitätsverlust in beiden untersuchten Enzymen angewendet auf alle 200 Urinbestimmungen. Die Ergebniskombination GpLp weist die höchste Stringenz auf und sollte möglichst wenige der frischen Urine fälschlicherweise als gefroren-gelagerte identifizieren (geringste Falschpositivrate, höchste Spezifität).

Bei frischen Urinen wurde die Ergebniskombination GpLp in 3 von 100 Proben gefunden. Damit wurden nur 3 Urinproben als falsch-positiv bestimmt entsprechend einer Spezifität von 97%. Damit wäre die Markerkombination GpLp zur sicheren Identifizierung von frischen Urinen geeignet, nicht jedoch zum Auffinden von gefroren-gelagerten Urinproben (Sensitivität nur 79%).

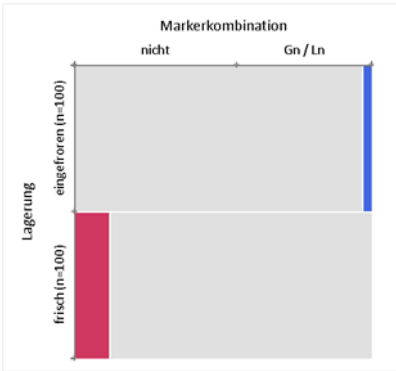
Tab. 22: Trennleistung der Markerkombination GGT pos/LDH pos (GpLp) bei der Differenzierung frischer und gefroren-gelagerter (-18°C, hier „eingefroren“) Proben. Anwendung auf alle 200 untersuchten Urinproben (n=200).

	Markerkomb.GGT pos/LDH pos (GpLp)		
	Gp/Lp	nicht	Total
Eingefroren (-18°C)	79	21	100
Frisch	3	97	100
Total	82	118	200
Sensitivität:	79% (79/100)		
Spezifität:	97% (97/100)		

Tab. 23 zeigt die Trennleistung der Markerkombination GGT negativ/LDH negativ (GnLn) der Ergebniskombination für maximale Sensitivität, mit der 97 von 100 gefroren-gelagerte Proben sicher identifiziert wurden (Sensitivität 97%, Falschnegativrate 3%), allerdings bei einer reduzierten Spezifität von nur noch 88%.

Tab. 23: Trennleistung der Markerkombination GGT neg/LDH neg (GnLn) bei der Differenzierung frischer und gefroren-gelagerter (-18°C, hier „eingefroren“) Proben. Anwendung auf alle 200 untersuchten Urinproben (n=200).

	Markerkomb. GGT neg/LDH neg (GnLn)		
	Gn/Ln	nicht	Total
Eingefroren (-18°C)	97	3	100
Frisch	12	88	100
Total	109	91	200
Sensitivität:	97% (97/100)		
Spezifität:	88% (88/100)		



Auf den erheblichen Nachteil einer mangelhaften Spezifität in der Beschreibung von Zuständen mit niedriger Prävalenz und Vortestwahrscheinlichkeit wird nachfolgend noch eingegangen werden.

3.13 Klassifizierung indifferenter Testresultate ohne Bewertung

Nach der Beobachtung, dass 27/200 Untersuchungen diskordante Ergebnisse bei der Bewertung der Enzymaktivitäten ergeben hatten, wurden diese diskordanten Messungen als indifferente Ergebnisse gewertet und aus der Beurteilung des Einfrierstatus ausgeschlossen.

Abb. 35 zeigt die Verteilung der restlichen 173/200 Untersuchungen und die Einordnung anhand der ermittelten Entscheidungsgrenzen

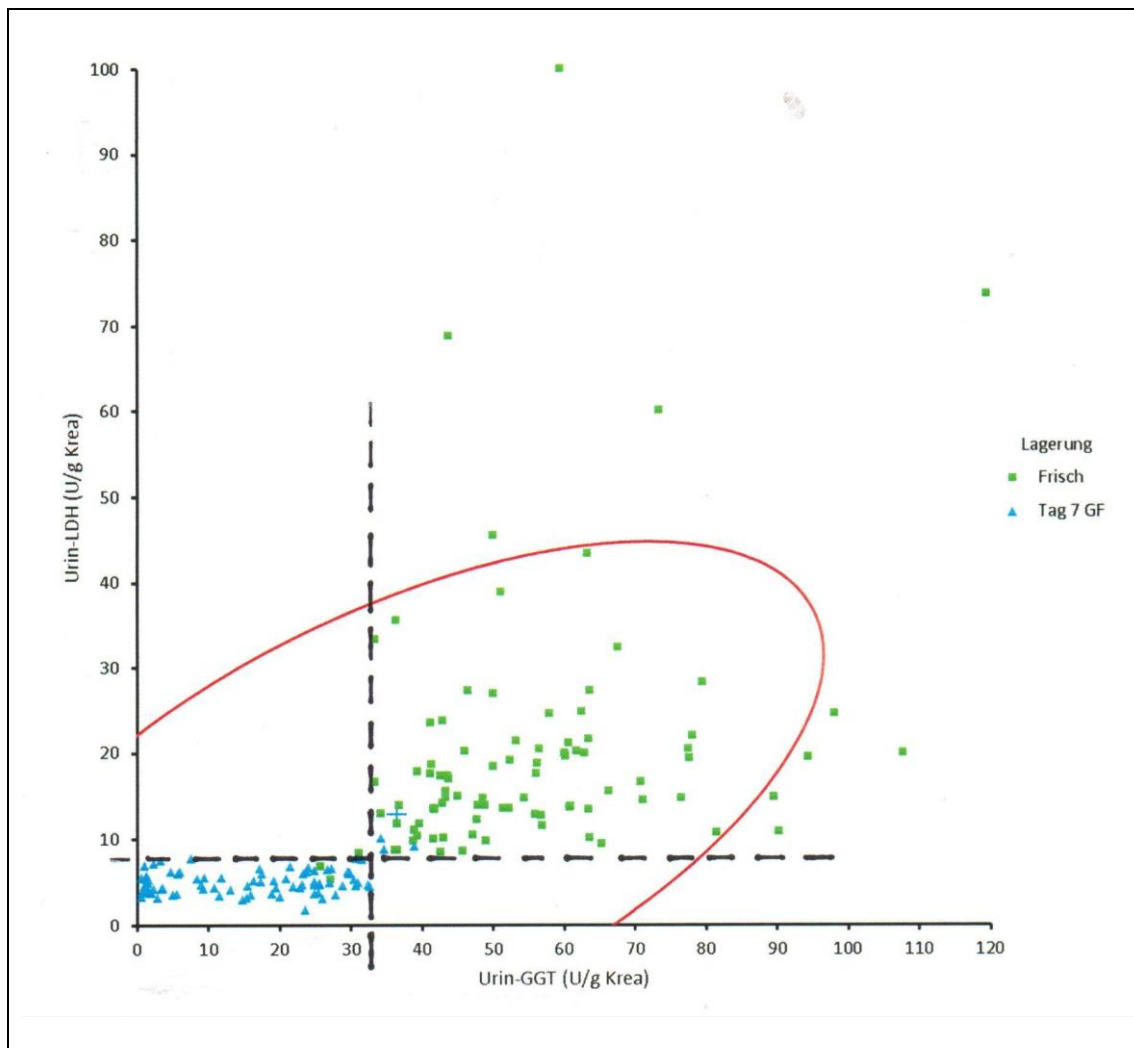


Abb. 35: Reduktion der Daten aus Abb 34 auf die übrigbleibenden 173 Messwertpaare mit konkordanter GGT- und LDH-Aktivitätsmessung (GGT und LDH entweder konkordant \leq Cut-off (linker unterer Quadrant) oder kondordant $>$ Cut-off (rechter oberer Quadrant)).

3.14 Leistungsfähigkeit der kombinierten Enzymbestimmungen

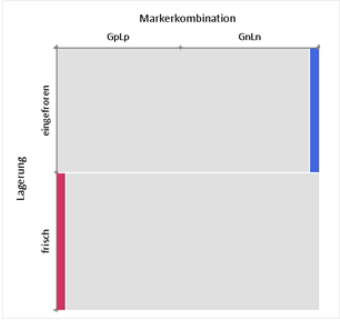
3.14.1 Sensitivität und Spezifität

Unter gleichzeitiger Anwendung der Kriterien für stringent niedrige Aktivität beider Marker (GpLp, gleichzeitiges Vorliegen von $\text{GGT} \leq 33,2$ und $\text{LDH} \leq 8,4$ / GGT- und LDH-Einfriertest positiv) und für stringent hohe Aktivität beider Marker (GnLn, gleichzeitiges Vorliegen für $\text{GGT} > 33,2$ und $\text{LDH} > 8,4$ U/g Krea / beide Teste negativ) auf eindeutig beurteilbaren Messungen (173/200) konnten die in

Tab. 24 dargestellte Sensitivität von 96,3% bei einer Spezifität von 96,7% erreicht werden.

Tab. 24: Diagnostische Leistungsfähigkeit der kombinierten Bestimmung von GGT- und LDH-Aktivität zur Differenzierung von frischen und gefroren-gelagerten (-18°C, hier „eingefroren“) Urinproben (n=173 Proben mit kondordanten Enzymabfall (GGT pos/LDH pos, GpLp) oder erhaltener Aktivität beider Enzyme (GGT neg/LDH neg, GnLn))

	Markerkombination		
	Gp/Lp	Gn/Ln	Total
Eingefroren (-18°C)	79	3	82
Frisch	3	88	91
Total	82	91	173
Sensitivität:	96,3% (79/82)		
Spezifität:	96,7% (88/91)		



3.14.2 Positive und negative prädiktive Werte

Die maximal erzielte Sensitivität von 96,3% bei einer maximalen Spezifität von 96,7% wurde an Proben mit hohem Anteil des gesuchten Zustands (rund 50% Messungen waren gefroren-gelagerte Urine) erhoben.

In Modellrechnungen wurden diese Erkennungsraten auf Untersuchungsgut mit deutlich niedrigerem Anteil (Vortestwahrscheinlichkeit) von zuvor gefroren-gelagerten Proben angewendet. Tab. 25 zeigt, dass der positive Vorhersagewert (pos. präd. Wert PPW) eines positiven Testergebnisses bei realistischen Annahmen von 1% oder 1‰ zuvor gefroren-gelagerter Proben im Einsendegut stark abfällt auf 22,8 bzw, 2,28%.

