

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Praktische Anwendung des Glukosemesssystems

„FreeStyle Libre“ bei Katze und Hund

INAUGURAL-Dissertation

Zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Veterinärmedizin

-Doctor medicinae veterinariae-

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Verena Deiting

Köln

Hannover 2020

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Reinhard Mischke,
Klinik für Kleintiere
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Mischke

2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Ganter

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2020

Meinen Eltern, Kalle und Filou

Aus dieser Dissertation wurden folgende Manuskripte bereits publiziert bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

Deiting, V., Mischke, R.

Praktische Anwendung des neuen Glukosemesssystems „FreeStyle Libre“ bei der Katze

Publiziert in der Zeitschrift „Der Praktische Tierarzt“ 2019, 100, 540–550 (DOI 10.2376/0032-681X-18-48)

Deiting, V., Mischke, R.

Use of a continuous glucose measuring/monitoring system „FreeStyle Libre“ in diabetic cats.

Angenommen zur Publikation in der Zeitschrift „Research in Veterinary Science“,
vorläufig online publiziert unter
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003452882031016X>
(abgerufen am 18.09.2020) (DOI <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.09.015>)

Ergebnisse dieser Dissertation wurden auf folgenden Fachtagungen präsentiert:

Deiting, V., Mischke, R.:

Praktische Anwendung des neuen Glukosemesssystems „FreeStyle Libre“ bei der Katze

26. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik (InnLab), 2.–3. Februar 2018 in Hannover

Abstract: Deiting V, Mischke R, 2018: Praktische Anwendung des neuen Glukosemesssystems „Freestyle Libre“ bei der Katze. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 46: A11–A12, P04

Deiting, V., Mischke, R.:

Praktische Anwendung des neuen Glukosemesssystems „FreeStyle Libre“ beim Hund

27. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik (InnLab), 1.–2. Februar 2019 in München

Abstract: Deiting V, Mischke R, 2019: Praktische Anwendung des neuen Glukosemesssystems „Freestyle Libre“ beim Hund. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 47: 3, P04

Deiting, V., Mischke, R.:

Praktische Anwendung des neuen Glukosemesssystems „FreeStyle Libre“ bei der Katze

28. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik (InnLab), 31.Januar–01.Februar 2020 in Gießen

Abstract: Deiting V, Mischke R, 2020: Praktische Anwendung des neuen Glukosemesssystems „Freestyle Libre“ bei der Katze. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 48: 141, P02

Deiting, V., Mischke, R.:

Use of the continuous glucose monitoring system „FreeStyle Libre“ in diabetic cats.

20th Annual ECVIM-CA Congress, 3.–5. September 2020 in Barcelona, Spain (virtuell).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Diagnostik und Insulineinstellung beim Diabetes mellitus bei Katzen und Hunden.....	3
2.2	Methodik zur Bewertung der Messgenauigkeit von Blutzuckermessgeräten	8
2.3	Glukometer: Klassische Methode der Blutglukoseüberwachung	9
2.4	Kontinuierlich messende Systeme: Überwachung des interstitiellen Glukosegehaltes.....	13
3	Untersuchungsgut, Material und Methoden.....	19
3.1	Studiendesign.....	19
3.2	Versuchstiere.....	20
3.3	Messsystem „FreeStyle Libre“	21
3.4	Sensorapplikation	24
3.5	Referenzmethode Hexokinasereaktion	27
3.6	Statistische Auswertung	27
4	Ergebnisse / Manuskripte	29
4.1	Manuskript 1: Praktische Anwendung des neuen Glukosemesssystems „FreeStyle Libre“ bei der Katze	29
4.2	Manuskript 2: Use of the “FreeStyle Libre“ glucose monitoring system in diabetic cats.	54

4.3	Manuskript 3: Praktische Anwendung des kontinuierlichen Glukosemesssystems „FreeStyle Libre“ beim Hund	82
5	Diskussion.....	119
6	Zusammenfassung.....	127
7	Summary	131
8	Literatur	135
9	Danksagung	143

1 Einleitung

Entscheidend für ein gutes Management von Patienten mit klinisch relevanten Glukoseimbilanzen ist oft eine möglichst hochfrequente Überwachung des Glukosegehalts im Blut bzw. der interstitiellen Flüssigkeit. Diabetes mellitus ist dabei eine der häufigsten Ursachen für teils lebensbedrohliche Abweichungen des Glukosegehalts im Blut in Form von Hyper- oder Hypoglykämien. Für die Katze wird für den Diabetes mellitus eine Auftretenswahrscheinlichkeit in einem klinischen Klientel von 1:100 bis 1:400 (REUSCH et al., 2006) angegeben. Die Inzidenz für Diabetes mellitus liegt für den Hund in der Gesamtpopulation bei schätzungsweise 0,3–1 % (NEUVIANS et al., 2002). Beim Hund ist damit der Diabetes mellitus neben dem Hyperadrenokortizismus die häufigste endokrinologische Erkrankung (KOHN et al., 2018).

Mit der Hilfe von kontinuierlich messenden Systemen („continuous glucose monitoring systems“, CGMS) können sehr detaillierte, weitgehend lückenlose Glukoseverlaufskurven erstellt werden. Dazu wird ein Sensor auf der Haut angebracht (BLUM, 2018), welcher kontinuierlich den Glukosegehalt der interstitiellen Flüssigkeit misst, der sich dem des Blutes anpasst. Beim Menschen dauert dieser Anpassungsvorgang ca. 5–10 Minuten (BASU et al, 2013), bei der Katze ca. 11,4 Minuten (MORETTI et al., 2010) und für den Hund wird eine zeitliche Verzögerung von < 10 Minuten angegeben (REBRIN et al., 1999). Die Frequenz der anfallenden Blutentnahmen kann durch die Sensoren deutlich reduziert werden oder sie können ganz entfallen (SURMAN et al., 2013), solange die Werte im messbaren Bereich des Sensors liegen.

Der „FreeStyle Libre“ (Abbott Laboratories, Chicago, USA) gehört zu den aktuellsten CGMS-Gerätetypen. Er bietet die Vorteile, dass Sensor und Lesegerät vollkommen getrennte Einheiten sind und unabhängig voneinander gelagert werden können. Auch die Messdauer ist mit 14 Tagen deutlich länger als bisher. Außerdem ist der Messbereich auf bis zu 27,8 mmol/l (500mg/dl) erweitert worden.

In vorherigen Studien beim Hund wurden bereits die gute Messgenauigkeit und Hautverträglichkeit bestätigt (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020). Das System entspricht nur eingeschränkt den Anforderungen der ISO 15197:2013, die allerdings für Kapillarblutglukosemesssysteme des Menschen gilt (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020, SILVA et al., 2020). Der „FreeStyle Libre“ weist im hypoglykämischen Bereich eine reduzierte Messgenauigkeit auf (SILVA et al., 2020).

Trotz dieser Einschränkungen verspricht das CGMS „FreeStyle Libre“ gute Voraussetzungen hinsichtlich der Überwachung von stationären Intensivpatienten und der Überwachung zu Hause durch den Tierbesitzer. Es einfach anzuwenden, verhältnismäßig kostengünstig und stressfrei zu applizieren. Außerdem ist die Messgenauigkeit gut. Ziele der Studie waren die Überprüfung der Messrichtigkeit im Vergleich zur Referenzmethode Hexokinasereaktion und der Akzeptanz des Glukose-Monitoring-System „FreeStyle Libre“, nicht nur wie bisher bei Hunden sondern auch bei Katzen.

2 Literaturübersicht

2.1 Diagnostik und Insulineinstellung beim Diabetes mellitus bei Katzen und Hunden

Bei Katzen und Hunden ist Übergewicht eines der Hauptrisikofaktoren zur Entstehung eines Diabetes mellitus (MCCANN et al., 2007; BEHREND et al., 2018). Auch andere Grunderkrankungen wie eine Hyper- oder Hypothyreose, Nierenerkrankungen oder ein Hyperadrenokortizismus können die Entstehung eines Diabetes mellitus begünstigen (BEHREND et al., 2018). Zusätzlich gelten Pankreatitis, diabetogene Medikamente oder der Östrus bei der Hündin als Risikofaktoren zur Diabetesentwicklung (BEHREND et al., 2018).

Die Ausprägung der Symptome ist von der Dauer der Erkrankung abhängig (ACKERMANN et al., 2018)). Zu den klassischen Symptomen gehören sowohl bei der Katze als auch beim Hund Polyurie, Polydipsie und Gewichtsverlust trotz guter Futteraufnahme (SPARKES et al., 2015). Im weiteren Verlauf treten Anorexie, Lethargie und Erbrechen auf (SPARKES et al., 2015; BEHREND et al., 2018). Bei der Katze entsteht im fortgeschrittenen Stadium in einigen Fällen eine plantigrade Fußung aufgrund einer peripheren Neuropathie (BEHREND et al., 2018; SPARKES et al., 2015). Beim Hund ist häufig die Entstehung eines Katarakts zu beobachten (BEHREND et al., 2018). Klinische Symptome werden meist erst sichtbar, wenn der Glukosegehalt im Blut die Resorptionsschwelle der Nieren überschreitet (SPARKES et al., 2015; BEHREND et al., 2018).

Nach einer ausführlichen Anamnese und Allgemeinuntersuchung des Tieres erfolgt die weitere Diagnostik (BEHREND et al., 2018). Dabei wird zuerst eine

Blutuntersuchung durchgeführt werden. Neben eines erhöhten Glukosegehaltes fällt beim Diabetes mellitus in der Regel auch ein erhöhter Fructosamingehalt auf (CRENSHAW et al., 1996). Bei Katzen besteht die Möglichkeit einer stressinduzierten Hyperglykämie, sodass bei Katzen zur Differenzierung zwischen einem Diabetes mellitus und einer Stresshyperglykämie immer der Fructosaminwert mitbestimmt werden sollte (GOTTLIEB et al., 2018; CRENSHAW et al., 1996). Der Fructosaminwert liefert außerdem einen Überblick über den Glukoseverlauf der vorherigen zwei Wochen (GOTTLIEB et al., 2018). Bei der gesunden Katze sollte er im Bereich bis zu 360 $\mu\text{mol/l}$ (GOTTLIEB et al., 2018), beim Hund im Bereich bis zu 370 $\mu\text{mol/l}$ (HÄMMERLING, 2009) liegen. Zu berücksichtigen ist auch, dass der Fructosaminwert bei einer Hypoalbuminämie reduziert sein kann (HÄMMERLING, 2009). Die Leberenzyme können aufgrund einer hepatischen Lipidose erhöht sein (BEHREND et al., 2018). Typisch für einen Diabetes mellitus ist auch der reduzierte Gehalt von Natrium, Kalium und Chlorid (HÄMMERLING, 2009). Eine Leukozytose ist aufgrund von begleitenden Entzündungen ebenfalls möglich (HÄMMERLING, 2009). Sollte sich das Tier bereits in einer Ketoazidose befinden, ist der Blut-pH-Wert deutlich erniedrigt (BEHREND et al., 2018).

Beim Verdacht auf Diabetes mellitus wird auch eine Urinuntersuchung mit mikrobiologischer Untersuchung durchgeführt (BEHREND et al., 2018). Im Fall einer Erkrankung ist eine Glukosurie nachweisbar, wenn die Blutglukosewerte die renale Resorptionsschwelle überschreiten (GOTTLIEB et al., 2018). Bei der Katze erfolgt die Überschreitung der Resorptionsschwelle ab einer Blutglukose von ca. 13,9–16,7 mmol/l (ca. 250–300 mg/dl) und beim Hund ab ca. 11,1 mmol/l (ca. 200mg/dl) (BEHREND et al., 2018). Auch das Vorliegen von Ketonkörpern ist möglich

(ACKERMANN et al., 2018). Zum Ausschluss einer Zystitis sollte eine mikrobiologische Untersuchung durchgeführt werden (BEHREND et al., 2018; ACKERMANN et al., 2018)

Zum Ausschluss von Begleiterkrankungen sollte neben der bereits erwähnten Urinuntersuchung zum Ausschluss einer Zystitis auch ein Abdomenultraschall durchgeführt werden. In Folge der erhöhten Fettmobilisation entsteht häufig eine hepatische Lipidose und in Folge eine Hepatomegalie (BEHREND et al., 2018; ACKERMANN et al., 2018). Bei der sonografischen Untersuchung des Pankreas ist auf Umfangsvermehrungen und auf Hinweise für eine vorliegende Pankreatitis zu achten (DAVISON, 2015; CANEY, 2013).

Ziel der Diabetestherapie ist die Reduktion der klinischen Symptomatik, die Verbesserung der Lebensqualität sowohl des Tieres als auch der seines Besitzers und die Vermeidung von Hypoglykämien (SPARKES et al., 2015, BEHREND et al., 2018; ACKERMANN et al., 2018). Bei Katzen kann im besten Falle sogar eine Remission herbeigeführt werden (BEHREND et al., 2018). Die Remission beim Hund ist selten, kann aber bei intakten Hündinnen durch die Kastration möglich sein (BEHREND et al., 2018).

Zur Therapie des Diabetes mellitus stehen verschiedene Insuline zur Verfügung. Zur kurzfristigen Senkung des Insulinspiegels kann auf ein Alt-Insulin zurückgegriffen werden. Dessen Wirkung beginnt nach ca. 15 Minuten, erreicht ihr Maximum nach ca. 2–4 Stunden und wirkt insgesamt ca. 4–8 Stunden (HÄMMERLING, 2009). Aufgrund seiner kurzen Wirkdauer wird es bei Tieren in diabetischen Krisen oder bei anorektischen Patienten eingesetzt (HÄMMERLING, 2009). Die dauerhafte Insulintherapie kann mit Intermediär-Insulinen gestartet werden.

Dabei ist der Nadir bei der Katze nach 2–8 Stunden (BEHREND et al., 2018) und beim Hund nach ca. 1–10 Stunden zu erwarten (GRAHAM et al., 1997). In einigen Fällen muss auf ein langwirksames Insulin zurückgegriffen werden, welches seine maximale Wirksamkeit bei der Katze nach 12–14 Stunden (BEHREND et al., 2018) und beim Hund nach 6–10 Stunden erreicht (FRACASSI et al., 2017) und bei beiden Tierarten insgesamt 18–24 Stunden wirkt (HÄMMERLING, 2009).

Der optimale Nadirwert liegt sowohl bei der Katze als auch beim Hund bei 4,4–8,3 mmol/l (80–150 mg/dl) (BEHREND et al., 2018). Ein zu niedriger Nadir ($< 3,3$ mmol/l [< 60 mg/dl]) kann den Somogyi-Effekt (d.h. eine Hypoglykämie-bedingte Hyperglykämie) auslösen (ROOMP et al., 2016; ACKERMANN et al., 2018). Bei der Katze sollte der höchste Blutglukosewert nicht über 16,7 mmol/l (300 mg/dl), beim Hund nicht über 11,1 mmol/l (200 mg/dl) liegen (BEHREND et al., 2018). Insulinanpassungen sollten in nicht zu kurzen Abständen erfolgen. Es wird empfohlen, die Insulindosis maximal 1–2x pro Woche zu verändern, es sei denn, es treten Nadirwerte $< 4,4$ mmol/l (< 80 mg/dl) (BEHREND et al., 2018) auf. In diesen Fällen muss die Insulindosis sofort reduziert werden (BEHREND et al., 2018). Bei Katzen ist weiter zu berücksichtigen, dass es im Therapieverlauf zur Remission kommen kann und der Insulinbedarf deutlich sinken oder das Insulin sogar abgesetzt werden muss (BEHREND et al., 2018).