Tab. 25: Prädiktive Werte für die Markerkombination GpLp (GGT pos/LDH pos, beide Enzyme zeigen Aktivitätsabfall) und GnLn (GnLn: GGT neg/LDH neg, beide Enzyme zeigen keinen ausreichenden Aktivitätsabfall) in Abhängigkeit vom Anteil gefroren-gelagerter Urinproben am Gesamt-Untersuchungsgut

Testcharakteristika:		
Ausschluss diskordanter Markerkombinationen		
Sensitivität: 96,3%		
Spezifität: 96,7%		
Falschpositivenrate: 3,3%		
Falschnegativenrate: 3,7%		
Präditive Werte:		
Vortestwahrscheinlichkeit	0,5	
	Prädiktiver Wert	(Mercaldo-Wald 95% KI)
Positives Ergebnis (GpLp)	PPW 0,967	(0,906 - 0,989)
Negatives Ergebnis (GnLn)	NPW 0,964	(0,897 - 0,988)
Vortestwahrscheinlichkeit	0,01	
	Prädiktiver Wert	(Mercaldo-Wald 95% KI)
Positives Ergebnis (GpLp)	PPW 0,228	(0,088 - 0,473)
Negatives Ergebnis (GnLn)	NPW 1,000	(0,999 - 1,000)
Vortestwahrscheinlichkeit	0,001	
	Prädiktiver Wert	(Mercaldo-Wald 95% KI)
Positives Ergebnis (GpLp)	PPW 0,028	(0,010 - 0,082)
Negatives Ergebnis (GnLn)	NPW 1,000	(1,000 - 1,00)

3.15 Anwendungserprobung (Blindversuch)

Zur Erprobung des Verfahrens wurde eine Serie von 24 Urinproben untersucht, in der 6 gefroren-gelagerte Urine und 18 frische Urine in zufälliger Reihenfolge und verblindet zusammengestellt waren. Die Bewertung der Proben erfolgte ohne Kenntnis des wirklichen Zustands. Wie in Tab. 26 zusammengestellt, konnten 3/24 Proben nicht beurteilt werden. Bei den restlichen 21 Proben konnte der Lagerungszustand korrekt festgestellt werden (6/6 gefroren-gelagerte Proben, 15/15 frische Proben).

Tab. 26: Anwendung auf 24 Urinproben, die ohne Kenntnis des wirklichen Zustands untersucht wurden

	Original-Zustand	KREAU	GGT (U/l)	LDH (U/l)	GGT (U/g Krea)	LDH (U/g Krea)	Beurteilung	Test richtig?
T01	Gefroren-gelagert	0,28	3	1	10,7	3,6	V.a. gefroren	Ja
T02	Unbehandelt	0,26	14	4	53,8	15,4	unbehandelt	ja
T03	Gefroren-gelagert	0,56	11	2	19,6	3,6	V.a. gefroren	ja
T04	Unbehandelt	1,9	116	25	61,1	13,2	unbehandelt	ja
T05	Unbehandelt	0,48	19	7	39,6	14,6	unbehandelt	ja
T06	Gefroren-gelagert	0,25	1	2	4,0	8,0	V.a. gefroren	Ja
T07	Gefroren-gelagert	2,53	30	11	11,9	4,3	V.a. gefroren	ja
T08	Unbehandelt	1,06	55	9	51,9	8,5	unbehandelt	ja
T09	Unbehandelt	1,1	40	16	36,4	14,5	unbehandelt	ja
T10	Unbehandelt	0,29	10	2	34,5	6,9	diskordant	nb(diskordant)
T11	Unbehandelt	2,93	168	28	57,3	9,6	unbehandelt	ja
T12	Unbehandelt	0,24	10	5	41,7	20,8	unbehandelt	ja
T13	Gefroren-gelagert	0,52	1	3	1,9	5,8	V.a. gefroren	ja
T14	Unbehandelt	1,44	55	14	38,2	9,7	unbehandelt	ja
T15	Eingefroren	0,18	4	2	22,2	11,1	diskordant	nb (verdünnt)
T16	Unbehandelt	1,03	38	6	36,9	5,8	diskordant	nb (diskordant)
T17	Unbehandelt	1,34	64	12	47,8	9,0	unbehandelt	ja
T18	Unbehandelt	0,29	10	4	34,5	13,8	unbehandelt	ja
T19	Unbehandelt	0,84	30	12	35,7	14,3	unbehandelt	ja
T20	Gefroren-gelagert	0,57	1	3	1,8	5,3	V.a. gefroren	ja
T21	Unbehandelt	3,95	135	38	34,2	9,6	unbehandelt	ja
T22	Unbehandelt	0,7	41	9	58,6	12,9	unbehandelt	ja
T23	Unbehandelt	1,44	62	15	43,1	10,4	unbehandelt	ja
T24	Unbehandelt	0,54	19	7	35,2	13,0	unbehandelt	ja

4 DISKUSSION

Die im Routinelabor vorhandenen Serummessmethoden konnten ohne große Modifikation auf die Anwendung in der Probenmatrix Urin validiert werden. Mit den für Urin validierten Aktivitätsbestimmungen wurden als erstes die physiologischen Variabilitäten und Wertelagen der Urin-Ausscheidungen von GGT und LDH bei Normalpersonen bestimmt. Nachfolgend wurde durch Zeitreihen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen festgestellt, dass der Aktivitätsabfall bei minus 20°C gelagertem Urin nach 3 bis 7 Tagen bei beiden Enzymen ausreichend groß genug ist, um im Gefrierfach gelagerte Urine zu erkennen. Dann wurden Entscheidungsgrenzen ermittelt für die Abgrenzung von frischem von mindestens 7 Tage gefroren-gelagertem Urin. Stark verdünnte Urine wurden aus der Beurteilung ausgeschlossen. In dieser Untergruppe ist keine durchgängig zuverlässige Bestimmung der Enzymaktivitäten möglich. Durch die kombinierte Betrachtung beider Enzymmarker und dem Ausschluss von Urinen mit diskrepanten Resultaten zeigt das Verfahren die günstigste Sensitivität bei ausreichender Spezifität zur Erkennung von gefroren-gelagerten Proben. In dieser Version wird das Verfahren zur Eingangskontrolle von Urinproben vorgeschlagen.

Im Folgenden werden die Einzelaspekte der Ergebnisse diskutiert und mit bislang vorliegenden Befunden aus der Literatur verglichen.

4.1 Leistungsfähigkeit und Limitationen der Messverfahren

4.1.1 Sind die enzymatischen GGT- und LDH-Messverfahren zur Beurteilung von Urinproben geeignet?

Die Verfahrensvalidierung zeigt, dass sich die physiologische Urin-Ausscheidung der GGT bereits mit den nicht-modifizierten Serumverfahren ausreichend gut bestimmen lässt. Dies deckt sich mit früheren Erfahrungen aus Untersuchungen am Menschen (Verho et al. 1987; Herget-Rosenthal et al. 2004; Ayca et al. 2006; Bollick et al. 2018) und in Tiermodellen (Adams et al. 1985; Mancinelli et al. 2012; Ilchyshyn et al. 2019). Mit Einschränkungen gilt dies auch für LDH, hier liegen die relevanten Aktivitätsbereiche im Urin sehr niedrig.

Das enzymatisch-photometrische Verfahren zur GGT-Aktivitätsbestimmung hat einen Messbereich ab einer unteren Quantifizierungsgrenze (LoQ) von 4,5 U/l bis über den ausgetesteten Wert von 67 U/l hinaus und zeigt in diesem Bereich eine gute Linearität. Damit deckt es den Bereich der Aktivitäten ab, die physiologisch in frischem und nicht zu verdünntem Urin vorkommen. Als 95%-Referenzbereich für die GGT-Ausscheidung von Nierengesunden wurde der Bereich von 24,4 bis 100,4 U GGT/g Krea gefunden. Dies entspricht bei maximal verdünnten Urinen (mit einer minimal zulässigen Kreatinin-Konzentration von 0,2 g Krea/l) absoluten Enzymaktivitäten von 4,9 bis 20,1 U/l. Diese Konzentrationen können auch im untersten Bereich mit einer Unpräzision von weniger als 20% bestimmt werden. Im höheren Bereich liegt die Präzision deutlich besser. Über den gesamten Bereich wird mit ausreichend guter Richtigkeit (+16 bis -3,5%) gemessen.

Die enzymatisch-photometrische LDH-Aktivitätsbestimmung deckt mit einem Messbereich von 2,9 U/l (LoQ) bis > 91 U/l weitgehend den für die vorliegende Untersuchung relevanten Bereich der LDH-Ausscheidung ab. Es zeigte sich, dass die LDH-Ausscheidung von Nierengesunden sehr variabel ist mit einem breiten 95%-Referenzbereich von 2,5 bis 45,8 U LDH/g Krea. Dies würde bei maximal verdünnten Urinen (minimal zulässige Kreatinin-Konzentration von 0,2 g Krea/l) einer absoluten Enzymaktivität von 0,5 bis 9,1 U/l entsprechen, die im unteren Bereich dann nicht mehr nachweisbar oder bestimmbar wäre. Durch Modifikation der Verfahren konnte keine weitere Steigerung der Empfindlichkeit erreicht werden. Für die Beurteilung der relevanten Entscheidungsgrenze von 8,4 U LDH/g Krea und für den ganz überwiegenden Teil der eingesandten Proben ist die unveränderte Methode jedoch ausreichend. Im kleinen Anteil der maximal verdünnten Urine liegen die LDH-Aktivitäten um die Entscheidungsgrenze (8,4 U/g Krea entsprechend einer Aktivität von 1,7 U/l) unter der Bestimmungsgrenze. Diese verdünnten Urine sind anhand der LDH-Aktivität nicht beurteilbar und tragen zum Anteil von ca. 15% der Proben bei, für die keine Bewertung abgegeben werden kann.

4.1.2 Genügt die Präzision und Richtigkeit der Messmethoden für die Differenzierung von nativen und gefroren-gelagerten Urinen?

Die untersuchten Enzymaktivitäten zeigten beträchtliche intra- und interindividuelle Schwankungen mit breiter Streuung. Das gilt sowohl für frische native Urine als auch für gefroren-gelagerte Proben, die Wertebereiche beider Probenarten überlappen sich.

Zudem variieren die Urinkonzentrationen selbst für konstant ausgeschiedene Analyte wie Kreatinin je nach hoch- oder tiefgestellter Diurese beim selben Patienten um den Faktor 10 oder höher (z.B. mit einem Urin-Kreatinin von 0,2 bzw. von 2,0 g/l). Und die ausgeschiedenen Enzymaktivitäten variieren auch beim selben Patientin zu unterschiedlichen Zeitpunkten physiologisch stark. Bei Absolutmessungen der untersuchten Enzyme würde diese physiologische Variabilität den Aktivitätsverlust durch Einfrieren in vielen Fällen verschleiern und insgesamt einen Vergleich unmöglich machen. Um den Einfluss der unterschiedlichen Diurese zu eliminieren, werden die Enzymaktivitäten deshalb Kreatinin-bezogen berichtet (Grauer et al. 1995; Arndt T 2007).

Für den vorgesehenen Verwendungszweck im Urin sind vor allem die Unpräzisionen der Enzymmessungen im niederen Messbereich und um die Entscheidungsgrenze relevant und können dort entsprechend den Akzeptanzkriterien bis zu +/- 20% betragen (max. zulässiger VK: 20%). Dies führt bei hoher Verdünnung zu niedrigen absolut gemessenen Enzymaktivitäten und zu einer erheblichen Unschärfe der Messwerte im Bereich der Entscheidungsgrenze. Für die GGT würde bei einem Cut-off von 33,2 U/g Krea und einem minimal zulässigen Urin-Kreatininwert von 0,2 g/l nur noch eine Absolutkonzentration von 6.6 U/l vorliegen ($33,2 \text{ U/gKrea} \times 0,2 \text{ g/l Krea} = 6,6 \text{ U/l}$). Diese niedrige Absolut-Aktivität liegt bereits im Bereich der unteren Quantifizierungsgrenze und ist mit einer Wiederholunpräzision von rund 20% behaftet. Deshalb wurden stark verdünnte Urine mit Kreatinin von $\leq 0,2 \text{ g/l}$ aus den Analysen ausgeschlossen. Solche Urine sind zwar noch nicht per se unphysiologisch und umfassen in der Laborstatistik des ausführenden Labors ca. 3-5% der Probeneingänge, werden jedoch auch in der üblichen

Drogensuchanalytik zurückgewiesen (s.a. die Beurteilungskriterien in der medizinisch-psychologischen Fahreignungsdiagnostik nach (Schubert W und Mattern R 2005)), da nicht ausgeschlossen ist, dass die Proben absichtlich z.B. durch exzessive Flüssigkeitsaufnahme oder auch durch nachträgliche Verdünnung mit Wasser in den Bereich niedriger Analytkonzentrationen gebracht wurden, um sie unter die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen der Suchverfahren zu bringen.

Für die GGT-Bestimmung liegt die kritische Differenz, definiert als $2,8 \times VK(\%) \times \text{Aktivität}$ (Jones 2009), für eine Enzymaktivität von 6,6 U/l (der niedrigsten für die Entscheidungsgrenze möglichen absoluten Enzymaktivität) bei $2,8 \times 20\% \times 6,6 \text{ U/l} = 3,7 \text{ U/l}$. Von den ausgewerteten 100 Messungen aus frischem Urin lagen 3/100 (3%) der Proben in diesem Bereich von 3,7 U/l also um die Entscheidungsgrenze herum ($6,6 \pm 1,85 \text{ U/l} = 4,75-8,45$) und können in diesem niedrigen Bereich statistisch nicht mehr sicher voneinander unterschieden werden. Diese Unsicherheit trägt zum Anteil der diskordanten Testresultate bei und zum Anteil von Proben ohne Bewertung. Die Sensitivität und Spezifität der Gesamtbeurteilung wurde deutlich verbessert, nachdem die für beide Enzymbestimmungen diskordanten Testergebnisse aus der Bewertung ausgeschlossen und als „nicht beurteilbar“ klassifiziert wurden. Analoge Überlegungen gelten auch für die LDH.

4.2 Enzymausscheidung von GGT und LDH im Urin

Die physiologische Ausscheidung der GGT und LDH im Urin zeigt eine sehr breite Verteilung und hohe Variabilität. Dies zeigt sich in der vorliegenden Untersuchung sowohl interindividuell (Verteilung innerhalb der Gruppen von Normal- und Substitutionspersonen (vgl. Abb. 20 und Abb. 21)) als auch intraindividuell (Langzeitbeobachtung einzelner Personen über 3 Monate (vgl. Abb. 24)). Die Wertelage der Enzymausscheidung lag dabei jedoch jeweils noch in einem mit gängigen Routineverfahren ausreichend gut messbaren Bereich.

Die Referenzintervalle wurden an einem Referenzkollektiv von 50 augenscheinlich nierengesunden Patienten im Alter von 53,5 +/- 14,2 Jahren ermittelt: Die untersuchte Zahl von n=50 lag unter der üblicherweise (IFCC) geforderten Zahl von 120 Personen (Solberg 1983; Haeckel et al. 2007), da es anfangs nicht möglich war eine größere Zahl von gut definierten Personen mit überzähligen Urin-Zusatzproben im Einsendegut zu finden. Die ermittelten Grenzen scheinen jedoch ausreichend repräsentativ. In der Gruppe der 50 Substitutionspatienten findet sich eine vergleichbare Verteilung. Die geringfügig niedrigere Wertelage bei Substitutionspatienten ist möglicherweise auf einen niedrigeren Altersdurchschnitt der Substitutionspatienten zurückzuführen, wie er typischerweise in dieser Personengruppe zu erwarten wäre. Aufgrund der Anonymisierung der Daten konnte diese Vermutung jedoch nicht weiter überprüft werden.

Der in vorliegender Arbeit gefundene Referenzbereich deckt sich in Größenordnung und Verteilung gut mit Angaben aus der Literatur: So ermittelten Bollick et al. (Bollick et al. 2018) den Referenzbereich der GGT am Menschen im frischen Urin in einer vergleichbaren Größenordnung von 14 bis 79 U/g Krea. Es zeigte sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied, sodass auf eine getrennte Auswertung und Darstellung verzichtet wurde. Dies deckt sich mit Beobachtungen in der Literatur (Amodio et al. 1985; Matteucci et al. 1991). In gleicher Weise wird auch der Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Enzymaktivität im Urin als gering beschrieben (Verho et al. 1987; Ayca et al. 2006).

GGT ist in der Niere primär im proximalen Tubulusbereich der Nierennephrene lokalisiert (Pfaller et al. 1984; Tate und Meister 1985; Scherberich et al. 1974). LDH ist als cytosolisches Enzym ubiquitär im Nierengewebe präsent (Gault and Geggie 1969; Plummer et al. 1979; Guder and Ross 1984). Das physiologische Auftreten von GGT-Aktivität im Urin wird durch die Mechanismen von Enzymsekretion im Bereich der Brush-border Membranen im proximalen Tubulus oder auch durch Freisetzung des Enzyms durch physiologischen Zelluntergang und durch fehlende Rückresorption im weiteren Verlauf der Nierentubuli bestimmt.

Die beschriebenen Enzyme werden aufgrund des hohen Molekulargewichts in der gesunden Niere glomerulär nicht frei filtriert. Für ein erhöhtes Auftreten von GGT und LDH werden daher verschiedene tubuläre Ursachen diskutiert. So führt eine Schädigung der Nierentubuli zu vermehrter Freisetzung von Enzymen aus proximalen tubulären Epithelzellen und im distalen Tubulusbereich zu fehlender Rückresorption. In der Literatur korrelierte die verstärkte Enzymurie von GGT und LDH mit einem selektiven tubulären Schaden (Scherberich 1990; Westhuyzen et al. 2003; Santos et al. 2010), aber auch mit akuter medikamentenbedingter Nephrotoxizität (Zafirovska et al. 1993) oder Transplantatabstossung (Kwiatkowska et al. 2014).

Beim nephrotischen Syndrom wird eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Albumin und einer erhöhten Urin-GGT beschrieben (Rambabu et al. 1988), sodass hier auch eine erhöhte Permeabilität der glomerulären Barriere zu erhöhter GGT Ausscheidung im Urin beiträgt.

In der klinischen Diagnostik konnte sich die Bestimmung von Urin-Enzymaktivitäten für GGT und LDH bislang nicht etablieren. Es finden sich kaum Belege für eine konkrete diagnostische Wertigkeit und eine breitere Anwendung. Dazu weisen beide Enzyme bereits physiologisch eine zu stark variable Ausscheidung auf. Für spezielle Fragestellungen (z.B. Monitoring von Organabstoßungsreaktionen oder Medikamenten-Nephrotoxizität) kann die serielle Bestimmung von Urin-Enzymaktivitäten, wie oben diskutiert, verwendet werden.

4.3 Ist der Aktivitätsverlust von GGT und LDH als Trennkriterium geeignet?

Beide Enzyme (GGT und LDH) sind bei Raumtemperatur und Kühlraumtemperatur (4-8°C), also unter den üblichen Lagerungsbedingungen im Labor, in den ersten 3 Tagen stabil (vgl. Abb. 12 für GGT und Abb. 14 für LDH). Bei Einfrieren im Gefrierfach (-18°C) sinkt die LDH-Aktivität bereits innerhalb von 24 Stunden auf unter 40% der Anfangsaktivität ab (vgl. Abb. 15). Die GGT-Aktivität nimmt im Gefrierschrank bei -18°C über die Lagerzeit kontinuierlich ab

und hat nach 7 Tagen ein vergleichbares Niveau erreicht (Abb. 13). Dieser Zeitpunkt (7 Tage Gefrierlagerung) erfüllt die Anforderung der Fragestellung bei Substitutionspatienten gut. Substitutionspatienten können den in Täuschungsabsicht aufbewahrten eigenen drogenfreien Urin nur über einen längeren Zeitraum von Wochen vor der Abgabe gewonnen haben, eine kurzfristige Gewinnung und Einlagerung wenige Tage zuvor würde keinen Sinn machen. Zum anderen ist der Aktivitätsverlust von über mindestens 60% ausreichend groß, um die Proben jetzt auch vor dem Hintergrund der stark unterschiedlichen Enzymausscheidungen voneinander trennen zu können. Eine längere Gefrierlagerung zeigt auf LDH keinen weiteren Einfluss, bei GGT fällt die Aktivität bei längerer Lagerung noch weiter ab. Länger gelagerte Proben, wie in der Praxis zu erwarten, zeigen die zur Erkennung genutzten Effekt also noch deutlicher. Interessanterweise bleibt die GGT-Aktivität bei -80°C , also unter Tiefkühlbedingungen, wie sie in der Regel nur unter Laborbedingungen zur Verfügung stehen, deutlich besser erhalten (vgl. Abb. 15). Dies sollte beachtet werden, da ein in solcher Weise professionell gelagerter Urin übersehen werden könnte. Solche Proben werden durch den nahezu vollständigen Aktivitätsverlust der LDH erkannt, der auch durch eine Lagerung bei sehr tiefen Temperaturen nicht vermieden werden kann.