Speziesunabhängig sollten diabetische Tiere unter Insulinsubstitution engmaschig überprüft werden (ACKERMANN et al., 2018, BEHREND et al., 2018). Einmalige Glukosewertbestimmungen sind nicht ausreichend (HÄMMERLING, 2009). Neben der Blutglukose sollten auch regelmäßig der Glukosegehalt im Urin, der

Fructosaminwert, die klinische Symptomatik und das Körpergewicht geprüft werden (BEHREND et al., 2018).

Besonders bei der initialen Insulineinstellung, 7-14 Tage nach einem Dosiswechsel, aber auch alle 3 Monate bei gut eingestellten Patienten sollte die Anfertigung von Tagesprofilen erfolgen (BEHREND et al., 2018). Auch beim Wiederauftreten von Symptomen, dem Verdacht auf eine Hypoglykämie oder in diabetischen Krisen wie z.B. einer diabetischen Ketoazidose (MALERBA et al., 2020; SILVA et al. 2020) ist ein Tagesprofil ratsam (BEHREND et al., 2018). Dazu wird bei den Patienten alle 2–4 Stunden (je nach Insulinart) der Blutglukosegehalt mittels Glukometer bestimmt (ACKERMANN et al., 2018; BEHREND et al., 2018). Für den Hund eignen sich zur Überwachung auch sogenannte CGMS (continuous glucose monitoring systems), die den Glukosegehalt in der interstitiellen Flüssigkeit messen (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020; SILVA et al. 2020). Ziel beider Methoden ist die Überprüfung der Insulinwirkung, die Ermittlung des Glukosetiefpunkts (Nadir) und ggf. die Detektion des Somogyi-Effekts (SPARKES et al., 2015; BEHREND et al., 2018; ACKERMANN et al., 2018).

Neben der tierärztlichen Kontrolle ist auch die Kontrolle durch den Tierbesitzer im heimischen Umfeld essentiell (SPARKES et al., 2015; BEHREND et al., 2018; ACKERMANN et al., 2018). Der Besitzer muss den Glukosehaushalt seines Tieres zu Hause überwachen, zum Beispiel mit einem Glukometer (CASELLA et al., 2003; VAN DE MAELE et al., 2005). Dabei sollten die ermittelten Werte in einem Tagebuch o.ä. notiert werden (BEHREND et al., 2018; ACKERMANN et al., 2018). Außerdem sollten Trinkmengenprotokolle angefertigt werden und regelmäßig die Harnabsatzmenge beurteilt werden (ACKERMANN et al., 2018). Die Tiere sollten regelmäßig gewogen

werden (BEHREND et al. ,2018; ACKERMANN et al., 2018). Auch auf Anzeichen einer Hypoglykämie, wie zum Beispiel schwankender Gang, Mattigkeit und Krampfgeschehen ist zu achten (BEHREND et al., 2018).

Das Wichtigste ist jedoch immer, dass jeder Patient nach seinem individuellen Therapieplan mit seinen eigenen Kontrollfrequenzen behandelt, der seine Reaktion auf die Therapie berücksichtigt (BEHREND et al., 2018).

2.2 Methodik zur Bewertung der Messgenauigkeit von Blutzuckermessgeräten

Die Methodik zur Beurteilung der Messgenauigkeit von Blutzuckermessgeräten für den Mensch ist in der ISO 151907:2013 festgelegt. Zweck dieser Norm ist die Definition von Anforderungen, um die Leistung der Geräte prüfen und belegen zu können. Sie gilt nicht für kontinuierlich messende Systeme, da diese Systeme den Glukosegehalt in der interstitiellen Flüssigkeit und nicht im Blut messen (BSI STANDARDS PUBLICATION, 2013). Für Tiere und CGMS existiert noch keine eigene Norm, sodass hier die Anforderungen für humane Blutzuckermessgeräte angewendet werden, weil sie einen guten Anhaltspunkt zur Einschätzung der Systemgenauigkeit liefern. In der ISO-Norm werden zwei Kriterien genannt: für mindestens 95% der Messwerte im Glukosebereich $< 5,6 \text{ mmol/l}$ ($< 100 \text{ mg/dl}$) soll die Abweichung nicht mehr als $\pm 0,8 \text{ mmol/l}$ ($\pm 15 \text{ mg/dl}$) betragen. Im Glukosebereich $\geq 5,6 \text{ mmol/l}$ ($\geq 100 \text{ mg/dl}$) soll die Abweichung für ebenfalls mindestens 95% der Messwerte nicht mehr als $\pm 15 \%$ betragen. Außerdem werden alle Werte in eine sogenannte Parkes Fehlerraster Analyse (= Parkes Error Grid Analysis oder auch Consensus Error Grid) eingetragen (PARKES et al., 2000). Dieses Raster gruppiert die Vergleichsmessungen in die Zonen

A bis E, die die Auswirkung der Abweichung der Werte des Blutzuckermessgerätes im Vergleich zu einer Referenzmethode auf die Entscheidung für das klinische Management beschreiben (PFÜTZNER et al., 2013). Beim Parkes Error Grid handelt es sich um eine Anpassung des Clarke Error Grid, wobei die Grenzen der einzelnen Zonen überarbeitet wurden. Das Clarke Error Grid wurde erstmalig 1987 zur Evaluierung von Blutzuckermessgeräten etabliert (CLARKE et al., 1987). In beiden Modellen haben die Abweichungen in Zone A keine Auswirkung auf die Therapie. Abweichungen in Zone B haben eine Änderung des klinischen Managements zur Folge, welche aber nur eine geringe oder keine Auswirkung auf das Behandlungsergebnis hat. Abweichungen in Zone C haben ebenfalls ein geändertes klinisches Management zur Folge, aber mit einer wahrscheinlichen Auswirkung auf das Behandlungsergebnis. Die stark abweichenden Messwerte in Zone D könnten zu einer anderen Therapie führen und damit ein signifikantes medizinisches Risiko bedeuten. Abweichungen in Zone E würden sogar gefährliche Konsequenzen haben, da das klinische Management ein anderes wäre.

2.3 Glukometer: Klassische Methode der Blutglukoseüberwachung

Die Überwachung der Blutglukose mittels Glukometer ist eine klassische Methode zur Selbstanwendung durch den humanen Patienten oder durch den Tierhalter bei seinem Tier (COHEN et al., 2009). Zur Messung wird ein Tropfen Kapillarblut mit einem Teststreifen aufgenommen und vom Glukometer analysiert. Es handelt sich dabei entweder um elektrochemische oder photometrische Messungen (COHEN et al., 2009).

Es erfolgten bislang diverse Studien zur Überprüfung von sowohl für den Menschen als auch für Tiere entwickelten Glukometern im Hinblick auf die Anwendung bei Katze und Hund. An dieser Stelle sind besonders die Studien zur Überprüfung von Tierglukometern vs. Humanglukometern (ZINI et al., 2009; COHEN et al., 2009), von mehreren Tierglukometern untereinander (KANG et al., 2016) und von Humanglukometern beim Tier (DOMORI et al., 2014) zu erwähnen.

Bereits 2009 wurde in einer Studie das speziell für Katzen und Hunde entwickelte Glukometer „AlphaTRAK“ (Abbott Animal Health; jetzt Zoetis, Parsippany, USA) mit einem Humanglukometer und mit der Hexokinasereaktion verglichen, wobei speziell die Anwendbarkeit bei der Katze überprüft wurde (ZINI et al., 2009). Das „AlphaTRAK“ zeigte bei der Katze ähnliche Werte wie die Referenzmethode Hexokinasereaktion. Das Humanglukometer unterschätzte die Werte hingegen. Eine mögliche Fehlerquelle des „AlphaTRAK“ bei der Benutzung war die fehlerhafte Tierarteinstellung. Wurde statt der Tierart „Katze“ fälschlicherweise die Tierart „Hund“ eingestellt, wurden die Werte überschätzt, was unter Umständen zu falschen Entscheidungen in der Therapie geführt hätte (ZINI et al., 2009). Alle Abweichungen des „AlphaTRAK“ und des Humanglukometers lagen in den unkritischen Zonen des Clarke Error Grid (ZINI et al., 2009).

Auch in einer caninen Studie wurde die gute Messgenauigkeit des „AlphaTRAK“ bestätigt (COHEN et al., 2009). Insgesamt wurden sechs Glukometer überprüft, davon war nur das „AlphaTRAK“ zur Anwendung bei Katze und Hund zugelassen. Bei den restlichen fünf Glukometern handelte es sich um Humanglukometer. Alle Geräte zeigten beim Hund eine sehr gute Korrelation zur Referenzmethode Hexokinasereaktion ($r_s = 0,96–0,98$) (COHEN et al., 2009).

Humanglukometer können nicht ungeprüft bei Katze und Hund angewendet werden (DOMORI et al., 2014). In dieser Studie wurden zwei Humanglukometer an Katzen und Hunden getestet, wobei ein Glukometer gut mit der Referenzmethode korrelierte ($r_s = 0,93$ [Katze]; $r_s = 0,94$ [Hund]) und 52,5 % (Katze) bzw. 84,8 % (Hund) der Werte in den akzeptablen Messbereichen lagen (DOMORI et al., 2014). Das andere Glukometer zeigte jedoch große Abweichungen ($r_s = 0,84$ [Katze]; $r_s = 0,82$ [Hund]) und es lagen 92,5 % (Katze) bzw. 86,5 % (Hund) der Werte außerhalb der akzeptablen Messbereiche (DOMORI et al., 2014).

2015 wurden vier verschiedene spezielle Tierglukometer für Katzen und Hunde auf ihre Messgenauigkeit im Vergleich zur Referenzmethode Hexokinasereaktion überprüft (KANG et al., 2016). Neben dem bereits erwähnten „AlphaTRAK“ wurden noch die Geräte „Accu-Check Performa“ (Roche Diagnostics Inc., Indianapolis, USA), „CERA-PET“ (Ceragem Medisys, Seoul, Korea) und „VetMate“ (i-SENS, Seoul, Korea) getestet. Die Studie umfasste 85 Katzen und 155 Hunde, deren Glukometermessungen mit der Referenzmethode Hexokinasereaktion überprüft wurden. Es zeigten sich bei allen Geräten gute Korrelationen zur Referenzmethode ($r_s = 0,98$ – $0,99$ bei der Katze bzw. $r_s = 0,96$ – $0,99$ beim Hund). Die medianen Abweichungen wurden bestimmt und diese nach den Anforderungen der ISO 15197:2003 analysiert. Bis auf das „CERA-Pet“ eigneten sich alle anderen Glukometer für die Glukoseüberwachung von Katzen und Hunden (KANG et al., 2016). Grund für die Einschätzung der mangelnden Messgenauigkeit des „CERA-Pet“ bei beiden Tierarten war der verhältnismäßig hohe Anteil von Abweichungen in Zone D (1,2% bei der Katze bzw. 3,2% beim Hund) der Error Grid Analyse und die große Menge von Abweichungen von über $\pm 0,8$ mmol/l (für Werte $< 5,6$ mmol/l bzw. $\pm 20\%$ für Werte

$\geq 5,6$ mmol/l). Zu beachten ist hierbei, dass in der Studie die ältere ISO 15197:2003 verwendet wurde (hier liegt die Toleranzgrenze bei $\pm 20\%$ für Werte $\geq 5,6$ mmol/l; in der aktuellen ISO 15197:2013 liegt diese bei nur noch $\pm 15\%$).

Es wird generell empfohlen nur Glukometer zu verwenden, die für die jeweilige Tierart zugelassen sind (BEHREND et al., 2018). Der Grund hierfür liegt in der unterschiedlichen Verteilung der Glukose im Blut, der unterschiedlichen Erythrozytengröße und des unterschiedlichen Hämatokrits. Beim Menschen befindet sich 58% der Glukose im Plasma und 42% in den Erythrozyten. Bei der Katze und beim Hund sind 93% bzw. 88 % der Glukose im Plasma zu finden und nur 7 % bzw. 12 % in den Blutkörperchen. Diese Verteilungsmuster sind wichtig für die Berechnung des Glukosegehalts durch das Glukometer. Da es sich bei den Glukometermessungen teilweise um photometrische Messungen handelt, ist die unterschiedliche Erythrozytenmorphologie ein wichtiger Faktor für eine genaue Messung und es kann aufgrund der unterschiedlichen Morphologie zu Messdifferenzen kommen.

Nachteilig an der Glukometermessmethode ist die regelmäßige Venenpunktion, um den Blutropfen für die Messung zu gewinnen. Sie verursacht Stress und Schmerzen bei den Patienten (DAVISON et al., 2003). Außerdem besteht die Gefahr, bei der üblichen Überwachung im 2-Stundentakt die wichtigen Glukosepeaks bzw. den Nadir zu übersehen (DAVISON et al., 2003).

2.4 Kontinuierlich messende Systeme: Überwachung des interstitiellen Glukosegehaltes

Erste kontinuierlich messende Sensoren wurden bereits seit 2003 sowohl beim Hund getestet (u. a. DAVISON et al., 2003; WIEDMEYER et al., 2005; REINEKE, 2010), als auch bei weiteren Tierarten wie dem Pferd, der Katze und dem Rind (WIEDMEYER et al., 2005). Die Tiere wurden mit dem System „MiniMed“ (Medtronic Ltd., Northridge, USA) überwacht. Gleichzeitig wurde die Blutglukose mittels Glukometer bzw. Hexokinasereaktion kontrolliert. Das dazu verwendete System bestand aus einem Sensor, welcher über ein Kabel mit einer Speichereinheit verbunden war. Der Sensor wurde in der Flanke appliziert und zusätzlich mit einem Klebeband fixiert. Der Monitor und alle Systembestandteile mussten dementsprechend dauerhaft am Hund (z.B. an einem Brustgeschirr) befestigt werden, was die Patienten physisch einschränkte. In einer der Studien (DAVISON et al., 2003) wurden die Sensoren für 24–48 Stunden am Tier belassen, wobei die maximale Messdauer lediglich 72 Stunden laut Gerätespezifikation betragen hätte (DAVISON et al., 2003). Neben der kurzen Messdauer war auch der etwas geringere Messbereich von 2,2–22,2 mmol/l (40–400 mg/dl) ein limitierender Faktor des Systems (DAVISON et al., 2003). Zusätzlich musste das Gerät sowohl initial als auch während der Messperiode mit Vergleichsmessungen der Blutglukose kalibriert werden (REINEKE et al., 2010). Sämtliche Ergebnisse waren erst nach der Messperiode verfügbar, sodass die unmittelbare Anpassung der Insulindosis aufgrund der Messergebnisse oder andere direkte Reaktion nicht möglich war. Der Sensor hat alle zehn Sekunden den interstitiellen Glukosegehalt gemessen und bildete selbstständig einen Mittelwert für einen Zeitraum von fünf Minuten. Dieser Mittelwert wurde dann auf die Speichereinheit übertragen, auf der alle Messwerte bis

zur Auswertung am Ende der Messperiode aufgezeichnet wurden (REINEKE et al., 2010). In den Studien erfolgte die Applikation problemlos (DAVISON et al. 2003, REINEKE et al., 2010) und die Haut an der Sensorstelle zeigte keine Reaktionen nach der Entfernung (DAVISON et al., 2003) und es musste kein Sensor aufgrund von Hautirritationen, Schmerzen, Blutungen oder Infektionen entfernt werden (REINEKE, 2010). Die Korrelation der Ergebnisse des „MiniMed“ und des Glukometers betrug $r_s = 0,81$ (DAVISON et al., 2003) bzw. $r_s = 0,85$ (REINEKE, 2010). Die Abweichungen lagen zu 99,0 % in Zone A und B des Consensus Error Grid (REINEKE et al., 2010). Die Messgenauigkeit bei Katze und Hund war nicht abhängig vom Body Condition Score, der peripheren Durchblutung oder dem Grad der Ketoazidose (REINEKE et al., 2010).