4.4 Eigene Ergebnisse im Vergleich zu bisherigen Literaturangaben

Die Stabilitäten von GGT und LDH im Urin unter verschiedenen Lagerbedingungen wurden bereits in einer Reihe von Voruntersuchungen betrachtet.

Stellvertretend seien nachfolgend die Ergebnisse von zwei Untersuchungen zusammengefasst. Matteuci et al. haben die GGT-, LDH- und AP-Aktivität im Urin von 48 gesunden Probanden (Alter 24 – 39 Jahre) untersucht. Nach 7 Tagen Gefrierlagerung bei -20°C wurde ein signifikanter Enzymaktivitätsabfall der GGT von 95%, der LDH von 92% und der AP von 45% beobachtet. Bei Lagerung unter -80°C beschreibt die genannte Arbeit stark reduzierte LDH- und AP-Aktivitäten,

jedoch eine gut erhaltene GGT-Aktivität (Matteucci et al. 1991). Ilchyshyn et al. haben eine spektrophotometrische Methode zur Bestimmung der GGT-Aktivität im Urin von 41 gesunden Hunden validiert. Die dort beschriebene automatisierte, photometrische Messmethode (Beckman-Coulter AU480) erzielte Wiederholpräzisionen von 1,8 – 11,2% und war im Bereich 4-189 U/L linear. Die Autoren beobachteten bei -20°C eine rasche Abnahme der GGT-Aktivität (über 90% nach 7 Tagen), bei -80°C blieb die GGT-Aktivität erhalten. Zudem wurde der Einfluss verschiedener probenbedingten Störungen untersucht und beschrieben, dass Hämaturie, Hämoglobinurie oder Bakterurie die GGT-Aktivitätsbestimmung nicht stören (Ilchyshyn et al. 2019).

Diese und weitere Voruntersuchungen belegen übereinstimmend, dass die GGT- und LDH-Enzymaktivitäten bei Raumtemperatur und bei 4-8°C ausreichend lagerstabil sind, um im Laborroutinealltag über 1-2 Tage bei Umgebungstemperatur transportiert und vor der Messung unter Kühlraumtemperaturen gelagert zu werden (Beck and Sammons 1975; Bollick et al. 2018).

In gleicher Weise deckt sich der beobachtete signifikante GGT Enzymaktivitätsabfall bei Lagerung unter -18°C mit den bisherigen Literaturangaben (Stokke 1974; Beck and Sammons 1975; Loeb et al. 1997; Trachtenberg and Barregard 2010; Smee NM et al. 2016; Bollick et al. 2018). Die gemachte Beobachtung, dass die Enzymaktivität der GGT bei -80°C deutlich besser erhalten bleibt, findet sich bereits in Voruntersuchungen (Matteucci et al. 1991; Loeb et al. 1997).

Mehrere Arbeiten haben sich mit den Ursachen für den unterschiedlichen Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Enzymaktivität der GGT beschäftigt. Stokke et al. haben beschrieben, dass die GGT Aktivität bei hoch konzentrierten Urinen bei -18 bis -20°C stärker abfällt und dass die Enzymaktivität durch vorherige Dialyse der Proben erhalten bleibt. In gleicher Weise blieb die GGT-Enzymaktivität nach Zugabe von Dimethylsulfoxid und Glycerin erhalten (Stokke 1974). Beck und Sammons kamen zu dem Ergebnis, dass der Harnstoff der ausschlaggebende Faktor des Aktivitätsabfalls sei (Beck and Sammons 1975).

4.5 Leistungsfähigkeit der Entscheidungsgrenzen

Für die gewählten Bedingungen (Lagerung -18°C über 7 Tage) liegt die durch ROC-Analyse optimierte Trenngrenze für GGT bei 33,2 U/g Krea (vgl. Abb. 29) und für LDH bei 8,4 U/g Krea (Abb. 31). Die Trennleistung jedes der beiden Enzymmarker für sich genommen (vgl. Tab. 20 für GGT und Tab. 21 für LDH) ergibt mäßige Sensitivitäten von 85% (GGT) bzw. 91% (LDH) bei unzureichender Spezifität. Die Kombination beider Marker und die Bewertung von Proben mit konkordantem Ergebnis in beiden Enzymbestimmungen verbessert den Befund beträchtlich auf eine Spezifität (Tab. 22) und eine Sensitivität (Tab. 23) von jeweils 97%. Dieses Bewertungsschema (Auswertung von beiden Enzymmessungen und Bewertung von konkordanten (neg/neg oder pos/pos) Ergebnissen) ist daher in das endgültig vorgeschlagene Untersuchungsverfahren übernommen worden.

Liegen diese Entscheidungsgrenzen nun vor dem Hintergrund der variablen und breit verteilten Enzymausscheidung ausreichend günstig, um eine gute Unterscheidung zwischen frisch abgegebenen und zuvor gefroren-gelagerten Urin zu ermöglichen?

Aufgrund der weiten Streuung der ausgeschiedenen Enzymaktivitäten (vgl. die Werteverteilung in Abb. 29 für GGT und die Werteverteilung in Abb. 31 für LDH) liegen physiologischerweise sowohl bei GGT als auch bei LDH bereits 7-8% der frischen Urine unter der Entscheidungsgrenze („falsch positiv“, s. Tab. 20 und 21). Bei einem nennenswerten Anteil der gefroren-gelagerten Urine (15% für GGT, bzw. 9% für LDH, vgl. die Vierfeldertafeln in Tab. 20 und Tab. 21) liegt der beobachtete Aktivitätsabfall auch nach Einfrieren noch oberhalb der Trennschwelle („falsch negativ“). Dieser Überlappungsbereich der Werte (vgl. auch Abb. 34) bewirkt, dass die erreichbare Sensitivität und Spezifität jeweils nur knapp über 90% liegen, wenn das Verfahren auf alle untersuchten Proben angewendet wird. Also auch auf solche, in denen die Betrachtung von GGT oder von LDH zu einer unterschiedlichen Bewertung führt („diskordante“ Proben). Deshalb wird vorgeschlagen, die Messwertpaare mit diskordanter Enzymaktivität als eigene Kategorie abzugrenzen und als „nicht beurteilbar“ zu resultieren. Dies

waren 27 von insgesamt 200 Bestimmungen und damit rund 15% der Untersuchungen (vgl. Abb. 34 und 35).

Die Beschränkung der Bewertung ausschließlich auf konkordante Messergebnisse (GGT und LDH entweder gleichsinnig über Entscheidungsgrenze oder gleichsinnig unter Entscheidungsgrenze) verbessert die diagnostische Leistungsfähigkeit deutlich (Abb. 35). In dieser Version wird das Verfahren vorgeschlagen und erreicht eine gute Sensitivität von 96,3% bei ausreichender Spezifität von 97,6% (vgl. Tab. 24).

Wie in 4.1 ausgeführt ist die analytische Qualität der Verfahren ausreichend, um Werte im Bereich der Entscheidungsgrenzen ausreichend präzise und richtig zu messen, sofern es sich nicht um verdünnte Urine mit niedrigen LDH-Aktivitäten handelt. Eine weitere Verbesserung der analytischen Leistung der Messverfahren (beispielsweise eine durch Verbesserung der Wiederholpräzision weiter gesenkte untere Quantifizierungsgrenze) würde die diagnostische Trennleistung des Verfahrens nicht weiter steigern, da diese im Wesentlichen durch die Überlappung der Wertebereiche zwischen frischen und gefroren-gelagerten Urinen begrenzt bleibt.

4.6 Limitationen des Einfriertests

Das Verfahren zeigt Schwächen bei sehr stark verdünnten Urinen, bei Proben die nur kurz (im Bereich von Stunden oder wenigen Tagen) gefroren-gelagert waren, und bei Proben, die in -80°C Tiefkühlschränken bei sehr tiefen Temperaturen gelagert wurden. Sehr stark verdünnte Urine mit einem Urin-Kreatinin von < 0,2 g/l wurden deshalb von der Untersuchung ausgeschlossen, da hier die absoluten Enzymaktivitäten zu niedrig liegen. Für die Eingangskontrolle von Drogenurinen bringt dies jedoch keine Einschränkung, da solchermaßen verdünnte Proben auch in Screening- und Überwachungsprogrammen in der Regel zurückgewiesen werden. Eine Verdünnung des Urins in diesen Bereich ist zwar per se noch nicht unphysiologisch und kann in einem kleinen Prozentsatz des Routineprobeneingangs beobachtet werden. Für Drogenanalytik kann jedoch

nicht ausgeschlossen werden, dass solche Proben absichtlich (z.B. durch exzessives Trinken oder auch durch nachträgliche Verdünnung mit Wasser) in den Bereich niedriger Analytkonzentrationen gebracht worden sind, um Bestimmungs- und eventuell sogar Nachweisgrenzen der Suchverfahren zu unterschreiten. In der Routineanalytik werden solche Proben in der Regel nicht analysiert, auch da problemlos möglich ist, in den Folgetagen unauffällig konzentrierte Urine vom selben Patienten zu erhalten.

Auch die zweite Einschränkung, dass nur kurz (im Bereich von Stunden bis wenige Tage) gefroren-gelagerte Urinproben über den langsamen Abfall der GGT-Aktivität nicht zuverlässig erkennbar sind, wirkt sich für die Routineanwendung nicht aus. Solche kurzen Einfrierzeiten machen im Zusammenhang mit Täuschungshandlungen keinen Sinn. Aufgrund der Zeitabstände zwischen den Kontrolluntersuchungen sind deutlich längere Lagerzeiten drogenfreier Eigenurine zu erwarten. Ab der überprüften Lagerzeit von ≥ 7 Tagen funktioniert das Verfahren in der beschriebenen Güte.

Im Tiefkühler bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerter Urin kann ebenfalls nicht sicher erkannt werden, da die GGT-Aktivität unter diesen Bedingungen deutlich besser erhalten bleibt. Solche Lagermöglichkeiten sind im Privatbereich jedoch in der Regel nicht verbreitet und können dann durch die isolierte Bewertung der LDH erkannt werden.

Bei absichtlich angesäuertem Urin ist das Verfahren ebenfalls gestört, da diese Probenverfälschung auf die gemessenen Enzymaktivitäten einen starken und gegenläufigen Effekt hat (vgl. Abb. 18 und 19). Solchermaßen veränderte Proben werden durch die parallele pH-Messung in der Laborroutine jedoch zuverlässig erkannt und zurückgewiesen.

4.7 Positive und negative Vorhersagewerte des Verfahrens

Mit der erreichbaren Spezifität (96,7%) und Sensitivität (96,3%) lassen sich bei einer gezielten Fragestellung (also in einem eingegrenzten Untersuchungsgut mit ausreichend hoher Vortestwahrscheinlichkeit) frische und zuvor gefroren-gelagerte Urine gut differenzieren. Dies zeigt die Anwendung auf 24 blind

untersuchte Urine, in denen alle beurteilbaren (21/24) Proben korrekt charakterisiert wurden (6/6 richtig positiv, 21/21 richtig negativ, vgl. Tab. 26). Der Anteil der gefroren-gelagerten Proben hatte hier bei 7/24 gelegen, entsprechend einer Vortestwahrscheinlichkeit von 29,2%.

Bei ungezielter Fragestellung bringt die fehlende vollständige Spezifität jedoch rasch Einschränkungen und bewirkt in einem unselektierten Untersuchungsgut, dass der Anteil der falsch positiven Ergebnisse rasch den Anteil der richtig positiven Ergebnisse übersteigt. Dies zeigen die in Tab. 25 aufgeführten Modellrechnungen. Bei einem Anteil von 1% zuvor gefroren-gelagerter Urine sinkt der positive Voraussagewert (pos. prädiktiver Wert, PPW) auf nur noch 28%. Bei einem noch niedrigeren Anteil (wie es im Probeneingang eines Routinelabors durchaus zu erwarten ist) sinkt der PPW weiter und würde bei einem Anteil von 1 Promille gefroren-gelagerter Proben nur noch bei 2,8% liegen (Tab. 25). Oder anders formuliert, in diesem Fall hätte nur eines von über 35 Positivergebnissen den Zustand korrekt angezeigt.

4.8 Diskussion der Leitungsfähigkeit im Vergleich zu anderen Laborverfahren

Generell sollten Testverfahren für seltene oder niedrig-prävalente Zustände eine Spezifität von nahezu 100% besitzen und nur in einem sehr geringen Anteil zu falsch positiven Ergebnissen führen. Diese Forderung kann in der Praxis jedoch nur selten erfüllt werden. Viele gängige Testverfahren im medizinischen Labor zeigen Leistungsdaten, die ungünstiger ausfallen als die der hier vorgeschlagenen Enzymbestimmungen im Urin. Nachfolgend soll an drei Beispielen aus der labormedizinischen Praxis illustriert werden, wie die Leistungsdaten der Tests und die Prävalenz der gesuchten Zustände bei der Interpretation von Laborresultaten zu berücksichtigen sind. Das Hauptaugenmerk wird dabei auf die Spezifität der Methoden gelegt, also auf die Fähigkeit, nichtbetroffene Personen korrekt zu identifizieren.

Für den direkten Erregernachweis des SARS-CoV-2 werden von den Zulassungsbehörden PCR- oder Antigen-Tests gefordert, die eine Mindestspezifität von 95% (Food and Drug Administration, USA) oder gar von

98% (UK Medicines Healthcare Products Regulatory Agency, Großbritannien) aufweisen sollen (Brooks and Das 2020). In der derzeitigen COVID-19 Pandemie wird immer wieder diskutiert, ob Verfahren dieser Güte für das breite Testen von symptomlosen Personen, beispielsweise von Kindergartenkindern, Schülern oder Reiserückkehrern geeignet sind. In Modellrechnungen (Brooks and Das 2020) wurde für verschiedene Formen der SARS-CoV-2-Diagnostik (RNA-Nachweis, Antigen-Nachweis, Antikörper-Nachweis) gezeigt, dass der Vorhersagewert von richtig-positiven Ergebnissen (PPW) stark von der Infektionsprävalenz in der Untersuchungsgruppe abhängt. Bei steigender Prävalenz steigt die Anzahl der richtig-positiven Ergebnisse und übertrifft die Anzahl der falsch-positiven Testergebnisse. Die Autoren legen ihren Modellen Tests unterschiedlicher Güte zugrunde, solche mit einer Mindestspezifität von 95%, wie von der Food and Drug Administration (FDA, USA) gefordert, oder solche mit einer Mindestspezifität von 98% entsprechend den Regularien der UK Medicines Healthcare Products Regulatory Agency (Großbritannien). Dabei ist von „real world“- Spezifitäten auszugehen, die neben dem eigentlichen Testsystem auch weitere Fehlerquellen wie Fehlanwendung, Probenverwechslung oder Dokumentationsfehler berücksichtigen, die in der praktischen Anwendung zu falsch positiven Resultaten führen. Als Resultat der Modellrechnungen weisen gut spezifische Verfahren (mit 98% Spezifität) bei einer hohen angenommenen Prävalenz von 20% eine niedrige Falschpositivenrate von nur 10,1% auf. Diese steigt bei niedriger Prävalenz (2%) auf eine Falschpositivenrate von bereits 58,0%. Dieser Effekt ist bei Methoden mit geringerer Spezifität noch deutlicher. So hat ein weniger spezifisches Testverfahren (angenommene Spezifität 95%) bei dieser Prävalenz (2%) bereits eine Falschpositivenraten von 70,3%, d.h. bereits mehr als zwei von drei positiven Tests würden in diesem Fall fälschlicherweise einen positiven SARS-CoV-2-Nachweis anzeigen (Brooks and Das 2020).

Skittrall et al. haben die Ergebnisse solcher Modellrechnungen bestätigt durch die breite und ungezielte Anwendung von zwei PCR-Nachweisen (Aptima SARS-CoV-2 PCR und ein eigen entwickeltes in-house PCR-Verfahren) auf fast 20.000 respiratorische Materialien im Routineprobeneingang ihres Labors. Initial falsch

positive Testresultate konnten durch Wiederholungs- und Überkreuztestung mit dem jeweiligen Alternativ- oder Zweitverfahren eliminiert werden (Skittrall et al. 2021). Zusammenfassend ist bei Anwendung und Bewertung der direkten Sars-CoV-2-Tests stets die zu erwartende Vortestwahrscheinlichkeit zu berücksichtigen. Diese kann je nach regionaler Prävalenz, Exposition, klinischem Bild und Zeitpunkt der Untersuchung stark variieren. Die hohe Falschpositivenrate bei der Testung von nieder-prävalenten Merkmalen kann durch ein nachgeschaltetes Bestätigungs- oder Zweitverfahren eliminiert werden (Skittrall et al. 2021).

Ähnliche Betrachtungen gelten auch für den serologischen Nachweis von zurückliegenden COVID-Infektionen (Kumleben et al. 2020; Horvath et al. 2020). Die Prävalenz der Personen, die eine COVID-19 Infektion überstanden haben, ist in den meisten Populationen noch relativ gering. Bei einer konstant mit 5% angenommenen Prävalenz der stattgehabten COVID-19-Infektion ist selbst bei sehr hoher Spezifität und Spezifität (jeweils 99%) des Antikörpertestverfahrens nur ein positiv-prädiktiver Vorhersagewert von 83,8% zu erreichen. Das heißt, dass immer noch fast einer von fünf positiven Antikörper-Nachweisen falsch positiv ausfällt. Bei der Anwendung auf 100.000 Proben wären dies 950 fälschlicherweise positiv deklarierte Proben ohne vorrausgegangene COVID-Infektion. Bei Testen minderer Leistungsgüte und mit einer angenommenen Sensitivität und Spezifität von nur 90% würde der positiv-prädiktive Wert nur noch 32,1% betragen (Kumleben et al. 2020).

Bedeutend besser werden die Aussagen der Antikörpertests, wenn die Prävalenz der COVID-19 Infektionen in der Untersuchungsgruppe gesteigert wird, etwa durch gezielte Untersuchung bei klinischem Verdacht oder nach Exposition. In einer Untersuchungsgruppe mit 20%-iger Seroprävalenz ist mit einem Antikörpertest von hoher Testgüte (Sens: 93,5% und Spez: 98,7%) ein positiver Vorsagewert von 94,7% zu erwarten, bei einer angenommenen Seroprävalenz von 80% (Beispielsweise in der Kontrolle nach Impfung) betrüge der pos. Vorhersagewert des Tests sogar 99,7% (Horvath et al. 2020).

Im Gegensatz zur Spezifität hat eine fehlende Sensitivität formal nur einen geringen Einfluss auf den positiven Vorhersagewert (bei angenommener Testsensitivität von 80% und hoher Testspezifität von 99% sinkt der PPW nur auf 80,8%), führt klinisch jedoch zu übersehenen Infektionen (Kumleben et al. 2020). Zusammenfassend ergibt sich, dass der Nachweis von spezifischen SARS-CoV2-Antikörpern für die anlasslose und ungezielte serologische Diagnostik einer zurückliegenden COVID-19 Infektion wenig geeignet ist, jedoch bei gezielter Fragestellung in der Abklärung eines unklaren Krankheitsbildes, in epidemiologischen Feldstudien oder auch zur Demonstration eines Impferfolgs eingesetzt werden kann.