Die nächste Generation der kontinuierlich messenden Glukosemesssysteme („continuous glucose monitoring systems“, CGMS) zeichnete sich dadurch aus, dass der Sensor und das Lesegerät nicht mehr mit einem Kabel verbunden waren und dass die Daten sofort ablesbar waren (MORETTI et al., 2010). Bei der Katze wurden 2010 bzw. 2013 drei Studien (MORETTI et al., 2010; HAFNER et al., 2013, SURMAN et al., 2013) und beim Hund zwei Studien (SURMAN et al., 2013; KOENIG et al., 2016) mit dem System „Guardian Real-Time“ (Medtronic plc, Dublin, Irland) durchgeführt. Das System musste ebenfalls initial und auch während der Monitoringphase mit einer Blutglukosebestimmung kalibriert werden. Die Messung konnte frühestens zwei Stunden nach Beginn gestartet werden. Die Sensoren besaßen eine maximale Messdauer von drei Tagen. Der Messbereich betrug ebenfalls nur 2,2–22,2 mmol/l (40–400 mg/dl) (SURMAN et al., 2013). Der Empfangsmonitor musste sich je nach Modell stets in einem Radius von maximal 1,5–6 Metern um den Sensor befinden.

Es wurden Kontrollmessungen zwischen dem „Guardian Real-Time“ und dem Glukometer „AlphaTrak“ bei Katzen durchgeführt (MORETTI et al., 2010; HAFNER et al., 2013), welches bereits erfolgreich getestet wurde und eine gute Übereinstimmung zu den Messwerten der Hexokinasereaktion zeigte (ZINI et al., 2009). Obwohl die Gesamtkorrelation $r_s = 0,95$ betrug, war sie im hypoglykämischen Bereich deutlich niedriger ($r_s = 0,63$) als im normo- ($r_s = 0,73$) und hyperglykämischen Bereich ($r_s = 0,99$) (MORETTI et al., 2010). Bei der Verteilung der Werte im Clarke Error Grid zeigte sich, dass im normoglykämischen Bereich (3,9–9,99 mmol/l [70–180 mg/dl]) alle Werte in Zone A oder B fielen, im hyperglykämischen Bereich ($> 9,99$ mmol/l [> 180 mg/dl]) befanden sich 96,1 % der Werte in Zone A oder B, aber jedoch auch 3,9 % in Zone D. Im hypoglykämischen Bereich ($< 3,9$ mmol/l [< 70 mg/dl]) lagen sogar nur 91 % der Werte in Zone A und B und 9 % in Zone D (MORETTI et al., 2010).

In je einer Studie wurde neben der generellen Messgenauigkeit auch die Messgenauigkeit in Abhängigkeit von der Sensorlokalisation bei Katze und Hund betrachtet (HAFNER et al., 2013; KOENIG et al., 2016). Bei den Katzen (HAFNER et al., 2013) wurde mit dem „Guardian Real-Time“ die Lokalisation im Nackenbereich, in der Kniefalte und an der seitlichen Thoraxwand überprüft. Dabei lieferten alle Sensoren insgesamt gut korrelierende Messwerte. Die Sensoren im Nackenbereich lieferten die besten Ergebnisse, die an der seitlichen Thoraxwand wiesen minimal größere Abweichungen auf. Bei den Hunden lieferten die Sensoren an der seitlichen Brustwand die genauesten Ergebnisse im Vergleich zur Lokalisation im Nackenbereich, Lumbalregion und Bauchwand (KOENIG et al., 2016). In beiden Studien gab es jedoch auch große Unterschiede in der Messgenauigkeit zwischen den einzelnen Tieren.

2014 kam mit dem „FreeStyle Libre“ (Abbott Laboratories, Chicago, USA) ein weiter modifiziertes CGMS auf den Markt. Sensor und Lesegerät sind von nun an vollkommen getrennte Einheiten. Es verbleibt lediglich der Sensor am Mensch. Das Handlesegerät kann sensorunabhängig aufbewahrt werden¹.

Seit 2015 erfolgten diverse Studien mit dem „FreeStyle Libre“ bei humanen Patienten (u. a. BAILEY et al., 2015; FOKKERT et al., 2017; U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017; BLUM, 2018). Die Ergebnisse des „FreeStyle Libre“ wurden mit dem im Lesegerät eingebauten Glukometer (BAILEY et al., 2015), mit dem biochemischen Analysegerät „YSI Analyzer“ (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA) (BAILEY et al., 2015), dem Glukometer „StatStrip“ (FOKKERT et al., 2017) und der Hexokinase-Methode (FOKKERT et al., 2017) verglichen. Im Vergleich zum internen Glukometer lagen 99,7 % aller Werte in den Zonen A und B des Parkes Error Grid. Beim Vergleich mit dem YSI-Analyser lagen alleine bereits 86,7 % in Zone A (BAILEY et al., 2015). Ähnliche Ergebnisse wurden beim Vergleich zum Glukometer „StatStrip“ (Nova Biomedical, Massachusetts, USA) gefunden (FOKKERT et al., 2017). Hier lagen bereits 85,5 % in Zone A (FOKKERT et al., 2017). Es zeigte sich eine gute Korrelation zur Glukometer-Referenzmethode ($r_s = 0,95$) (BAILEY et al., 2015). Die mediane relative Abweichung im Vergleich zur internen Glukometermessung lag bei 11,4 % (BAILEY et al., 2015). Weitere Beobachtungen waren, dass der „FreeStyle Libre“ niedrige Glukosewerte unterschätzte, während hohe Glukosewerte im Vergleich zur gewählten Referenzmethode Glukometer „StatStrip“ überschätzt wurden (FOKKERT et al., 2017). Die zeitliche Verzögerung zwischen der Angleichung des

¹ Quelle: <https://www.freestylelibre.de/libre/discover/erste-schritte.html> (aufgerufen am 17.09.2020)

interstitiellen Glukosegehaltes an den des Blutes betrug $4,5 \pm 4,8$ Minuten (BAILEY et al., 2015). Es wurde während der Sensortragedauer in 0,5 % der Fälle ein mäßiger bis starker Juckreiz und in 4,0 % der Fälle ein mäßiges Erythem an der Sensorstelle beobachtet (BAILEY et al., 2015). Ähnlich milde Reaktionen wurden auch bei US-amerikanischen Studienteilnehmern beobachtet. Es wurden nur geringe Nebenwirkungen in Form von kleinen Verletzungen an der Einstichstelle des Sensors, einer leichten Rötung im Bereich des Sensors, einer milden Infektion oder einer Pustelbildung beschrieben (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017). Die Messgenauigkeit wurde weder durch den Body Mass Index, das Alter, den Diabetes-Typ, die Applikationsstelle oder die Insulingabe beeinflusst (BAILEY et al., 2015). Die U.S. Food and Drug Administration schätzt den „FreeStyle Libre“ als sicher für die Anwendung beim Menschen ein (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

Beim Hund erfolgten auch bereits einige Studien zur Anwendung des „FreeStyle Libre“ (CORRADINI et al., 2016; SILVA et al., 2020; MALERBA et al., 2020). Die Applikation erfolgte in allen drei Studien zügig, schmerzfrei und mit geringem Aufwand und wurde gut von den Hunden toleriert. Der Sensor wurde dabei im Nackenbereich appliziert und zusätzlich mit einer Klebefolie und einer elastischen Bandage fixiert (CORRADINI et al., 2016; SILVA et al., 2020; MALERBA et al., 2020). Bei 5/10 bzw. bei 12/13 Hunden war nach der Sensorentfernung keine Hautveränderung erkennbar und bei 5/10 (CORRADINI et al., 2016) bzw. 1/13 Hunden (MALERBA et al., 2020) war eine leichte Hautrötung erkennbar. Nur in einer der Studien wurde bei zwei von insgesamt sieben Hunden eine massive Kontaktallergie im Bereich des Sensors und der zusätzlichen Klebefolie beobachtet (SILVA et al., 2020). Der Korrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) der gemessenen Werte im Blut und in der interstitiellen Flüssigkeit

betrug $r_s = 0,94$ bei einer mittleren Abweichung von $0,13 \pm 2,6$ mmol/l ($2,3 \pm 46,8$ mg/dl) (CORRADINI et al., 2016). Für den hypoglykämischen Bereich ($< 3,9$ mmol/l [< 70 mg/dl]) betrug $r_s = 0,43$, für den normoglykämischen Bereich ($3,9\text{--}9,99$ mmol/l [$70\text{--}180$ mg/dl]) $r_s = 0,5$ und für den hyperglykämischen Bereich ($> 9,99$ mmol/l [> 180 mg/dl]) $r_s = 0,85$ (CORRADINI et al., 2016). Die reduzierte Messgenauigkeit im hypoglykämischen Bereich beim Hund wurde in einer weiteren Studie bestätigt (SILVA et al., 2020).

Neben der Korrelation wurde ebenfalls die Anwendbarkeit nach der ISO 15197:2013 überprüft (BSI STANDARDS PUBLICATIONS, 2013). Es lagen nur wenige Abweichungen im Toleranzbereich von $< 0,8$ mmol/l (< 15 mg/dl) für Werte $< 5,6$ mmol/l (< 100 mg/dl) bzw. $< 15\%$ für Werte $\geq 5,6$ mmol/l (≥ 100 mg/dl) vor. Außerdem wurde die Verteilung der Messdaten im Parks Consensus Error Grid analysiert. In allen drei Studien lagen über 99 % der Abweichungen in den unkritischen Zonen A und B. Es wurde also jeweils nur das erste Kriterium der ISO 15197:2013 verfehlt, während das zweite erfüllt wurde (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020). Auch beim Vergleich zwischen dem „Freestyle Libre“ und einem Glukometer zeigte sich eine gute Korrelation von $r_s = 0,93$ und es konnten 99,6 % der Werte in die Zonen A und B des Parkes Consensus Error Grid eingeordnet werden (MALERBA et al., 2020). Weder Körpergewicht noch Sensortragzeit hatten einen Einfluss auf die Messgenauigkeit (MALERBA et al., 2020). Alle Studien kamen zu dem Ergebnis, dass der „Freestyle Libre“ geeignet war, diabetische Hunde (CORRADINI et al., 2016) und Hunde in einer diabetischen Ketoazidose (MALERBA et al., 2020; SILVA et al., 2020) zu überwachen.

3 Untersuchungsgut, Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Die Studie umfasste 34 Katzen und 26 Hunde, bei denen aus medizinischer Indikation zur engmaschigen Blutzuckermessung im Zeitraum von Oktober 2016 bis Oktober 2019 insgesamt 66 bzw. 40 Sensoren des CGMS (continuous glucose monitoring system) „FreeStyle Libre“ angebracht wurden.

Nach Vorstellung der Tiere und erfolgter Diagnostik wurden der Sensor i. d. R. noch am selben Tag der stationären Aufnahme angebracht. Neben der Beurteilung des Tierverhaltens beim Anbringen und Entfernen des Sensors wurden die Tiere täglich klinisch untersucht und die Akzeptanz des Sensorablesens beobachtet. Für Vergleichsmessungen mittels Hexokinase-Methode wurde den Tieren zu Beginn des Glukosemonitorings mindestens viermal täglich (im späteren Therapieverlauf bei stabileren Werten ggf. in einer reduzierten Anzahl) jeweils maximal 0,5 ml Heparinblut mittels Venenpunktion (bei Vorhandensein eines Zentralvenenkatheters ggf. aus diesem mittels „Dreispritzentechnik“) entnommen. Die Zeitpunkte richteten sich nach der Art und Applikationsroute des Insulins und den individuellen Verläufen der Blutglukosewerte. Bei zweimal täglicher subkutaner Insulininjektion erfolgten Blutprobenentnahmen vor der jeweiligen Insulininjektion und meistens zusätzlich um den Zeitpunkt, an dem der Sensor die niedrigsten Werte anzeigte (Nadir). Während Altinsulin-Infusionen erfolgten die Blutentnahmen in regelmäßigen Abständen von z. B. sechs Stunden. Zur selben Zeit wurde der Sensor ausgelesen und der Glukosewert auf dem Überwachungsprotokoll des Patienten notiert. Zudem erfolgte unmittelbar nach Sensorentfernung die adspektorische Untersuchung der Haut auf

Veränderungen. Die euthanasierten Tiere wurden hierbei (außer bei der feline Pilotstudie [Manuskript 1]) nicht berücksichtigt.

Alle Untersuchungen und Behandlungen wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes nach Prüfung des Tierversuchsantrages durch den Tierschutzbeauftragten der Tierärztlichen Hochschule Hannover und nach Anzeige beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) (Aktenzeichen 17A 172) durchgeführt. Zudem wurde jeweils vor Anbringung der Sensoren die Erlaubnis des Besitzers eingeholt.

3.2 Versuchstiere

Die Studie wird an Katzen (*Felis silvestris catus*) und Hunden (*Canis lupus familiaris*) aus dem Patientengut der Klinik für Kleintiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt. Bedingung zur Teilnahme an der Studie war eine Glukoseimbalance in Form einer Hyper- oder Hypoglykämie.

Die feline 34 Studienpatienten umfassten 26 Europäische Kurzhaarkatzen, drei Norwegische Waldkatzen, zwei Maine Coon und je eine Britisch Kurzhaarkatze, Sphinx und Birma. Davon waren 23 Tiere männlich-kastriert, zehn weiblich-kastriert und weiblich-unkastriert mit einem medianen Alter von 10,7 Jahren (1–17,2 Jahre; Minimum–Maximum) und einem medianen Gewicht von 4,7 kg (1,6–8,2 kg). 33 Katzen litten an einem Diabetes mellitus (basierend auf der Anamnese, den Laborveränderungen inkl. Fructosamin und den Symptomen), teilweise in Verbindung mit einer Pankreatitis und oder hepatischen Lipidose, die sonografisch oder zytologisch festgestellt wurden.

Die 26 caninen Studienpatienten umfassten neben sechs Mischlingen folgende Rassehunde: drei West Highland White Terrier, je zwei Havaneser, Jack Russell Terrier und Yorkshire Terrier, sowie je einen Australien Shepherd, Boxer, Cairn Terrier, Deutschen Schäferhund, Golden Retriever, Labrador, Malteser, Mittelschnauzer, Pinscher, Rhodesian Ridgeback und einen Riesenschnauzer. Davon waren zehn Hunde männlich-kastriert, acht weiblich-kastriert, vier männlich-unkastriert und vier weiblich-unkastriert. Das mediane Alter betrug 10,4 Jahre (5,2–15,6 Jahre; Minimum–Maximum). Die Hunde hatten ein medianes Gewicht von 9,3 kg (2,0–44,5 kg). Bei 25 Hunden wurde ein Diabetes mellitus diagnostiziert, von denen sich sechs Hunde in einer diabetischen Ketoazidose befanden. Bei acht Hunden konnte sonografisch eine Pankreatitis diagnostiziert werden und bei drei Hunden wurde eine Umfangsvermehrung im Bereich des Pankreas detektiert. Nur einer der 26 Hunde war zum Zeitpunkt der Erstvorstellung hypoglykämisch und zeigte sonografisch eine Umfangsvermehrung im Bereich des Pankreas, die auf Besitzerwunsch nicht näher untersucht wurde.

3.3 Messsystem „FreeStyle Libre“

Das kontinuierliche Glukose-Monitoring-System „FreeStyle Libre“ besteht aus einem Sensor (Sensoreinheit mit feinem Messfilament) und einem Handlesegerät (Abb. 1). Die Sensoreinheit ist ca. 3,5 cm groß im Durchmesser, ca. 0,5 cm hoch und nur wenige Gramm schwer. An der mit klebender Substanz beschichteten Unterseite befindet sich das hauchdünne Messfilament (Abb. 2), welches den Glukosegehalt in der interstitiellen Flüssigkeit misst. Eine Sensorkalibrierung mittels einer Blutprobe wie bei älteren Gerätetypen ist nicht mehr nötig (CORRADINI et al., 2016). Nach der

Initialisierung durch das Lesegerät dauert die Kalibrierung 60 Minuten. Anschließend misst der Sensor bis zu 14 Tage lang. Der Sensor bestimmt selbstständig einmal pro Minute den Glukosegehalt, welcher beim Scanvorgang auf dem Lesegerät angezeigt wird, und bildet 15-Minuten-Durchschnittswerte, zu denen die manuell abgelesenen Werte hinzugefügt werden. Das Handlesegerät misst in einem Abstand von bis zu 4 cm vom Sensor, sodass ein direkter Tierkontakt nicht nötig ist. Das Lesegerät kann unabhängig vom Tier bzw. Sensor gelagert werden. Auf dem Touchdisplay des Handlesegeräts werden sowohl der aktuelle Glukosewert als auch Verlaufskurven und die Tendenz des Glukosewertverlaufs in Form eines Pfeils angezeigt. Der Sensor speichert die Werte bis zu acht Stunden und muss dann abgelesen werden, da die Daten sonst überschrieben werden und Datenlücken in der Dokumentation entstehen. Auf dem Lesegerät selbst können die Daten aufgrund eines deutlich größeren internen Speichers für drei Monate gespeichert werden. Ein Datenexport mit der kostenlosen Herstellersoftware ist zu jeder Zeit möglich. Nach Verbindung mit dem PC und erfolgter Datenübertragung können weitere Diagramme (Tages-, Wochen- und Monatsübersichten) erstellt werden. Der Messbereich des Sensors umfasst ein Intervall von 2,2–27,8 mmol/l (40–500 mg/dl).



Abb. 1: „Starterpaket“ des Glukose-Monitoring-Systems „FreeStyle Libre“ bestehend aus Sensor mit Applikationsvorrichtung, Handlesegerät, USB-Kabel und Ladegerät für die Steckdose (Foto: Abbott Laboratories, mit freundlicher Genehmigung)



Abb. 2: Sensor in der Frontal- und Seitenansicht (Fotos: Abbott Laboratories, mit freundlicher Genehmigung)

Werte unter 2,2 mmol/l (40 mg/dl) werden zusammenfassend als „LO“ und Werte über 27,8 mmol/l (500 mg/dl) werden als „HI“ angezeigt. Die maximale Messdauer beträgt laut Herstellerangaben¹ für den Menschen bis zu 14 Tage und der Sensor muss dann ausgetauscht werden.

Die Sensortechnik basiert auf der Glukose-Oxidase-Methode, die einen elektrischen Strom proportional zur Glukosekonzentration erzeugt (GINSBERG, 2007), welcher durch das Messfilament an der Unterseite des Sensors erfasst wird und dann in die Glukosekonzentration in mmol/l bzw. mg/dl umgerechnet wird.

Das Handlesegerät kann auch als Glukometer verwendet werden. Die Teststreifen sind separat erhältlich. Bisher wurde diese Funktion am Tier noch nicht geprüft.

3.4 Sensorapplikation

In der Regel wurde an der dorsalen Thoraxwand hinter dem Schulterblatt eine ca. 5x5 cm große Hautstelle freirasiert und mit den mitgelieferten Desinfektionstüchern desinfiziert. Abweichend davon erhielt ein Hund einen Sensor zwischen den Schulterblättern und zwei Sensoren in der Kniefalte. Ein weiterer Hund erhielt ebenfalls einen Sensor zwischen den Schulterblättern.

Nach der Rasur und Desinfektion wurde die Sensoreinheit mit der mitgelieferten Applikationsvorrichtung aufgebracht und geklebt, wobei gleichzeitig eine Nadel in die Haut einstach und das Messfilament in die Haut leitete, wozu keine Sedierung erforderlich war (Abb. 3). Beim Abziehen der Applikationsvorrichtung bewährte sich

¹ Quelle: <https://www.freestylelibre.de/libre/discover/erste-schritte.html> (aufgerufen am 17.09.2020)

die Fixation der Sensoreinheit am Kleberand mittels Klemme. Nachdem bei den Katzen die ersten beiden Sensoren, die nicht zusätzlich fixiert wurden, frühzeitig verloren gingen, wurden die Sensoren sowohl bei der Katze als auch beim Hund mit acht Einzelheften am Kleberand zusätzlich fixiert (Abb. 4). Auch dieser Vorgang war ohne Lokalanästhesie oder Sedation möglich.



Abb. 3: Anbringen des Sensors des Glukose-Monitoring-Systems „FreeStyle Libre“ mit der Applikationsvorrichtung

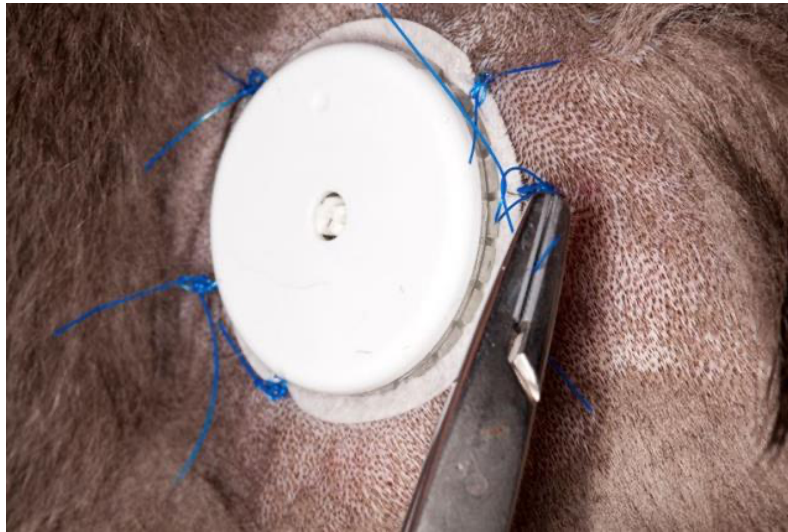


Abb. 4: Die zusätzliche Fixierung des Sensors mit Einzelheften war sowohl bei der Katze als auch beim Hund von Vorteil

Die Sensorablesung erfolgte gemäß Bedienungsanleitung mindestens alle acht Stunden, damit alle Daten verlustfrei auf das Handlesegerät übertragen werden konnten. Die abgelesenen Glukosewerte wurden zusätzlich protokolliert. Die Sensoren wurden bis zum selbstständigen Funktionsverlust belassen bzw. aus verschiedenen Gründen funktionierend vorzeitig entfernt.

Nach jeder Sensorentfernung wurde das Handlesegerät an den PC angeschlossen und die Daten mit der zugehörigen Herstellersoftware ausgelesen, damit diese optimal ausgewertet (detaillierte Tagesprotokolle, Tagesdurchschnittsverläufe, Wochen- und Monatsübersichten) und dauerhaft gespeichert werden konnten.

3.5 Referenzmethode Hexokinasereaktion

Nachdem die gewonnenen Blutproben innerhalb von 15 Minuten zentrifugiert und das Plasma in ein 1,5 ml-Kunststoffprobengefäß umgefüllt worden waren, wurden sie bis zur Serienmessung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zu Beginn der Kontrollmessung wurden die Proben im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und anschließend die Glukosekonzentration im Analysenautomaten Cobas c 311 mit der Hexokinase-Methode (KNUST et al., 1984) gemessen. Dazu wurde ein kommerzielles Testkit (Glucose HK Gen.3) benutzt und die Messung unter Verwendung eines humanen Universalstandardplasmas („Calibrator for automated systems“) kalibriert. Es erfolgten tägliche Qualitätskontrollen mit humanen Kontrollseren (Precinorm U, Precipath U; alle Reagenzien von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

3.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der bei den Katzen gesammelten Proben umfasste 359 Datenpaare und bei den Hunden 269 Datenpaare im Messbereich des „FreeStyle Libre“ ($2,2\text{--}27,8\text{ mmol/l}$ [$40\text{--}500\text{ mg/dl}$]). Hierfür wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt sowie eine Korrelationsanalyse nach Spearman. Zudem wurden aus den Differenzen der Messwerte des Glukose-Monitoring-Systems und der Referenzmethode der Median-, Minimum- und Maximumwert der relativen Abweichungen von der Referenzmethode berechnet.

Bei einer ergänzenden statistischen Auswertung von Subpopulationen wurden bei der Katze subnormale ($< 4,4\text{ mmol/l}$ [$< 80\text{ mg/dl}$], $n = 10$), normale ($4,4\text{--}6,7\text{ mmol/l}$ [$80\text{--}120\text{ mg/dl}$], $n = 12$) und hyperglykämische Werte ($> 6,7\text{ mmol/l}$ [$> 120\text{ mg/dl}$], $n = 337$) getrennt voneinander betrachtet. Aufgrund der geringen Probenanzahl im

niedrigen Glukosebereich wurden beim Hund hypo- und normoglykämische Werte zusammen ($\leq 6,7$ mmol/l [≤ 120 mg/dl], $n = 11$) und der hyperglykämische Bereich ($> 6,7$ mmol/l [> 120 mg/dl], $n = 258$) gesondert betrachtet.

Außerdem wurde eine Auswertung gemäß der Qualitätskriterien nach der ISO 15197:2013 ausgeführt. Hierzu erfolgte erstens ein „Differenz-Plot“ mit Darstellung der absoluten Abweichungen gegen die Werte der Referenzmethode und Ermittlung des Anteils der Differenzen, die die Grenzen der ISO 15197 überschritten. Zweitens wurde eine Parkes Error Grid Analyse durchgeführt mit Ermittlung des Anteils der Messergebnisse des „FreeStyle Libre“, die in den jeweiligen Zonen lagen. Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm Microsoft Excel 2016 (Redmond, USA).

4 Ergebnisse / Manuskripte

4.1 Manuskript 1: Praktische Anwendung des neuen Glukosemesssystems

„FreeStyle Libre“ bei der Katze

Das folgende Manuskript wurde im Journal „Der Praktische Tierarzt“ (Schlütersche Verlagsgesellschaft) am 30.04.2019 zur Publikation angenommen und im Heft 06/2019 publiziert (DOI 10.2376/0032-681X-18-48)

Klinik für Kleintiere, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover

Praktische Anwendung des neuen Glukosemesssystems „Freestyle Libre“ bei der Katze

Verena Deiting, Reinhard Mischke

Korrespondenzadresse: Reinhard.Mischke@tiho-hannover.de

Zusammenfassung Die kontinuierliche Glukosemessung bietet ein wertvolles Tool zur Überwachung hypo- oder hyperglykämischer Patienten. Ziele der Studie waren, das neue Glukosemesssystem „Freestyle Libre“ auf die Richtigkeit der Messung und die Akzeptanz und Verträglichkeit bei der Katze zu prüfen. Es werden die Ergebnisse von zehn Katzen mit Diabetes mellitus, die aus medizinischer Indikation mit dem neuen Glukosemessgerät überwacht wurden, präsentiert. Insgesamt wurden 14 Sensoren appliziert (vier Tiere erhielten einen zweiten Sensor nach dem vorzeitigen Verlust des

ersten Sensors). Es wurde das Tierverhalten bei der Applikation, dem Tragen und der Entfernung sowie die Haut an der Klebestelle nach Entfernung des Sensors beurteilt. Zusätzlich wurden Katzen mehrmals täglich Blutproben für Vergleichsmessungen mittels Hexokinase-Methode entnommen.

Die Tiere zeigten bei der Applikation keine deutliche Abwehrreaktion, d. h. maximal ein Wenden des Kopfes, obwohl der Sensor nach den ersten beiden Patienten mit zusätzlichen Einzelheften fixiert wurde. Die Messdauer des Sensors erreichte nur in einem Fall die vom Hersteller für den Menschen angegebenen 14 Tage. Im Median mussten die Sensoren nach 5,6 (1,7–14) Tagen entfernt und ggf. durch einen neuen ersetzt werden. Die Entfernung des Sensors erfolgte ohne Schwierigkeiten. Hautreaktionen an den Klebestellen traten nach Entfernung von 6/14 Sensoren in Form einer leichten Hautrötung auf. Durch die obere Messbereichsgrenze von 500 mg/dl (27,8 mmol/l) wurde bei allen zehn Katzen zu einzelnen Messzeitpunkten und bei vier Tieren über längere Zeit vom Ablesegerät nur „HI“ angezeigt, sodass zusätzliche Referenzmessungen erfolgten. Es bestand eine hohe Korrelation der Werte zur Referenzmethode ($r_s = 0,89$). Die geringe Zahl subnormaler Werte limitiert die Bewertung der Messgenauigkeit in diesem Bereich. Die neue Messmethode erwies sich als praktikabel, wenig belastend für das Tier und mit hoher Korrelation zur Referenzmethode. Obgleich die obere Messbereichsgrenze etwas limitiert, verspricht das System, das Management von Katzen mit Diabetes mellitus deutlich zu erleichtern und gegebenenfalls zu verbessern.

Schlüsselwörter Glukosemonitoring, Flash Glucose Monitoring System, Sensor, Feline, Diabetes mellitus, Hyperglykämie, Hypoglykämie

Practical application of the novel glucose monitoring system „Freestyle Libre“ in cats

Summary Continuous blood glucose monitoring is a valuable diagnostic tool for the monitoring of hypo- or hyperglycemic patients. Aims of this study were to assess the new glucose monitoring system „Freestyle Libre“ regarding its measurement accuracy, acceptance and tolerability in cats. The results of 10 diabetic cats monitored by the new measuring device due to medical indication, are presented. In total 14 sensors were applied (4 animals received a second sensor after premature loss of the first sensor). The animal behaviour during the application, wearing and removing of the sensor as well as the skin at the site of application were assessed. In addition, blood samples were collected several times throughout the day for comparative measurements using the hexokinase method.

Minimal signs of discomfort were noted i. e. showed a maximum of turning their head, although the sensor was additionally fixed using individual skin stitches after the first two patients. Only in one case the measurement period of the sensor reached 14 days as specified by the manufacturer. Sensors had to be removed or replaced after a median time of 5.6 (1.7–14) days. Removal of the sensors took place without difficulties. Skin reactions at the site of application occurred after removal of 6/14 sensors in the form of mild erythema. Due to the upper limit of the measurement range of 500 mg/dl (27.8 mmol/l), the reading device displayed “hi” in all 10 cats at individual time points and in 4 cats for long periods, which required measurements with the reference method. There was a high correlation of the measurement values to the

reference method ($r_s = 0.89$). The low number of subnormal values limits assessment of the measurement accuracy in this measuring range. In conclusion, the new method proved to be practicable, less stressful for the animal and with high correlation to the reference method. Although the upper limit of the measurement range is a limiting factor, the device promises to significantly facilitate and possibly improve the management of cats suffering from diabetes mellitus.

Key words Glucose monitoring, flash glucose monitoring system, sensor, feline, diabetes mellitus, hyperglycemia, hypoglycemia

Einleitung

Diabetes mellitus ist eine häufig vorkommende Erkrankung bei der Katze mit einer Auftretenswahrscheinlichkeit von 1:100 bis 1:400 (Reusch et al 2006). Die engmaschige Überwachung der Blutglukose stellt ein wichtiges Mittel beim Management dieser Patienten dar (Rand und Gottlieb 2017).