Selbst Verfahren mit ausgezeichneten Leistungsdaten sollten nur gezielt und unter Berücksichtigung der Vortestwahrscheinlichkeiten eingesetzt werden, insbesondere wenn sie zur Erkennung von sehr seltenen Zuständen dienen, oder mit erheblicher klinischer Relevanz verbunden sind. Dies sei am Beispiel der Schwangerschaftsdiagnostik durch nichtinvasive Pränataltests (NIPT) aus mütterlichem Blut zur Untersuchung auf das Vorliegen einer Trisomie 21 und anderer numerischer Chromosomenaberrationen (Trisomie 13, Trisomie 18) beim Kind illustriert. Aktuelle NIPTs weisen bei der Detektion der Trisomie 21 ganz ausgezeichnete Sensitivitäten und Spezifitäten von jeweils über 99,9% auf. Die Prävalenz der in Frage stehenden Trisomien ist jedoch stark altersabhängig. Wie bei Geißelmann (Geißelmann 2020) dargestellt beträgt die Prävalenz einer Trisomie 21 beim Kind einer 18 jährigen Mutter nur 8:10.000 (0,8‰) und steigt bei der 42 jährigen Mutter auf das über 20 fache an mit einer Prävalenz von 200:10.000 (2%). Demzufolge hat das positive Untersuchungsergebnis des NIPTs bei der jungen Mutter trotz ausgezeichneter Testspezifität nur einen positiven Vorhersagewert (PPW) von 48% für Trisomie 21, von 14% für Trisomie 18 und nur von 6% für Trisomie 13. Die positive Vorhersagekraft der NIPT-Untersuchung steigt mit dem Alter der Mutter deutlich und liegt bei 42 jährigen Schwangeren bei 96% (T21), 79% (T18) und 64% (T13). Daraus ergibt sich die Empfehlung von Fachgesellschaften wie dem Berufsverband niedergelassener Pränatalmediziner (BVNP), dass die NIPT-Testung nicht als definitives

Diagnoseverfahren, sondern als zielgerichtetes Screening in Personengruppen mit höherem Alter und erhöhtem Risiko und speziell für Trisomie 13 und 18 nur in Verbindung mit Ultraschalluntersuchungen eingesetzt werden sollen. Positivergebnisse sind durch Zweitverfahren, Ultraschall und durch eine definitive zytogenetische Diagnostik zu bestätigen (Geißelmann 2020).

4.9 Anwendung in der Routinediagnostik

Aus dem zuvor Ausgeführten folgt, dass das vorgeschlagene Verfahren mit Bestimmung der GGT- und LDH-Aktivitäten im Urin primär zur gezielten Überprüfung von Proben verwendet werden soll, bei denen der Verdacht der Verfälschungsabsicht besteht, beispielsweise durch Vorgeschichte oder weitere Befunde.

Im ungezielten Screening kann das Verfahren bestenfalls Hinweise geben, die durch weitere Untersuchungen (Vergleich von Zweit-, Parallel- oder Folgeproben, Einbeziehung von Anamnese, Vorbefunden und aktuellen Testresultaten der Drogentests) bestätigt werden müssen. Das Verfahren lässt sich dann beispielsweise auch als „Einfriertest“ nutzen. Dabei würde die in Frage stehende Probe im Labor noch einmal für mehrere Tage gefroren gelagert und dann erneut gemessen werden. Und es würde überprüft werden, ob es zu einem (weiteren) deutlichen Abfall der Enzymaktivitäten kommt, der dem Verhalten einer frischen Probe entsprechen würde.

Von großem Vorteil ist, dass das Verfahren in der vorgeschlagenen Grundform im Routinelabor leicht zu etablieren ist. Die Enzymmessungen sind als validierte Serummethoden in der üblichen Laborumgebung verbreitet, billig und leicht verfügbar. Diese vorhandenen Methoden können ohne Modifikation auch auf Urinproben angewendet werden. Messkanäle und Qualitätskontrollmaterialien der Serumverfahren werden direkt mitverwendet. Die Enzymmessungen werden parallel zu den Drogentests und zu anderen Urinuntersuchungen auf den vorhandenen klinisch-chemischen Analysegeräten abgearbeitet. Nach Definition von materialabhängigen Verfahrenskürzeln können die Urin-Bestimmungen somit leicht in den routinemäßigen Arbeitsablauf des Labors integriert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die beschriebenen Verfahren weisen nachfolgende Leistungsdaten auf und sind zur Bestimmung der ausgeschiedenen GGT- und LDH-Aktivität im Urin geeignet.

	GGT- Aktivitätsbestimmung im Urin	LDH- Aktivitätsbestimmung im Urin
Messbereich	4,5 bis > 67 U/l	2,9 bis > 91 U/l
Linearitätsbereich	2,23 bis > 67 U/l	2,48 bis > 91 U/l
Referenzbereich (95%-Perzentilbereich)	24,4 bis 100,4 U/g Krea	2,5 bis 45,8 U/g Krea
LoB / LoD / LoQ	1,4 / 2,75 / 4,5 U	1,2 / 2,43 / 2,9 U
Unpräzision(gesamt)	20,0 bis 2,3%	20,0 bis 1,6%
Unrichtigkeit	+16,0 bis -3,5%	+17,0 bis +3,3%

Die Anwendung zur Erkennung von zuvor gelagerten Urin Proben ist in praktikabler und routinetauglicher Weise möglich, wenn folgende Voraussetzungen eingehalten werden:

- Mindestens 3-7-tägige Lagerung der Proben bei Gefrierfachbedingungen (-18°C)
- Ausschluss von stark verdünnten Urinproben (Urinkreatinin \leq 0,2 g/l)
- Gleichzeitige Bestimmung der GGT- und LDH-Aktivität und Ausschluss von diskordanten Ergebnissen von der weiteren Bewertung
- Tiefgefroren (-80°C) gelagerte Proben lassen sich in der beschriebenen Weise nicht erkennen

Folgende Entscheidungsgrenzen werden zur Bewertung vorgeschlagen:

Bewertung:	Markerkombination	Wertelage (in U/g Krea)
Urinprobe frisch/ unverändert:	GGT-Test neg / LDH- Test neg	(GGT > 33,2 / LDH > 8,4)
Urinprobe zuvor gefroren- gelagert:	GGT-Test pos / LDH- pos	(GGT \leq 33,2 / LDH \leq 8,4)

Indifferentes Ergebnis/keine Aussage	Diskordantes Ergebnis (GGT pos / LDH neg oder GGT neg / LDH pos)
---	---

Die Untersuchung weist zuvor gelagerte (Gefrierfach, -18°C) Urine mit einer Sensitivität von 96,3% und einer Spezifität von 96,7% nach.

Zusammengefasst ist die vorgeschlagene Erkennungsmethode im Labor einfach zu implementieren. Sie greift auf gut verfügbare klinisch-chemische Serum-Routineverfahren zurück, die sich ohne wesentliche Modifikation auf Urin anwenden lassen. Die Methode wird eingeschränkt durch die physiologische hohen inter- und intraindividuellen Variabilitäten der Urinausscheidungen beider Enzyme, die keinem individualspezifischen Muster folgen. Dadurch ist die Trennleistung des Verfahrens zwangsläufig eingeschränkt und lässt sich durch analytische Verbesserungen oder weitere Kombination der Marker (Quotienten, Summe, Produkte der Enzymaktivitäten) nicht weiter steigern. Die Spezifität von 96,7% schränkt die ungezielte Anwendung im Routineeinsendegut ein. Insbesondere aufgrund der zu erwartenden niedrigen Prävalenz von zuvor gefroren-gelagerten Urinen. Aussagekräftige positive Vorhersagewerte lassen sich nur durch Erhöhung der Vortestwahrscheinlichkeit erreichen, also durch gezielte Untersuchung von verdächtigen Proben und durch Kombination mit weiteren Erkennungsverfahren, die auf eine Täuschungsabsicht bei der Einsendung hinweisen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adams MJ, Buehner M, Chandrasekhar K, Ford GC, Hackert ML, Liljas A, Rossmann MG, Smiley IE, Allison WS, Everse J et al. (1973) Structure-function relationships in lactate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 1968–1972

Adams R, McClure JJ, Gossett KA, Koonce KL, Ezigbo C (1985) Evaluation of a technique for measurement of gamma-glutamyltranspeptidase in equine urine. *Am J Vet Res* 46, 147–150

Albert Z, Orłowski M, Szewchuk A. (1961) Histochemical demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase. *Nature* 191, 767–768

Amador E, Dorfman LE, Wacker WE (1963) Serum lactic dehydrogenase activity: an analytical assessment of current assays. *Clin Chem* 12, 391–399

Amodio P, Bazzler G, Malatesta R, Gatta A (1985) Reference ranges and methodological aspects in the urinary measuring of lysozyme, malate-dehydrogenase, gamma-glutamyltransferase and alpha-glucosidase. *Enzyme* 33, 216–225

Arendt M, Munk-Jørgensen P, Sher L, Jensen SOW (2011) Mortality among individuals with cannabis, cocaine, amphetamine, MDMA, and opioid use disorders: a nationwide follow-up study of Danish substance users in treatment. *Drug Alcohol Depend* 114, 134–139

Arndt T 2007 Urin-Kreatininkonzentration: Kenngröße zur Prüfung auf Probenverwertbarkeit? Kritische Überlegungen aus ca. 25000 Urin-Kreatininbestimmungen in einem klinisch-chemischen Labor. *Toxichem + Krimtech* (2007) 74(2);94

Atzendorf J, Rauschert C, Seitz N-N, Lochbühler K, Kraus L (2019) The Use of Alcohol, Tobacco, Illegal Drugs and Medicines: An Estimate of Consumption and Substance-Related Disorders in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 116, 577–584

Ayca B, Sener A, Apikoglu Rabus S, Oba R (2006) The effect of exercise on urinary gamma-glutamyl transferase and protein levels of volleyball players. *J Sports Med Phys Fitness* 46, 623–627

Bayerische Akademie für Sucht- und Gesundheitsfragen (2018) Leitfaden für Ärzte zur substitions-gestützten Behandlung Opiatabhängiger: 4. Auflage 2018

Beck PR, Sammons HG (1975) A stabilising factor for γ -glutamyl transpeptidase in urine. *Clin Chim Acta* 65, 351–359

Bleckwenn M, Heister L, Weckbecker M, Weckbecker K, Mücke M (2016) Misuse of Substitution Drugs in the Substitution-Based Therapy. *Eur Addict Res* 22, 322–328

Bollick YS, de Carvalho, José Antonio M, Tatsch E, Hausen BS, Moresco RN (2018) Reference limits of the urinary gamma-glutamyltransferase in a healthy population and effects of short-term storage on the enzyme activity. *Clin Chim Acta* 482, 46–49