Die klassische Überwachung der Blutglukose erfolgt, besonders beim Homemonitoring, mittels Glukometer (Reusch et al 2006), in Kliniken auch durch mehrfach tägliche Entnahme venösen Blutes und der Messung der Blutglukose mittels Hexokinase-Methode (Knust et al 1984). Obwohl eine einzelne Blutentnahme mit nur einer geringen Belastung verbunden ist, können klassische Tagesprofile (z. B. zur Einstellung der Insulintherapie mit zweistündigen Entnahmeintervallen) insgesamt eine Belastung für den Patienten darstellen und bei venöser Entnahme ggf. auch die

Venenwand schädigen. Hinzukommt, dass dies i. d. R. an einen recht hohen personellen Aufwand und ggf. stationären Klinikaufenthalt gebunden ist. Letzteres birgt zusätzlich den Nachteil einer Stresssituation für den Patienten, die wiederum die Blutzuckerwerte beeinflussen kann (Nibblett et al 2015).

Eine kontinuierliche Messung der Glukose im Interstitium über auf der Haut angebrachte Messsensoreinheiten, sogenannter "kontinuierlicher Glukosemonitoring-Systeme", ist ein wertvolles modernes Tool, da die Zahl der Blutentnahmen deutlich reduziert wird oder diese völlig entfallen. Somit könnte das Management von diabetischen Tieren und Tieren mit Hypoglykämie (z. B. Insulinom) erheblich erleichtert werden.

Es erfolgten bei Hund und Katze hierzu bislang einige Untersuchungen v. a. mit dem kontinuierlichen Glukosemonitoringsystem „Guardian Real-Time“ (Firma Medtronic), das recht zuverlässig misst (Hafner et al 2013, Moretti et al 2010), aber verschiedene Nachteile besitzt, u. a. erfordert es eine initiale Eichung und dann regelmäßige Kalibrationen mit der Kapillarblutmethode, sodass auch die ersten Messwerte frühestens nach 2 Stunden vorliegen. Weiterhin besitzen die Sensoren eine begrenzte Haltbarkeit (Herstellerangabe für den Menschen aktuell sechs Tage, früher drei Tage) und es ist ein Maximalabstand (aktuell 6 m, früher deutlich geringer) zwischen Empfangseinheit und der Sensor-/Transmitter-Einheit am Tier einzuhalten. Das neue Messsystem "Freestyle Libre" der Firma Abbott umgeht diese Nachteile durch die Speicherung der Daten für bis zu acht Stunden direkt in der sich selbst kalibrierenden Sensoreinheit, die laut Hersteller eine Lebensdauer von 14 Tagen besitzt, und von der sie auf ein portables Ablesegerät übertragen werden. Das Gerät bietet damit grundsätzlich optimale Voraussetzungen, sowohl für die Überwachung

von Intensivpatienten als auch für eine Anwendung zu Hause durch den Tierhalter, was z. B. eine ressourcen- und somit kostenärmere sowie stressfreie Einstellung der Insulintherapie bei diabetischen Katzen ermöglichen würde. Nach einer firmeninternen Umfrage des Herstellers empfinden 80 % der menschlichen Anwender die Messung mittels „Freestyle Libre“ deutlich weniger schmerzhaft als mit den üblichen Messmethoden¹. In einer Studie beim Menschen wird eine Korrelation der Messwerte des „Freestyle Libre“-Gerätes zu den Messergebnissen im venösen Blut (gemessen mit dem „YSI-Analyzer“ [Enzymsensortechnologie]) von $r_s = 0,96$ angeben (Bailey et al 2015).

Erste Untersuchungen an diabetischen Hunden in Italien zeigten ermutigende Ergebnisse. Die Applikation des Sensors verlief ohne erkennbare Schmerzreaktion und nach der Entfernung des Sensors blieb bei 5/10 Patienten lediglich eine vorübergehende Hautrötung zurück. Bei 70 % der caninen Patienten konnte der Sensor 14 Tage belassen werden, wie auch vom Hersteller für den Menschen angegeben. Die Korrelation zur Referenzmessung war sehr hoch ($r = 0,94$) (Corradini et al 2016).

Motiviert durch die positiven Ergebnisse in dieser Pilotstudie beim Hund wird nun das Monitoringsystem „Freestyle Libre“ bei der Katze getestet, um Angaben zur Verlässlichkeit der Messung im Vergleich zu den Ergebnissen der Hexokinase-Referenzmethode zu erhalten und verlässliche Angaben zur Tolerierbarkeit durch die Patienten und die Praktikabilität der Anwendung zu erhalten. In diesem Artikel soll über

¹ www.freestylelibre.de

die Erfahrungen basierend auf den ersten zehn feline Patienten mit 14 Sensoren berichtet werden.

Material und Methoden

Studiendesign

Die Studie wird an Katzen, bei denen aus medizinischer Sicht eine kontinuierliche Glukoseüberwachung indiziert ist, durchgeführt. Der Sensor wird i. d. R. noch am selben Tag der stationären Aufnahme angebracht.

Neben der Beurteilung des Tierverhaltens beim Anbringen und Entfernen des Sensors werden die Tiere täglich allgemein untersucht und die Akzeptanz des Sensorablesens beobachtet. Für Vergleichsmessungen mittels Hexokinase-Methode werden dem Tier zu Beginn des Glukosemonitorings mindestens viermal täglich (im späteren Therapieverlauf bei stabileren Werten ggf. in einer reduzierten Anzahl) jeweils maximal 0,5 ml Heparinblut mittels Venenpunktion (bei Vorhandensein eines Zentralvenenkatheters ggf. aus diesem) entnommen. Die Zeitpunkte richten sich nach der Art und Applikationsroute des Insulins und den individuellen Verläufen der Blutglukosewerte. Bei zweimal täglicher subkutaner Insulininjektion erfolgen Blutprobenentnahmen vor der jeweiligen Insulininjektion und meistens zusätzlich um den Zeitpunkt, an dem der Sensor die niedrigsten Werte anzeigt (Nadir). Während Altinsulin-Infusionen erfolgen diese in regelmäßigen Abständen von z. B. sechs Stunden. Zur selben Zeit wird der Sensor ausgelesen und der Glukosewert auf dem Überwachungsprotokoll des Patienten notiert. Zudem erfolgt unmittelbar nach

Sensorentfernung die Untersuchung der Haut auf Veränderungen. Dies schloss auch zwei euthanasierte Tiere ein, bei denen der Sensor direkt nach der Euthanasie entfernt wurde.

Alle Untersuchungen und Behandlungen werden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes nach Prüfung des Tierversuchsantrages durch den Tierschutzbeauftragten und Erteilung der Genehmigung durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) (Aktenzeichen 17A 172) durchgeführt. Zudem wird jeweils vor Anbringung der Sensoren die Erlaubnis des Besitzers eingeholt.

Tiere

Die Studie wird an Katzen (*Felis silvestris catus*) aus dem Patientengut der Klinik für Kleintiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt. Bedingung zur Teilnahme an der Studie ist eine Glukoseimbalance in Form einer Hyper- oder Hypoglykämie. Alle zehn Tiere wiesen einen Diabetes mellitus auf, ggf. assoziiert mit Pankreatitis (sonografisch auffällig bei sieben Tieren) und/oder hepatischer Lipidose. Sieben Tiere befanden sich initial in einer Ketoazidose. Die Studienpatienten umfassten sieben Europäisch Kurzhaarkatzen, zwei Maine Coon und eine Norwegische Waldkatze. Davon waren fünf Tiere männlich-kastriert und fünf weiblich-kastriert mit einem medianen Alter von 11,1 Jahren (9,5–14,1 Jahre; Minimum–Maximum) und einem medianen Gewicht von 4,4 kg (3,0–8,2 kg).

Gerätebeschreibung des „Freestyle Libre“

Das kontinuierliche Glukosemonitoringsystem „Freestyle Libre“ besteht aus einem Sensor (Sensoreinheit mit Nadel) und einem Handlesegerät (Abb. 1). Die Sensoreinheit ist ca. 3,5 cm groß im Durchmesser und ca. 0,5 cm hoch. An der mit klebender Substanz beschichteten Unterseite befindet sich eine hauchdünne Nadel (Abb. 2).

Das Handlesegerät misst in einem Abstand von 1–4 cm vom Sensor, sodass ein direkter Tierkontakt nicht mehr nötig ist. Auf dem Touchdisplay des Handlesegeräts werden Verlaufskurven angezeigt sowie die Tendenz des Glukosewertverlaufs. Der Sensor speichert die Werte bis zu acht Stunden. Das Handlesegerät kann an den PC angeschlossen werden, um weitere Diagramme u. ä. erstellen zu können. Der Sensor hat einen Messbereich von 40–500 mg/dl (2,2–27,8 mmol/l) und kann (laut Herstellerangaben für den Menschen) bis zu 14 Tage belassen werden und muss dann ausgetauscht werden.

Applikation und Handhabung des Sensors

1. An der dorsalen Thoraxwand hinter dem Schulterblatt (bei gut genährten Tieren auch zwischen den Schulterblättern) wird eine ca. 5x5 cm große Hautstelle freirasiert und mit den mitgelieferten Desinfektionstüchern desinfiziert.
2. Dann wird die Sensoreinheit mit der mitgelieferten Applikationsvorrichtung auf die vorher rasierte und desinfizierte Hautstelle aufgebracht und geklebt, wobei gleichzeitig die Nadel in die Haut einsticht, wozu keine Sedierung erforderlich ist (Abb. 3). Beim Abziehen der Applikationseinheit hat sich die Fixation der Sensoreinheit am Kleberand mittels Klemme bewährt.

3. Nachdem sich die ersten zwei applizierten Sensoren nach wenigen Tagen spontan abgelöst hatten, erfolgt nun im weiteren Studienverlauf eine zusätzliche Fixierung des Sensors mit acht Einzelheften (Abb. 4).
4. Nach einer Autokalibrierungsphase von einer Stunde ist der Sensor einsatzbereit und kann beliebig oft mit dem Handlesegerät ausgelesen werden (Abb. 5).
5. Der Sensor wird spätestens alle acht Stunden ausgelesen, um die gespeicherten Messergebnisse auf das Handlesegerät zu übertragen.
6. Je nach Aufenthaltsdauer in der Klinik kann der Sensor, nach Herstellerangabe für den Menschen, bis zu zwei Wochen belassen werden.
7. Nach spätestens drei Monaten sollte das Handlesegerät durch die zugehörige Software am PC ausgelesen werden. Die mitgelieferte Software ermöglicht das Erstellen von Tagesprotokollen, Tagesdurchschnittsverläufen, Tagesmustern und Glukosemustern.

Glukose-Referenzmethode

Die gewonnenen Blutproben werden innerhalb von maximal 15 Minuten zentrifugiert und das Plasma in ein unbeschichtetes Kunststoffreaktionsgefäß überführt. Die so gewonnenen Proben werden bis zur Messung in Serie bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Unmittelbar vor der Messung werden die Proben im Wasserbad aufgetaut und die Glukosekonzentration im Analysenautomaten Cobas c 311 mit der Hexokinase-Methode (Knust et al 1984) mittels eines kommerziellen Testkits (Glucose HK Gen.3) unter Verwendung eines humanen Universalstandardplasmas („Calibrator for automated systems“) und täglicher Kontrollen mit humanen Kontrollseren (Precinorm

U, Precipath U; alle Reagenzien von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gemessen.

Statistische Auswertung

In die Auswertung flossen 126 Datenpaare im Messbereich des „Freestyle Libre“ (40–500 mg/dl) ein. Hierfür wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt sowie eine Korrelationsanalyse nach Spearman. Zudem wurde aus den Differenzen der Messwerte des Glukosemonitoringssystems und der Referenzmethode die mediane relative Abweichung von der Referenzmethode berechnet. Bei einer ergänzenden statistischen Auswertung von Subpopulationen wurden subnormale (< 80 mg/dl, $n = 3$) und normale Werte (80–120 mg/dl, $n = 6$) wegen der in beiden Fällen geringen Probenzahl zusammengefasst.

Ergebnisse

Die zehn Tiere zeigten bei der Applikation einschließlich ggf. des Annähens keine deutliche Abwehrreaktion, d. h. maximal ein Wenden des Kopfes (bei 7/14 Sensoren). Keine der Katzen zeigte nach der Sensoranbringung eine Veränderung des Allgemeinverhaltens (Abb. 6).

Die Messdauer des Sensors erreichte nur bei einem von 14 Sensoren die vom Hersteller für den Menschen angegebenen 14 Tage; die minimale Messdauer betrug 1,7 Tage. Im Median arbeitete der Sensor 5,6 Tage und musste ggf. durch einen neuen Sensor ersetzt werden. Hierbei unberücksichtigt blieben zwei von zehn Tieren, die mit

einem funktionierenden Sensor euthanasiert wurden (jeweils zwei Tage nach Anbringen des Sensors). Die Entfernung des Sensors – durch einfaches Abziehen nach Lösen der Hauthefte – erfolgte problemlos. Hautreaktionen an den Klebestellen zeigten sich in Form einer leichten, transienten Hautrötung bei 6/14 Sensoren (davon 1/2 nicht mit Heften fixiert) (Abb. 7). Sensoren, die mehrere Tage lagen, schienen durch das nachwachsende Haarkleid keine intakte Klebeverbindung zur Haut zu besitzen und wurden vor allem durch die Fixationshefte in Position gehalten.

Bei allen zehn Tieren lagen initial Glukosewerte von > 500 mg/dl (503–919 mg/dl; Median=596 mg/dl, $n=11$ Werte) vor, die vom Lesegerät undifferenziert mit „HI“ angezeigt werden. Somit mussten in den ersten Tagen teilweise zusätzlich Blutproben entnommen werden, um einen genauen Glukosewert mittels Hexokinase-Methode ermitteln zu können. Bei keiner Probe lag der Messwert unterhalb des Messbereichs (< 40 mg/dl).

Die Auswertung der gewonnenen Daten mittels der kostenlosen Herstellersoftware erwies sich als einfach und die Darstellungen boten einen guten Überblick über den Glukoseverlauf des jeweiligen Tieres. Nachteilig erwies sich die Zensur der grafischen Darstellung bereits unterhalb der Messgrenze bei Messwerten von über 350 mg/dl (Abb. 8).

Eine der zehn Katzen wurde mit einem funktionierenden Sensor und dem Lesegerät zum weiteren Glukosemonitoring nach Hause entlassen. Die Besitzer empfanden das Ablesen als einfach und die aktuelle Kenntnis des Glukosewertes vermittelte ihnen ein sicheres Gefühl. Auch im gewohnten Umfeld zeigte die Katze keine sensorbedingte Einschränkung des Allgemeinverhaltens. Der funktionierende Sensor wurde nach einem viertägigen Heimmonitoring entfernt.

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) für die Beziehung zwischen den Glukosewerten der Referenzmethode und denjenigen mit dem Glukosemonitoringsystem gemessenen Werte betrug 0,89 ($p < 0,0001$), wobei sich im hypo- und normoglykämischen Bereich (≤ 120 mg/dl; $r_s = 0,90$, $n = 9$) ähnliche Werte wie im hyperglykämischen Bereich (> 120 mg/dl; $r_s = 0,82$, $n = 117$) ergaben (Abb. 9). Der mediane Betrag der relativen Abweichung von der Referenzmethode wurde für die Gesamtzahl der Proben mit 9,7 % berechnet (≤ 120 mg/dl: 10,1 %; > 120 mg/dl: 9,6 %).

Diskussion

Unerwartet und erfreulicherweise zeigte keine der Katzen bei der Applikation des Sensors eine deutliche Abwehrreaktion, ein sehr positiver Aspekt für die klinische Anwendung. Zwar deckt sich dies mit Beobachtungen in der caninen Studie (Corradini et al 2016), wo ebenfalls über eine problemlose Applikation des Sensors berichtet wurde, aber dies war nicht ohne Weiteres auf die Katze zu übertragen, zumal in der vorliegenden Studie eine zusätzliche Fixierung mit einigen Einzelheften erfolgte. Eine entsprechende zusätzliche Fixierung ist nach unserer Erfahrung für die Katze dringend anzuraten. Im Hinblick auf gute Tolerierung wurde eine Lokalanästhesie erst einmal nicht als notwendig erachtet, zumal z. B. ein Kältespray oder der Auftrag eines Lokalanästhetikum enthaltenden Gels sicherlich abträglich für die Klebeverbindung sind und auch mögliche Einflüsse auf die Messung des Sensors nicht geprüft sind. Dies könnte aber in weiterführenden Untersuchungen noch einmal systematisch

geprüft werden. In der caninen Studie (Corradini et al 2016) wurde die zusätzliche Fixierung des Sensors, die dort im Nackenbereich erfolgte, mittels einer Klebefolie über dem Sensor und eines zusätzlichen Halsverbandes beschrieben. Für die Anwendung beim Menschen werden von Fremdfirmen zudem Kleberinge angeboten, durch die der Sensor gesteckt wird und die die Klebefläche vergrößern. Diese zusätzlichen klebenden Fixationsmethoden wurden für uns als nicht optimal bzw. praktikabel angesehen, einerseits wegen der Schwierigkeiten der Anbringung an der abweichend gewählten Lokalisation zwischen den Schulterblättern oder hoch thorakal. Den Nacken sahen wir aufgrund des dort bei stationären Patienten angebrachten Halskragens als wenig geeignet an. Zudem musste hierbei das bei Katzen rasche Nachwachsen der rasierten Haare bedacht werden, das nach einigen Tagen nicht nur die Klebeverbindung zwischen Sensor und Haut gelöst, sondern sicherlich auch zum Funktionsverlust der angeführten Klebefolien und –ringe geführt hätte. Verbände und Bandagen bergen die Gefahr von Verrutschen und schränken deutlich die Bewegungsaktivität der Tiere ein. Die gute Akzeptanz des angebrachten Sensors bei den Katzen entspricht ebenfalls derjenigen des Hundes. Wie beim Hund beschrieben (Corradini et al 2016), zeigten die mit Sensor versehenen Tiere in unserer Studie keine Einschränkungen im Allgemeinverhalten.

Die vom Hersteller spezifizierte maximale Messdauer des Sensors von 14 Tagen wurde in der Pilotstudie beim Hund bei 7/10 Sensoren erreicht (Corradini et al 2016). In der vorliegenden Arbeit deutet sich unter der Einschränkung der geringen Stichprobengröße eine etwas geringe „Sensorlebenslänge“ bei der Katze an, trotz der bereits angeführten zusätzlichen Fixierung mittels Einzelheften.

Für die verkürzte Lebenserwartung des Sensors bei der Katze könnten die unterschiedliche Hautdicke und -elastizität und das unterschiedliche Verhalten und die unterschiedliche Handhabung der Tiere mitverantwortlich sein. Die Katzenhaut ist dünner als diejenige von Hunden (Scott 1980), aber auch deutlich elastischer und weniger gut mit den darunterliegenden Strukturen verbunden, sodass sich die Haut viel mehr verschieben lässt und die Sensorelektrode deutlich höheren Scherkräften ausgesetzt ist als z. B. beim Menschen oder dem Hund. Zudem könnte eine Rolle spielen, dass die Katzen im Klinikalltag zu Reinigungsarbeiten im Käfig und Behandlungen vermutlich deutlich öfter an- und hochgehoben und damit stärker manipuliert werden als die Hunde, wodurch der Sensor größeren mechanischen Einflüssen ausgesetzt ist. Bei klinischer Besserung kann zudem, insbesondere bei der Anwendung zu Hause, das Sprungverhalten der Spezies die Sensorfixierung vor zusätzliche Herausforderungen stellen.

Die im Vergleich zu den Herstellerangaben für den Menschen insgesamt auf unter die Hälfte reduzierte „Sensorlebenslänge“ bei der Katze muss im objektiven Beratungsgespräch mit dem Tierhalter berücksichtigt werden. Trotzdem liefert das System auch bei einer verkürzten Laufzeit von durchschnittlich knapp einer Woche eine wertvolle Hilfestellung. Die gute Resonanz eines Tierbesitzers beim Heimmonitoring deutet auch neue Möglichkeiten bei der ambulanten Insulineinstellung an, was es durch weitere Untersuchungen zu bestätigen gilt. Hierbei sollte wegen des teilweise recht plötzlichen Funktionsversagens der Sensoren bei der Anwendung zu Hause zusätzlich zum Sensor ein weiteres Blutzuckermessgerät (z. B. Glukometer) vorhanden sein, um in diesem Fall die Zeit bis zum eventuellen Setzen eines neuen Sensors überbrücken zu können.

Die Sensoreinheit und ihr entsprechendes Klebefeld besitzen eine gute lokale Hautverträglichkeit, da nach Entfernung nur bei sechs von 14 Sensoren eine kurzzeitige leichte Hautrötung zurückblieb. Bei zwei der zehn Katzen wurde der Sensor jedoch erst nach der Euthanasie entfernt und, obwohl die Hautstellen sofort begutachtet wurden, sind mögliche Hautreaktionen unter diesen Bedingungen ggf. weniger stark ausgeprägt und somit schlechter detektierbar.

Die obere Messgrenze von maximal 500 mg/dl (27,8 mmol/l) erschwert das intensivmedizinische Management von extrem hyperglykämischen Katzen, was besonders in der Initialphase und/oder hyperglykämischen Krisen, oft assoziiert mit Ketoazidose, eine Rolle spielt. In diesem Messbereich kann auf Blutentnahmen und Messungen mittels Hexokinase-Methode oder auf die Messung von Kapillarblut mit Glukometer mit größerem Messbereich (z. B. AlphaTrak [Kang et al 2016]), nicht verzichtet werden. In zukünftigen Studien könnte es lohnend sein, den Methodenvergleich um die Glukometer-Methode zu erweitern.

In unserer Pilotstudie waren die Korrelation zwischen den Messwerten des „Freestyle Libre“ und der Hexokinase-Methode mit einem $r_s = 0,89$, wie auch die relative Abweichung (Medianwert 9,7 %), überraschend gut. Dies gilt umso mehr, wenn man sich das divergierende Messmedium (Blutplasma versus Interstitium) vergegenwärtigt. Hierbei ist zudem eine gewisse Variabilität der Referenzmessung durch methodische Faktoren (u. a. uneinheitliche Entnahmelokalisation und Probenvolumina) zu berücksichtigen. Zu einem ähnlichen Wert ($r_s = 0,94$) kam die canine Studie (Corradini et al 2016) unter Verwendung eines größeren Stichprobenumfangs ($n = 432$). Hierdurch deutet sich eine adäquate Verlässlichkeit der Einzelmessung an, wobei – bei Berücksichtigung obiger Einschränkungen – die

jederzeit möglichen Wiederholungen der Ablesung und die kontinuierliche Aufzeichnung die Sicherheit für die Anwendung zusätzlich erhöhen.

In Verbindung mit der guten Verträglichkeit und Akzeptanz erscheint das neue Blutglukosemonitoring-System daher als vielversprechend für die klinische Anwendung bei der Katze. Allerdings muss als wichtigste Einschränkung der vorliegenden Studie hervorgehoben werden, dass nur 3 subnormale Proben eingeschlossen waren. Daher kann streng genommen noch keine belastbare Aussage zur Messgenauigkeit in diesem klinisch wichtigen Bereich getroffen werden, eine lohnende Zielsetzung für weitere Studien.

Fazit für die Praxis

Zusammenfassend erwies sich das Glukosemonitoringsystem „Freestyle Libre“ bei der Katze als praktikabel, deutlich stressfreier als die Blutentnahme selbst für Kapillarblut und mit guter Korrelation der Ergebnisse zur Referenzmethode. Das Gerät verspricht, das Management von Katzen mit Diabetes mellitus in der Klinik und eventuell auch das Homemonitoring deutlich zu erleichtern und ggf. zu verbessern. Nachteilig ist aber die obere Mess- und Darstellungsbereichsgrenze.

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

Bailey T, Bode BW, Christiansen MP, Klaff LJ, Alva S (2015): The performance and usability of a factory-calibrated flash glucose monitoring system. *Diabetes Technol Ther* 17: 787–794.

Corradini S, Pilosio B, Dondi F, Linari G, Testa S, Brugnoli F, Gianella P, Pietra M, Fracassi F (2016): Accuracy of a flash glucose monitoring system in diabetic dogs. *J Vet Intern Med* 30: 983–988.

Hafner M, Lutz TA, Reusch CE, Zini E (2013): Evaluation of sensor sites for continuous glucose monitoring in cats with diabetes mellitus. *J Feline Med Surg* 15: 117-123.

Kang M-H, Kim D-H, Jeong I-S, Choi G-C, Park H-M (2016): Evaluation of four portable blood glucose meters in diabetic and non-diabetic dogs and cats. *Vet Q* 36: 2–9.

Knust A, Draeger B, Ziegenhorn J (1984): Metabolites 1: Carbohydrates. In: Bergmeyer HU (Hrsg.), *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. Volume VI. Verlag Chemie, Weinheim, 163–172.

Moretti S, Tschuor F, Osto M, Franchini M, Wichert B, Ackermann M, Lutz TA, Reusch CE, Zini E (2010): Evaluation of a novel real-time continuous glucose-monitoring system for use in cats. *J Vet Intern Med* 24: 120–126.

Nibblett, BM, Ketzis JK, Grigg EK (2015): Comparison of stress exhibited by cats examined in a clinic versus a home setting, *Appl Anim Behav Sci* 173: 68–75.

Rand J, Gottlieb SA (2017): Feline diabetes mellitus. In: Ettinger SJ, Feldman E, Côté E (Hrsg.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Elsevier, St. Louis, 1781–1795.

Reusch CE, Tschuor F, Kley S, Boretti F, Sieber-Ruckstuhl N (2006): Diabetes bei der Katze: Ein Überblick. *Schweiz Arch Tierheilk* 148: 130–138.

Scott DW (1980): Feline dermatology 1900–1978: A monograph. *J Am Anim Hosp Assoc* 16: 331–459.

Abbildungen und Legenden



Abb. 1: „Starterpaket“ des Glukosemonitoring-Systems „Freestyle Libre“ bestehend aus Sensor mit Applikationsvorrichtung, Handlesegerät, USB-Kabel und Ladegerät für die Steckdose (Foto: Abbott Laboratories, mit freundlicher Genehmigung)



Abb. 2: Sensor in der Frontal- und Seitenansicht (Fotos: Abbott Laboratories, mit freundlicher Genehmigung)



Abb. 3: Anbringen des Sensors des Glukosemonitoring-Systems „Freestyle Libre“ mit der Applikationsvorrichtung



Abb. 4: Die zusätzliche Fixierung des Sensors mit Einzelheften ist bei Katzen von Vorteil

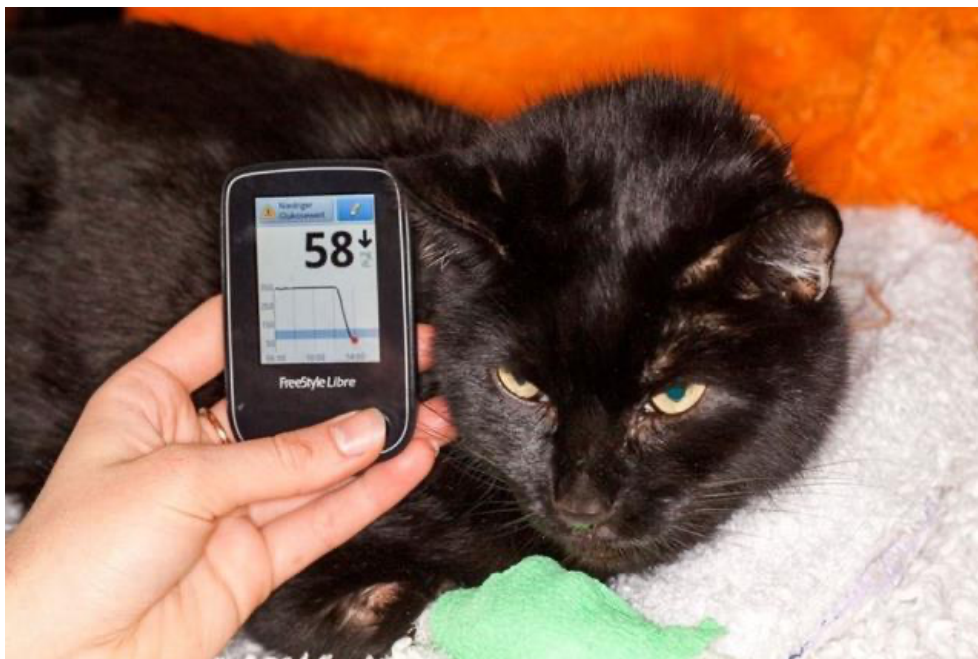


Abb. 5: Einfaches Ablesen des aktuellen Blutglukosewertes vom Sensor mit dem Lesegerät



Abb. 6: Der Sensor beeinflusst nicht das Allgemeinverhalten der Katzen



Abb. 7: Bei 6/14 Sensoren blieb nach der Sensorentfernung eine leichte Hautrötung zurück, wie auf dem Foto zu erkennen

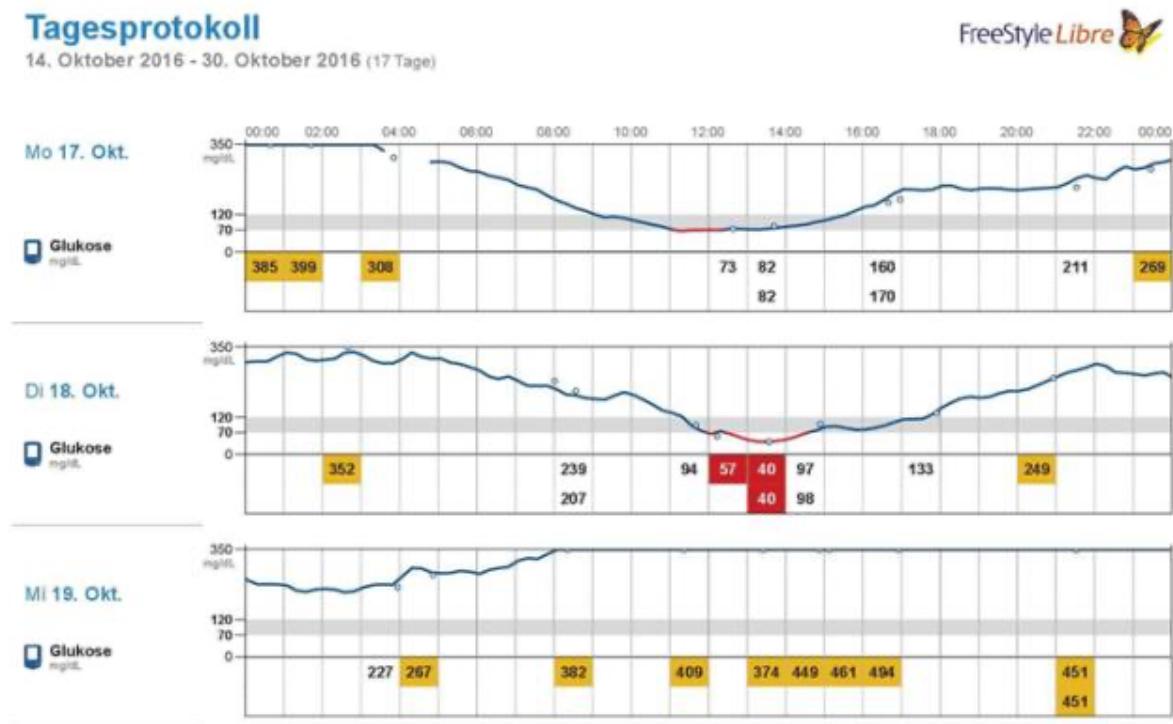


Abb. 8: Mit der Herstellersoftware des „Freestyle Libre“ erstelltes Glukoseprofil einer diabetischen Katze im Therapieverlauf. Eine Einschränkung bedeutet die grafische Zensur der Werte bei 350 mg/dl. In den gelben Boxen werden Werte angezeigt zu Zeitpunkten, an denen mit dem Lesegerät der Wert gescannt wurde. Rot unterlegt werden von der Software automatisch hypoglykämische Werte