- Bowers GN, McComb RB (1966) A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin Chem* 12, 70–89
- Brooks ZC, Das S (2020) COVID-19 Testing. Impact of Prevalence, Sensitivity, and Specificity on Patient Risk and Cost. *Am J Clin Pathol* 154, 575–584
- Broz D, Wejnert C, Pham HT, DiNenno E, Heffelfinger JD, Cribbin M, Krishna N, Teshale EH, Paz-Bailey G (2014) HIV infection and risk, prevention, and testing behaviors among injecting drug users -- National HIV Behavioral Surveillance System, 20 U.S. cities, 2009. *MMWR Surveill Summ* 63, 1–51
- Bundesärztekammer (2017) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Durchführung der substitionsgestützten Behandlung Opioidabhängiger
- Bundeskriminalamt (2019) Drogentote nach Todesursache in Deutschland 2019. *Bundeslagebild Rauschgift*, 32–33
- Bundesopiumstelle (2020) Bericht zum Substitutionsregister Jan 2020. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, 21.01.2020
- Carey RN, Durham AP, Hauck WW, Kallner A, Kondratovich MV, Middle JG, Pierson-Perry JF, Smith MB, Srinivasan (2014) A User verification of precision and estimation of bias; approved guideline (EP15-A3 vol 34 no 12); Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne
- Clark AK, Wilder CM, Winstanley EL (2014) A systematic review of community opioid overdose prevention and naloxone distribution programs. *Journal of Addiction Medicine* 8, 153–163
- Clemo FA (1998) Urinary enzyme evaluation of nephrotoxicity in the dog. *Toxicol Pathol* 26, 29–32
- Cobrin AR, Blois SL, Kruth SA, Abrams-Ogg ACG, Dewey C (2013) Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. *J Small Anim Pract* 54, 647–655
- Conigrave KM, Degenhardt LJ, Whitfield JB, Saunders JB, Helander A, Tabakoff B (2002) CDT, GGT, and AST as markers of alcohol use: the WHO/ISBRA collaborative project. *Alcohol Clin Exp Res* 26, 332–339
- Connock M, Juarez-Garcia A, Jowett S, Frew E, Liu Z, Taylor RJ, Fry-Smith A, Day E, Lintzeris N, Roberts T et al. (2007) Methadone and buprenorphine for the management of opioid dependence: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 11, 1-171
- Crivellenti LZ, Mesa JS, Meirelles, Adriana Érica Wilkes Burton, Borin Crivellenti S, Mireya EG, Canola JC, Hatayde MR, Santana AE, Dantas M, Silva GEB (2014) False positivity of gamma-glutamyl transpeptidase measurement in urine. *Ren Fail* 36, 581–584
- Currie LA (1999) Detection and quantification limits: origins and historical overview¹Adapted from the Proceedings of the 1996 Joint Statistical Meetings (American Statistical Association, 1997). *Anal Chim Acta* 391, 127–134
- da Silva Melo, DA, Saciura VC, Poloni JAT, Oliveira CSA, Filho, José Carlos Farias Alves, Padilha RZ, Reichel CL, Neto EJ, Oliveira RM, D'avila LC et al. (2006) Evaluation of renal enzymuria and cellular excretion as an marker of

acute nephrotoxicity due to an overdose of paracetamol in Wistar rats. *Clin Chim Acta* 373, 88–91

De Carvalho, José AM, Piva SJ, Hausen BS, Bochi GV, Kaefer M, Coelho AC, Duarte, Marta MMF, Moresco RN (2011) Assessment of urinary γ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* 412, 1407–1411

Degenhardt L, Charlson F, Mathers B, Hall WD, Flaxman AD, Johns N, Vos T (2014a) The global epidemiology and burden of opioid dependence: results from the global burden of disease 2010 study. *Addiction* 109, 1320–1333

Degenhardt L, Larney S, Randall D, Burns L, Hall W (2014b) Causes of death in a cohort treated for opioid dependence between 1985 and 2005. *Addiction* 109, 90–99

Dunnett CW (1955) A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *Journal of the American Statistical Association* 50, 1096–1121

Dunnett CW (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. *Biometrics* 20, 482

Elbe A-M, Jensen SN, Elsborg P, Wetzke M, Woldemariam GA, Huppertz B, Keller R, Butch AW (2016) The Urine Marker Test: An Alternative Approach to Supervised Urine Collection for Doping Control. *Sports Med* 46, 15–22

Farrell M, Ward J, Mattick R, Hall W, Stimson GV, Des Jarlais D, Gossop M, Strang J (1994) Methadone maintenance treatment in opiate dependence: a review. *BMJ (Clinical research ed.)* 309, 997–1001

Fossati P, Prencipe L, Berti G (1983) Enzymic creatinine assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. *Clin Chem* 29, 1494–1496

Fu S (2016) Adulterants in Urine Drug Testing. *Adv Clin Chem* 76, 123–163

Gault MH, Geggie PH (1969) Clinical significance of urinary LDH, alkaline phosphatase and other enzymes. *Can Med Assoc J* 101, 208–215

Geißelmann K (2020) Nichtinvasive Pränataltests. Risiko für Fehlinterpretationen. *Deutsches Ärzteblatt* 117, A320 - A324

Grauer GF, Greco DS, Behrend EN, Mani I, Fettman MJ, Allen TA (1995) Estimation of quantitative enzymuria in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicosis using urine enzyme/creatinine ratios from spot urine samples. *J Vet Intern Med* 9, 324–327

Guder WG, Ross BD (1984) Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int* 26, 101–111

Haeckel R, Wosniok W, Arzideh F (2007) A plea for intra-laboratory reference limits. Part 1. General considerations and concepts for determination. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 45, 1033–1042

Harauchi T, Yoshizaki T (1990) A method for determining urinary enzyme activities as nephrotoxic indicators in rats. *Jpn J Pharmacol* 54, 205–215

- Herget-Rosenthal S, Poppen D, Hüsing J, Marggraf G, Pietruck F, Jakob H-G, Philipp T, Kribben A (2004) Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem* 50, 552–558
- Horiuchi S, Inoue M, Morino Y (1978) Gamma-glutamyl transpeptidase: sidedness of its active site on renal brush-border membrane. *European journal of biochemistry* 87, 429–437
- Horowitz GL (2010) Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: Approved guideline (EP28-A3c vol 28 no 30), 3rd, Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne
- Horvath K, Semlitsch T, Jeitler K, Krause R, Siebenhofer A (2020) Antikörpertests bei COVID-19 - Was uns die Ergebnisse sagen. *Z Evid Fortbild Qual Gesundhwes* 153, 54–59
- Hser YI, Hoffman V, Grella CE, Anglin MD (2001) A 33-year follow-up of narcotics addicts. *Archives of General Psychiatry* 58, 503–508
- Huijgen HJ, Sanders GT, Koster RW, Vreeken J, Bossuyt PM (1997) The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35, 569–579
- Huppertz B, Gauchel G, Feiertag H, Schweizer H, Krieger H, Richter F, Heinz H, Blanke J, Gastpar M, Keller R (2004) Urine labeling with orally applied marker substances in drug substitution therapy. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 42, 621–626
- Ilchysyn NP, Villiers E, Monti P (2019) Validation of a spectrophotometric method for GGT measurement in canine urine and determination of the urine GGT-to-creatinine ratio reference interval and biological variation in 41 healthy dogs. *J Vet Diagn Invest* 31, 33–39
- Jacob M, Balasubramaniam N (2006) Excretion of urinary enzymes in normal pregnancy. *Clin Biochem* 39, 754–757
- Jastrzębska I, Zwolak A, Szczyrek M, Wawryniuk A, Skrzydło-Radomańska B, Daniluk J (2016) Biomarkers of alcohol misuse: recent advances and future prospects. *Prz Gastroenterol* 11, 78–89
- Jones GRD (2009) Critical difference calculations revised: inclusion of variation in standard deviation with analyte concentration. *Ann Clin Biochem* 46, 517–519
- Kluge J, Rentzsch L, Remane D, Peters FT, Wissenbach DK (2018) Systematic investigations of novel validity parameters in urine drug testing and prevalence of urine adulteration in a two-year cohort. *Drug Test Anal* 10, 1536–1542
- Kraus L, Seitz N-N, Schulte B, Cremer-Schaeffer P, Braun B, Verthein U, Pfeiffer-Gerschel T (2019) Estimation of the Number of People With Opioid Addiction in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 116, 137–143
- Kroll MH (2012) Assessment of the diagnostic accuracy of laboratory test using receiver operating characteristic curves: Approved guideline (EP24-A2 v. 33, no. 11), 2nd ed; CLSI, Wayne
- Krouwer J, Cembrowski GS, Tholen DW (2014) Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory measurement procedures; approved guideline

- (EP10-A3-AMD vol 26 no 34), 3rd; Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne
- Kumleben N, Bhopal R, Czepionka T, Gruer L, Kock R, Stebbing J, Stigler FL (2020) Test, test, test for COVID-19 antibodies: the importance of sensitivity, specificity and predictive powers. *Public Health* 185, 88–90
- Kwiatkowska E, Domański L, Bober J, Safranow K, Pawlik A, Kwiatkowski S, Ciechanowski K (2014) Gamma-glutamyl transpeptidase as the marker of kidney graft function. *Adv Clin Exp Med* 23, 947–952
- Linnet K, Kondratovich M (2004) Partly nonparametric approach for determining the limit of detection. *Clin Chem* 50, 732–740
- Lippi I, Perondi F, Meucci V, Bruno B, Gazzano V, Guidi G (2018) Clinical utility of urine kidney injury molecule-1 (KIM-1) and gamma-glutamyl transferase (GGT) in the diagnosis of canine acute kidney injury. *Vet Res Commun* 42, 95–100
- Loeb WF, Das SR, Trout JR (1997) The effect of erythritol on the stability of gamma-glutamyl transpeptidase and N-acetyl glucosaminidase in human urine. *Toxicol Pathol* 25, 264–267
- Mackridge A, Rowe P, 2018, *One-Way Analysis of Variance (ANOVA) - Including Dunnett's and Tukey's Follow Up Tests*, 93-103, hrsg. v. Mackridge AJ, Rowe P, *A practical approach to using statistics in health research: From planning to reporting*, John Wiley & Sons Incorporated Newark
- Mancinelli E, Shaw DJ, Meredith AL (2012) γ -Glutamyl-transferase (GGT) activity in the urine of clinically healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Rec* 171, 475
- Matteucci E, Gregori G, Pellegrini L, Navalesi R, Giampietro O (1991) Effects of storage time and temperature on urinary enzymes. *Clin Chem* 37, 1436–1441
- Meister A, Tate SS, Griffith OW (1981) [30] γ -Glutamyl transpeptidase. *Methods in enzymology* 77, 237–253
- Meyer MR, Maurer HH (2016) Review: LC coupled to low- and high-resolution mass spectrometry for new psychoactive substance screening in biological matrices - Where do we stand today? *Anal Chim Acta* 927, 13–20
- Pasin D, Cawley A, Bidny S, Fu S (2017) Current applications of high-resolution mass spectrometry for the analysis of new psychoactive substances: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 409, 5821–5836
- Pfaller W, Gstraunthaler G, Kotanko P, Wolf H, Curthoys NP (1984) Immunocytochemical localization of gamma-glutamyl-transferase on isolated renal cortical tubular fragments. *Histochemistry* 80, 289–293
- Pierson-Perry JF, Vaks JE, Durham AP (2012) Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline - second edition (Accreditation preparedness essentials for verifying test performance (SCQ02) 32: 8(2012)); CLSI, Wayne, Pa., U.S.A.
- Plummer DT, Ngaha EO, Wright PJ, Leathwood PD, Blake ME (1979) The sensitivity of urinary enzyme measurements for detecting renal injury. *Curr Probl Clin Biochem*, 71–87

- Rambabu K, Alaiat SM, Ziu MM (1988) Studies on urinary gamma-glutamyl transpeptidase in nephrotic syndrome patients. *Biochem Med Metab Biol* 40, 68–75
- Rivers BJ, Walter PA, O'Brien TD, King VL, Polzin DJ (1996) Evaluation of urine gamma-glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio as a diagnostic tool in an experimental model of aminoglycoside-induced acute renal failure in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 32, 323–336
- Santos C, Marcelino P, Carvalho T, Coelho J, Bispo M, Mourão L, Perdigoto R, Barroso E (2010) The value of tubular enzymes for early detection of acute kidney injury after liver transplantation: an observational study. *Transplant Proc* 42, 3639–3643
- Schär HP, Zuber H (1979) Structure and function of L-lactate dehydrogenases from thermophilic and mesophilic bacteria. I) Isolation and characterization of lactate dehydrogenases from thermophilic and mesophilic bacilli. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 360, 795–807
- Scherberich JE (1990) Urinary proteins of tubular origin: basic immunochemical and clinical aspects. *Am J Nephrol* 10 Suppl 1, 43–51
- Scherberich JE, Falkenberg FW, Mondorf AW, Müller H, Pfeleiderer G (1974) Biochemical and immunological studies on isolated brush border membranes of human kidney cortex and their membrane surface proteins. *Clin Chim Acta* 55, 179–197
- Scholer A (2004) The Effect of Urine Manipulation on Substance Abuse Testing. *T + K*, 71, 127-137
- Schubert W und Mattern R (Hrsg.), 2005, Beurteilungskriterien: Urteilsbildung in der medizinisch-psychologischen Fahreignungsdiagnostik, Kirschbaum Verlag, Bonn
- Schuckit MA (2016) Treatment of Opioid-Use Disorders. *New England Journal of Medicine* 375, 357–368
- Schumann G, Klauke R, Canalias F, Bossert-Reuther S, Franck PFH, Gella F-J, Jørgensen PJ, Kang D, Lessinger J-M, Panteghini M et al. (2011) IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 9: reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Scientific Division, Committee on Reference Systems of Enzymes (C-RSE) (1)). *Clinical chemistry and laboratory medicine* 49, 1439–1446
- Shaw LM, Strømme JH, London JL, Theodorsen L (1983) International Federation of Clinical Chemistry, (IFCC), Scientific Committee, Analytical Section. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for gamma-glutamyltransferase (gamma-glutamyl)-peptide: amino acid gamma-glutamyltransferase, EC 2.3.2.2. *J Clin Chem Clin Biochem* 21, 633–646
- Siemens Testanleitung PH Validity Test Syva Atellica Rev_C; Siemens Healthineers, Tarrytown, NY, USA 2012

Siemens Testanleitung Alkalische Phosphatase (ALP_2c) Atellica CH Analyzer Rev.01; Siemens Healthineers, Tarrytown, NY, USA 2017a

Siemens Testanleitung Enzymatisches Kreatinin_2 (ECre_2) Atellica CH Analyzer Rev.02; Siemens Healthineers, Tarrytown, NY, USA 2017b

Siemens Testanleitung Laktatdehydrogenase L-P (LDLP) Atellica CH Analyzer Rev.01; Siemens Healthineers, Tarrytown, NY, USA 2017c

Siemens Testanleitung γ -Glutamyltransferase (GGT) Atellica CH Analyzer Rev.01; Siemens Healthineers, Tarrytown, NY, USA 2017d

Skittrall JP, Wilson M, Smielewska AA, Parmar S, Fortune MD, Sparkes D, Curran MD, Zhang H, Jalal H (2021) Specificity and positive predictive value of SARS-CoV-2 nucleic acid amplification testing in a low-prevalence setting. *Clin Microbiol Infect* 27, 469.e9-469.e15

Smee NM et al. 2016 Effect of Storage Time and Temperature on Canine Urine Enzymes N-acetyl-B-D-glucosaminidase (NAG) and γ -glutamyl transpeptidase (GGT). *Intern J Appl Res Vet Med.*, 114–121

Solberg HE (1983) The theory of reference values Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 21, 749–760

Soyka M, Pogarell O (2019) Neue Slow-release-Buprenorphinformulierungen zur Optimierung der Opioidsubstitution. *Nervenarzt* 90, 932–937

Stokke O (1974) Preservation of γ -glutamyl transpeptidase activity in human urine. *Clin Chim Acta* 57, 143–148

Tate SS, Meister A (1985) γ -Glutamyl transpeptidase from kidney. *Meth. Enzymol.* 113, 400-419

Thevis M, Geyer H, Mareck U, Sigmund G, Henke J, Henke L, Schänzer W (2007) Detection of manipulation in doping control urine sample collection: a multidisciplinary approach to determine identical urine samples. *Anal Bioanal Chem* 388, 1539–1543

Thevis M, Geyer H, Sigmund G, Schänzer W (2012) Sports drug testing: Analytical aspects of selected cases of suspected, purported, and proven urine manipulation. *J Pharm Biomed Anal* 57, 26–32

Timko C, Schultz NR, Cucciare MA, Vittorio L, Garrison-Diehn C (2016) Retention in medication-assisted treatment for opiate dependence: A systematic review. *Journal of addictive diseases* 35, 22–35

Trachtenberg F, Barregard L (2010) Effect of storage time at -20°C on markers used for assessment of renal damage in children: albumin, γ -glutamyl transpeptidase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase and α 1-microglobulin. *Scand J Urol Nephrol* 44, 331–336

van Klaveren RJ, Demedts M, Nemery B (1997) Cellular glutathione turnover in vitro. *Eur Respir J* 10, 1392–1400

Ventura R, Segura J (2010) Masking and manipulation. *Handb Exp Pharmacol*, 327–354

- Verho M, Färber G, Heinen B, Grötsch H (1987) The excretion of renal enzymes during rest and exercise: a double-blind comparison between placebo and penbutolol. *Int J Clin Pharmacol Res* 7, 27–32
- Verneer AR (2014) The Athlete Biological Passport: an integral element of innovative strategies in antidoping. *Br J Sports Med* 48, 817–819
- Wang S-C, Chen Y-C, Lee C-H, Cheng C-M (2019) Opioid Addiction, Genetic Susceptibility, and Medical Treatments: A Review. *Int J Mol Sci* 20, 4294
- Welbourne TC, Dass PD (1982) Function of renal γ -glutamyltransferase: Significance of glutathione and glutamine interactions. *Life Sci* 30, 793–801
- Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltissi D, Morgan TJ (2003) Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant* 18, 543–551
- Whitfield JB (2001) Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci* 38, 263–355
- Whiting PH, Brown PA (1996) The relationship between enzymuria and kidney enzyme activities in experimental gentamicin nephrotoxicity. *Ren Fail* 18, 899–909
- World Anti-Doping Agency (2019): Athlete Biological Passport Operating Guidelines. Version 7.1 June 2019
- Zafirovska KG, Bogdanovska SV, Marina N, Gruev T, Lozance L (1993) Urinary excretion of three specific renal tubular enzymes in patients treated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). *Ren Fail* 15, 51–54

7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde im Labor MVZ Synlab Leinfelden unter Betreuung von Prof. Dr. med. Eberhard Wieland durchgeführt.

Die Konzeption der Experimente erfolgte unter Anleitung und in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. Shipkova, ärztliche Leiterin der Abteilung für spezielle klinische Chemie und Drogenanalytik des Labors MVZ Synlab Leinfelden und Herrn Prof. Andreas Peter aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universität Tübingen.

Sämtliche Versuche und Messungen wurden von mir nach Einarbeitung selbständig in der Abteilung für Klinische Chemie des MVZ Leinfelden auf einem anwenderkonfigurierbaren Siemens Atellica CH-Modul durchgeführt. Für Probenaufnahme und Datenauswertung wurde ich durch Labormitarbeiter in die Labor-EDV eingearbeitet.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Statistischer Beratung durch Frau Dr. Feng vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen eigenständig durch mich mit kommerzieller Statistik-Software.

Ich versichere, dass ich das Manuskript selbständig verfasst und keine weiteren, als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe.

Tübingen, den 08.06.2021

Anna Theresia Friess

8 LEBENSLAUF

9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Wieland danke ich sehr für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten, die ich im Labor Synlab Leinfelden hatte.

Herrn Prof. Dr. Peter danke ich für seine Mitbetreuung und die Gelegenheit, dieses Promotionsvorhaben an der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen durchführen zu können.

Frau Dr. Shipkova danke ich herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Abteilung in Leinfelden durchzuführen, und für die stete und herzliche Unterstützung bei der Konzeption und der Durchführung der Messungen.

Frau Dr. Feng vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen danke ich für die ausgezeichnete statistische Beratung und die Hinweise für Auswertung und Darstellung der statistischen Vergleiche.

Und besonderen Dank schulde ich allen Mitarbeitern der Abteilungen Klinische Chemie und Spezielle Klinische Chemie in Leinfelden, im Besonderen Herrn Wölper, Herrn Frisch, Frau Zeiler, Frau Brudy, Frau Berger, Frau Böckle, Herrn Atielmo, Frau Kyriadikou, Frau Kalay, Frau Luderer, aber auch allen anderen Mitarbeitern des Labors, die mich in jeder Phase der Arbeiten, bei der Rekrutierung der Untersuchungsgruppen, bei der Probensuche, bei der Durchführung der Messungen auf den Siemensgeräten, bei Datenerfassung und -auswertung in der Labor-EDV und bei allen weiteren Belangen nach Kräften unterstützt und mich sehr herzlich im Labor aufgenommen haben.