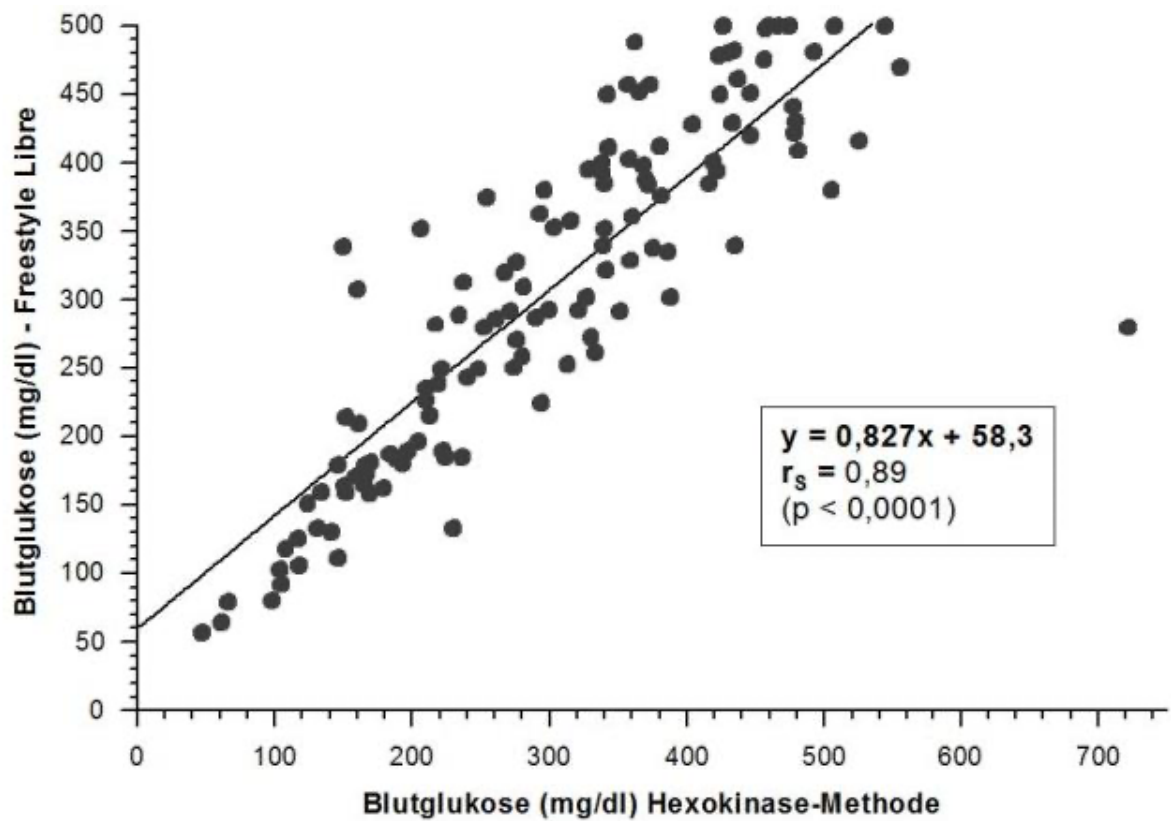


Abb. 9: Grafische Darstellung der linearen Regression und Korrelation (Korrelationskoeffizient nach Pearson) zwischen der Referenzmethode zur Messung der Blutglukose (Hexokinase-Methode) und den Ergebnissen des Monitoringsystems „Freestyle Libre“ bei diabetischen Katzen (126 Parallelmessungen)

4.2 Manuskript 2: Use of the “FreeStyle Libre“ glucose monitoring system in diabetic cats.

Das folgende Manuskript wurde beim Onlinejournal „Research in Veterinary Science“ (Elsevier) am 18.09.2020 publiziert (DOI 10.1016/j.rvsc.2020.09.015)

Use of the “FreeStyle Libre“ glucose monitoring system in diabetic cats.

Verena Deiting, Reinhard Mischke*

Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, D-30559, Hannover, Germany.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the “FreeStyle Libre“ flash glucose monitoring system regarding its measurement accuracy and tolerability in cats. Results from 66 sensors applied to 34 predominantly diabetic cats are included. The behaviour during the attachment, wearing, and removal of the sensor and the skin site of attachment were assessed. Blood samples were regularly collected for comparative measurements (hexokinase method). Minimal signs of discomfort were noted, although the sensor was additionally fixed using individual skin stitches. Sensors, which stopped working in situ (70% (46/66)), had a median functional life of 8.3 (1.6–14) days. Skin reactions on the adhesive surface occurred after removal of 39% (23) of 59 sensors with assessable skin reaction (mild erythema: n = 21; superficial dermatitis: n = 2). Due to the upper limit of the measurement range of 27.8 mmol/l (500

mg/dl), the reading device displayed “Hi” in 62% (17/34) of cats repeatedly and/or for periods > 1 h. Results were highly correlated with those of the reference method ($r_s = 0.90$, $n = 359$). 67.7% (243/359) of the “FreeStyle Libre” measurement values had a maximum deviation of 15% from reference measurements and 99.4% (357/359) were within the zones A and B of Parkes Consensus error grid analysis. In conclusion, the device proved to be practicable, less stressful for the animals and generated in general acceptable results. Although the upper limit of the measurement range is a limiting factor, the device promises to significantly facilitate the management of diabetic cats.

Keywords: Glucose monitoring, flash glucose monitoring system; sensor; feline; hyperglycemia; hypoglycemia

1. Introduction

Diabetes mellitus frequently occurs in cats with a prevalence of 1:200 of the cats attending primary-care veterinary practices (O'Neill et al., 2016). Apart from clinical signs, tight control of blood glucose within a narrow range is important for management of these patients, especially in the initial phase of insulin dose adjustment (Gottlieb and Rand, 2018).

Continuous glucose monitoring systems, such as those measuring interstitial glucose concentration using measurement sensors affixed to the skin, can help reduce the number of blood collections and/or even completely eliminate them. Therefore, the management of diabetic pets and patients with hypoglycaemia (e.g. due to insulinoma)

can be substantially facilitated with these valuable modern diagnostic tools (Gottlieb and Rand, 2018).

Several studies have been performed with the “Guardian Real-Time” (Medtronic, Dublin, Ireland) continuous glucose monitoring system, in cats and dogs. Although this particular system can produce quite reliable measurements (Moretti et al., 2010; Hafner et al., 2013), it does have several disadvantages. For example, the system requires an initial calibration with parallel blood glucose measurements, so initial measurement values are only available at the earliest after 2 hours. In addition, sensors have a limited durability (according to the manufacturer's information: actually 6 days, previously 3 days) and a maximum distance range has to be maintained between the receiver and the sensor/transmitter unit attached to the animal (currently 6 m, previously substantially less).

Alternatively, the relatively novel “FreeStyle Libre” (Abbott Laboratories, Chicago, USA) measurement system, manufactured for use in humans like the “Guardian Real-Time”, avoids some of the aforementioned disadvantages by saving 8 h worth of data directly within the sensor unit from which they can be readily transferred to a portable readout unit. The sensor unit automatically calibrates itself and has a functional life of 14 days according to the manufacturer's specifications. This device provides optimal conditions for the monitoring of intensive care patients, as well as for home monitoring by the pet owner and could, thereby, enable a resource-poor, low-cost, and low-stress adjustment of insulin treatment in diabetic cats.

According to a survey of the instrument manufacturer 80% of human users' experience with the “FreeStyle Libre” was distinctly less painful than conventional

monitoring.² In a human study, measurements were found to be accurate compared with capillary blood glucose results measured by glucometer or venous blood using the “YSI-analyser“, which is based on enzyme sensor technology (Bailey et al., 2015). The accuracy of the “FreeStyle Libre” results when compared to capillary blood gas reference measurements was demonstrated by the fact that 86.7% of the sensor results were within the Consensus Error Grid Zone A. The consensus error grid was developed as a new tool for evaluating the accuracy of blood glucose meters (Parkes et al., 2000) and is further specified in the guidelines for ISO 15197 for evaluation of blood glucose monitoring systems (Pfützner et al., 2013). In addition, a very strong positive correlation ($r = 0.96$) was observed between “FreeStyle Libre“ device measurement values and the capillary blood results with a mean relative difference of 11.4% (Bailey et al., 2015).

A preliminary study with the “FreeStyle Libre” in diabetic dogs in Italy by Corradini et al. (2016) revealed very encouraging results. First, installation of the sensors proceeded without any noteworthy pain reaction and after removal of the sensor, a temporary erythema was present in only half (5 out of 10) of the patients. Second, the sensor could be left for 14 days as specified by the manufacturer for use in humans in 70% (7 out of 10) of the dogs. Lastly, there was a very high degree of correlation with the reference method ($r = 0.94$). Accuracy of measurement was assessed in part based on requirements according to the ISO 15197:2013³ valid for human blood glucose monitoring systems. Minimum criteria for acceptable accuracy of the device are

² www.freestylelibre.de

³ BSI Standards Publication, In vitro diagnostic test systems – Requirements for blood glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus (EN ISO 15197:2013)

specified as follows: (1) 95 % of the measured glucose values should lie within the range of reference measurement plus/minus 15% (or ± 0.83 mmol/l (± 15 mg/dl) for values <5.55 mmol/l [<100 mg/dl]); (2) 99% of the measured glucose values should be within the zones A and B of the Parkes Consensus error grid analysis for type 1 diabetes. The “FreeStyle Libre” measurements in dogs failed the first criterion, where only 68% of the values were within the designated range, but met the second criterion for the whole number of samples, as well as samples in the normoglycaemic and hyperglycaemic range⁴.

As such, the positive results observed in the canine pilot study motivated us to assess the „FreeStyle Libre“ monitoring system in cats and determine the reliability of measurements when compared to the hexokinase reference method. In addition, the practicability of sensor installation and acceptance by the feline patients were assessed. Positive results of ten cats have already been published as a pilot study (Deiting and Mischke, 2019). As such, the present study is an expanded “FreeStyle Libre” feline study presenting the results from the use of 66 sensors in 34 diabetic feline patients.

⁴ Recently, two further studies have been published on the use of the "FreeStyle Libre" in dogs. 1. Malerba, E., Cattani, C., Del Baldo, F., Carotenuto, G., Corradini, S., Golinelli, S., Drudi, I., Fracassi, F., 2020. Accuracy of flash glucose monitoring system in dogs with diabetic ketoacidosis. *J. Vet. Intern. Med.* 34, 83–91. 2. Silva, D.D., Cecci, G.R.M., Biz, G., Chiaro, F.N., Zanutto, M.S., 2020. Evaluation of a flash glucose monitoring system in dogs with diabetic ketoacidosis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 74, 106525 (doi: 10.1016/j.domaniend.2020.106525).

2. Materials and methods

2.1 Study design

The study was performed on cats with medical need (indication) for continuous glucose monitoring. The sensor was usually applied on the same day of inpatient admission. Apart from assessment of animal behaviour during installation and removal of the sensor, animals were examined and observed daily regarding the acceptance of the sensor. In the initial phase of glucose monitoring, a minimum of 4 heparinised blood samples (maximal volume of 0.5 ml) per day were collected from the patients via venipuncture (or from central venous catheter if present) for reference measurements using the hexokinase method. Time points comply with the type and administration route of the insulin and individual courses of blood glucose values. Timed with the usually twice daily subcutaneous injections of insulin, blood samples were collected before the respective insulin injections and mostly around the time, when the sensor displayed the lowest values (nadirs). In cases of initial infusions of a short-acting insulin, blood sampling was performed in regular intervals of 6 h, for example. However, where appropriate, further down the course of treatment, where more stable blood glucose values become prominent, a reduced number of reference samples were collected on a daily basis.

At the times of blood collection, the sensors were read out and the glucose results were quoted on the patient's monitoring protocol. Immediately after removal of sensors, the skin area in which the sensors were attached to was examined with respect to possible reactions and side effects.

All examinations and treatments of animals were performed in accordance with the German Animal Welfare Law. The study design did not require approval by an ethics committee. After assessment by the Animal Welfare Officer of the university, the animal experiment was reported to the responsible authority (Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety [LAVES], reference number: 17A 172). In addition, pet owners' consent was obtained prior to the installation of the sensors.

2.2 Animals

Cats (*Felis silvestris catus*) used in this study were patients of the Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover. Inpatients were included, if continuous glucose monitoring was indicated and required, due to hyper- or hypoglycaemia and the pet owner agreed to apply a sensor.

Thirty-three animals suffered from diabetes mellitus (based on patient's history, clinical signs, laboratory changes [especially fructosamine] and further course of disease), partly associated with pancreatic diseases and/or hepatic lipidosis as indicated by sonographic and cytological findings. One cat was hypoglycaemic without detectable cause.

The study comprised of 34 patients with the following breed breakdown: 26 European Shorthair, 3 Norwegian Forest, 2 Maine Coon, 1 British Shorthair, 1 Sphynx, and 1 Birman. With regards to sex, the study consisted of 23 castrated males, 10 neutered females, and 1 intact female. Cats had a median age of 10.7 years (1.0–17.2 years; minimum–maximum) and a median body weight of 4.7 kg (1.6–8.2 kg).

2.3 “FreeStyle Libre” device

The “FreeStyle Libre” continuous glucose monitoring system consists of a sensor and a handheld reader. The sensor unit has a diameter of 3.5 cm and a thickness of 0.5 cm. A wafer-thin measuring filament is located in the centre of its underside which is coated with an adhesive.

A handheld reader measures at a distance of 1–4 cm from the sensor, so that direct contact with the animal is not required. Apart from the glucose level, the touch display of the device indicates data curves as well as the trend of the glucose values in the form of an arrow. The sensor saves up to 8 h worth of results. The handheld reader can be connected to a PC to create further diagrams and additional analyses (please see below). The measuring range of the sensor is 2.2–27.8 mmol/l (40–500 mg/dl). According to manufacturer's specifications for its use in humans, the sensor lifetime works up to 14 days, before it requires replacement.

2.4 Installation and handling of the sensor

1. On the dorsal chest wall behind the scapula (in well-fed animals, also between scapulae) a skin area of approximately 5 x 5 cm was shaved and disinfected with the supplied disinfecting tissues.
2. Then, the sensor unit was applied to and stuck onto the prepared skin area of the unsedated patients using the supplied installation device. Upon sensor adhesion, the measuring filament simultaneously pricks the skin. For sensor installation unit removal,

fixation of the sensor unit at the adhesive edge using a pean clamp has proved successful.

3. After the first two applied sensors became detached after a few days, additional sensors during the subsequent course of the study were additionally fixed with eight skin stitches (Fig. 1).

4. After the automatic calibration phase of one hour, the sensor was ready for use and could be read off as often as required using the handheld reader (Fig. 2).

5. At the latest, data from the sensor is read out at 8 h intervals by the handheld reader and saved.

6. According to the manufacturer's specifications and dependent on the duration of hospitalisation, the sensor can be left for up to two weeks.

7. At the latest, after 3 months, data from the handheld reader should be transferred to a PC using the corresponding software. The supplied software enables the creation of different graphical illustrations and tabular overviews, especially daily protocols (graphs with highlighted scanned values), weekly overviews (with graphs of 7 days), daily average courses (from the superimposed daily patterns of a period) and monthly overviews (table with daily averaged glucose concentration).

2.5 Glucose reference measurements

Blood samples were collected and centrifuged within 15 min. Plasma supernatant was transferred to an uncoated reaction tube, which was deep-frozen and stored at – 80 °C until serial measurements. Immediately prior to measurement, samples were thawed in a 37 °C water bath. Measurements were performed with the hexokinase

method (Knust et al., 1984) using an autoanalyser Cobas c 311 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), a commercial test kit (Glucose HK Gen.3), and a human universal standard plasma ("Calibrator for automated systems") for calibration. Daily quality controls were performed with human control sera (Precinorm U, Precipath U). All reagents and sera were from Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.

2.6 Statistical analysis

The statistical assessment included 359 data pairs, within the measurement range of the "FreeStyle Libre" device (2.2–27.8 mmol/l; 40–500 mg/dl). Linear regression analysis and Spearman's rank correlation analysis were performed. In addition, a difference plot against the hexokinase method results was performed and median values were calculated from the relative differences between the results of the reference method and the glucose monitoring system. Supplementary correlation and difference analysis was performed on the following subpopulations regarding the blood glucose values as measured by the hexokinase method: subnormal (< 4.4 mmol/l [80 mg/dl], n = 10), normal (4.4–6.7 mmol/l [80–120 mg/dl], n = 15), and hyperglycaemic values (> 6.7 mmol/l [120 mg/dl], n = 334). Further analyses were performed regarding the ISO 15197 criteria as mentioned above including the determination of the percentage of "FreeStyle Libre" results within the range of reference measurements plus/minus 15% (or ± 0.83 mmol/l [± 15 mg/dl] for values < 5.55 mmol/l [< 100 mg/dl]) as well as a Parkes error grid analysis (Parkes et al., 2000).

3. Results

Attachment of the vast majority of sensors (64/66), usually including fixation stitches, did not induce a noticeable defensive reaction in 33/34 animals. A maximum reaction of turning around of their head, accompanying the attachment of 28/66 sensors, was observed in these 33 patients. Fourteen animals received two or more sensors usually after premature loss of the first sensor. However, 2 of these 64 sensors were affixed to animals in the final stage of sedation necessary to perform advanced diagnostic procedures, and as such, the defense reaction could not be assessed. Only one cat, which already showed strong defense reactions during the daily routine handling, accordingly showed a strong defense reaction during the two sensor attachments in the form of hissing, and attempts to scratch and bite. None of the cats showed any change in general behaviour after sensorattachment (Fig. 3).

Approximately 70% (46/66) of the sensors spontaneously stopped working *in situ* after a median of 8.3 (1.6–14) days, before they had to be removed or, where appropriate, replaced by a new sensor. Only 20% (9/46) of these sensors reached a measurement period of 14 days as specified by the manufacturer for human use.

The remaining 20 sensors, which were not considered in the evaluation above, included 2 sensors which did not show any measuring function post the one hour lasting calibration phase and 18 sensors which were removed early and still functioning. It could not be determined whether the lack of function in the two sensors either was due to an incorrect attachment or a production error. Meanwhile, the 18 sensors which were still functioning when removed, included 8 sensors, which were removed by the cats themselves (2.1–10.9 [median 5.85] days after installation), 4

sensors applied to cats which had to be euthanised (3–9.6 [median: 4.8] days after installation), 1 sensor affixed to a cat which died spontaneously (5.2 days after sensor installation), and 5 sensors which were removed early and in a functional status due to other reasons. Five of the 8 sensors were removed by the cats themselves during hospitalisation and 3 at home. None of these cats showed signs indicating that they tried to remove the sensors. In one of two cases, where the loss of sensors was directly observed, the lolling cat accidentally touched the cat toilet which lifted the sensor off of the cat skin. In the other case, the sensor got stuck in the doorframe when the cat was playing at home.

Sensor detachment took place without difficulties and was done by simply pulling them off, after removal of fixation sutures. 61% (36) of the 59 sensors with assessable skin reactions induced no clinically detectable skin reactions present on the adhesive contacted areas, whereas post removal, mild transient erythema occurred and a superficial dermatitis was observed with 36% (21 – of which one non affixed with stitches), and 3% (2) of these 59 sensors, respectively. This evaluation did not consider 7 sensors of which 5 were removed after euthanasia or spontaneous death, so that the assessment of the skin reaction was limited. In addition, one sensor was removed by the referring veterinarian (after the end of its lifetime, i.e. 13.8 days) and one at home by the pet owner, respectively, so that the skin reaction also could not be properly assessed. The situation post sensor removal revealed that after several days, there did not appear to be any intact adhesive bound to the skin anymore which was due to the re-growing coat. Therefore, sensors were mainly fixed and held in position by fixation stitches.

In 21 patients, at least one individual glucose value exceeded 27.8 mmol/l (500 mg/dl). Results above this threshold were displayed as “Hi” by the “FreeStyle Libre” reader (i.e. without precise glucose concentration). In 81% (17/21) of the cats, this was repeatedly the case and in 5 of these cats, this occurred for timeperiods of more than one hour (3–11 h; median: 9 h). As such, these 17 cats required additional blood sample collection for glucose measurements (27.9–51 mmol/l; $n = 50$ values). Four samples had glucose concentrations as measured by the hexokinase method which were below the measurement range of the device (< 2.2 mmol/l [40 mg/dl]).

Data analysis using the manufacturer's complimentary supplied software was easy and generated graphs revealed a good overview of the blood glucose chart of the respective animal. However, censorship of graphical presentation of glucose values already at concentrations of > 19.4 mmol/l (350 mg/dl), i.e. below the upper limit of the measurement range of the “FreeStyle Libre” proved to be disadvantageous (Fig. 4).

62% (21/34) cats were released from the Small Animal Clinic with a functioning sensor and reader for further monitoring of blood glucose values at home by their pet owners. They reported that reading the sensors was simple and getting knowledge about the actual (realtime) glucose values made them feel reassured. In the cats' familiar environment, sensor-related restrictions of their general behaviour were not observed, although some cats wore a body shirt or collar to protect the sensor.

A strong positive correlation was observed between glucose values measured by the glucose monitoring system and those measured by the reference method as evidenced by a Spearman's rank correlation coefficient (r_s) of 0.90 ($p < 0.0001$). The correlation was lower in the hypoglycaemic (< 4.4 mmol/l [80 mg/dl], $r_s = 0.56$, $n = 10$) and normoglycaemic range of values (4.4–6.7 mmol/l [80–120 mg/dl], $r_s = 0.49$, $n =$

15) when compared to hyperglycaemic values (> 6.7 mmol/l [120 mg/dl]; $r_s = 0.88$, $n = 337$) (Fig. 5). The relative deviation (median of unsigned values) from the reference method for the total number of samples was 9.96% with a wide range of signed deviations ($[-61]$ – 126%) and with slightly higher median values of unsigned relative deviations in the hypoglycaemic and normoglycaemic range (< 4.4 mmol/l: 12.3%; 4.4 – 6.7 mmol/l: 12.6%; > 6.7 mmol/l: 9.60%).

Overall, 67.7% (243/359) of the “FreeStyle Libre” results were within the range of reference measurements plus/minus 15% (or ± 0.83 mmol/l [± 15 mg/dl] for values < 5.55 mmol/l [< 100 mg/dl]) (Fig. 6). The isolated analysis of data pairs with blood glucose values < 5.55 mmol/l (< 100 mg/dl) as measured by hexokinase method revealed that 66.7% (10/15) of the “FreeStyle Libre” measurements had a deviation from the reference measurement of less than 0.83 mmol/l. An individual assessment of values with deviations of $> 30\%$ revealed that these were observed in 17 cats. Particularly noticeable was one medium aged (6.9 years) Domestic Short Hair cat of normal weight (3.9 kg), where 6 of 9 “FreeStyle Libre” measurements were more than 30% higher when compared to the reference method without obvious reason. Nevertheless, 99.4% (357/359) of the whole “FreeStyle Libre” measurements were within zones A and B of the Parkes Consensus error grid analysis (Fig. 7).

4. Discussion

The results from our expanded feline study are well in accordance with observations reported in the canine pilot study (Corradini et al., 2016), where easy attachment, as well as good tolerance of the applied sensor has been reported.

Unexpectedly and fortunately only one cat showed a distinct defense reaction after affixing the sensor, a very favourable aspect for the clinical application of this glucose monitoring system. This cat appeared uncooperative and increasingly defensive during the whole inpatient stay. Thus, the defense reaction during the installation of the sensor was likely directed against the general handling and not specifically against the attachment of the sensor per se.

However, not every point could simply be transferred and applied to cats from the canine study, especially as an additional fixation step with individual skin stitches needed to be performed in the present study. According to our experience, such an additional fixation is strongly advisable in cats. With regard to good toleration of the attachment procedure, a local anaesthesia was not considered necessary. Especially taking into account that, for example, a cold spray or application of a local anaesthetic containing gel was regarded as certainly being detrimental to the adhesive bond and, in addition, possibly having a negative influence on sensor measurements. However, this point could probably be a valuable topic for further systematic investigation in a future study, because several colleagues who intend to apply our sensor fixation technique may prefer to use some kind of local anaesthesia.

In Corradini et al.'s (2016) pilot canine study, the sensor applied in the neck area was additionally fixed with an adhesive film on top of the sensor and a supplementary neck bandage. For sensor attachment in humans, third-party companies provide adhesive rings for the sensor which can increase the bonding surface. We did not regard these additional adhesive fixation methods as optimal or practicable for 2 reasons. First, it is very difficult to affix the sensor on the location divergently selected between scapulae or on the upper thorax. Although one feline study had the best

results when a “Guardian Real-Time” continuous glucose monitoring system was attached onto the dorsal neck (Hafner et al., 2013), we did not consider the neck as appropriate, because our inpatients are frequently wearing a cervical collar. Second, rapid hair growth in cats was considered and taken into account which can lead to detachment of the bond between sensor and skin, already after several days. This aspect may limit the effectiveness of the possible use of a stronger adhesive in cats, which might be considered. The rapid hair growth would probably also cause a loss of function of the adhesive films and rings mentioned above. In addition, bandages harbour the risk of slipping and might possibly restrain motion activity in animals.

Moreover, in Corradini et al.'s (2016) canine pilot study, the maximal measurement duration of the sensor of 14 days as specified by the manufacturer for use in humans was achieved with 70% (7/10) of the sensors. In comparison, a shorter functional life of the sensor was observed in cats, despite additional fixation with individual skin stitches in our study. Possible factors contributing to the obviously reduced lifetime of the sensor in cats may be the differences in skin thickness and –elasticity, and in behaviour and handling of the animals. The feline skin is thinner than that of dogs (Scott, 1980), but also remarkably more elastic and less firmly attached to the underlying structures, so that the cutis is more relocatable. Therefore, we suspect that the sensor electrodes might be exposed to higher shear forces, when compared to humans or dogs, for example. Furthermore, because cats were more often manipulated in daily hospital routines, including treatments and cleaning operations, as compared to dogs, we also suspect that this may have played a role in exposing the sensors to greater mechanical influences. In addition, with clinical improvement, especially when used at home, jumping behaviour of the feline species becomes very

challenging for the fixation of the sensor. Last but not least, due to detachment of the bond between sensor and skin, which sometimes was observed already after several days, it is a possible that the sensors just stopped working, because the measurement filament was no longer in the correct place.

The overall reduction of the sensor's functional life in cats when compared to the manufacturer's specifications for humans should be considered in an objective consultation with pet owners. Nevertheless, even though with a shortened runtime of an average of 8.3 days, the instrument delivers valuable support. The positive feedback of pet owners regarding home monitoring indicates new options for ambulatory adjustment of insulin treatment in cats. The intervals of follow-up appointments with blood collections for glucose and fructosamine measurements can be extended by digital transmission of graphs illustrating the development trends of glucose concentrations. However, due to the random nature of unexpected spontaneous termination of sensor function and reduced functional life, an additional back-up system for glucose measurement (e.g., glucometer) should be present when the device is recommended for home use.

The fact that only 2 (approximately 3%) of the 59 sensors with assessable skin reaction induced a temporary superficial dermatitis, and the extent of a light erythema was observed with 36% (21/59) of these sensors, demonstrates that the sensor unit and its adhesive surface have good skin compatibility. More than half (61% [36/59]) of the sensors induced no clinically detectable skin reactions present on the adhesive contacted areas. In contrast to our pilot study (Deiting and Mischke, 2019), we finally decided not to consider cases where the sensor was removed after euthanasia or spontaneous death. Although the skin areas were usually assessed in a timely manner,

possible skin reactions may appear less pronounced and, thereby, possibly less well detectable under these conditions.

The upper measurement limit of 27.8 mmol/l (500 mg/dl) limits the applicability of this system for intensive care management of extremely hyperglycaemic cats. This is especially relevant in the initial treatment phase and/or hyperglycaemic crises, which are often associated with ketoacidosis. In that measurement range, measurements of capillary blood using the glucometer method with a wider measurement range (e.g., AlphaTrak [Kang et al., 2016]) or blood collections and measurements using the hexokinase method cannot be waived.

In our present study, the correlation between “FreeStyle Libre” device measurement results and those of the hexokinase method ($r_s = 0.90$), in addition to the relative deviation from the reference method (median: 9.96%) were surprisingly good. A similar degree of correlation ($r = 0.94$) was observed in Corradini et al.'s (2016) canine study based on a large sample size ($n = 432$). Interestingly, we also found nearly identical results for the accuracy criteria according to the ISO 15197 when compared to that study (Corradini et al., 2016). In our study 67.7% of the results of the glucose monitoring system were within the range of reference measurements $\pm 15\%$ (or ± 0.83 mmol/l [± 15 mg/dl] for values < 5.55 mmol/l [< 100 mg/dl]) compared to 68% in Corradini et al.'s (2016) study. Whereas the number of these results with minor deviations from the reference in canine samples with blood glucose values < 5.55 mmol/l (100 mg/dl) was lower (56%) than in the residual samples (73%), we did not find a relevant difference regarding the percentage of results with a minor difference (66.7%) in the small number of feline samples (10/15) in this range compared to the total number of samples. However, individual “FreeStyle Libre” measurements showed

great differences from the reference measurements and especially in one of our animals repeatedly. Therefore, at least single reference measurements may be advisable in the initial phase after sensor attachment and in cases of non-plausible results. However, results of the error grid analysis strongly indicate that these differences from reference measurements are only very exceptionally (0.6% [2/359]) clinically relevant. Regarding this important quality criterion, the “FreeStyle Libre” device fulfills even the human medicine requirements for blood glucose measurement devices, which require 99% of results in zones A and B of the Parkes error grid analysis. The own result of 99.4% is also well in accordance with the cited canine study demonstrating a slightly lower percentage (98.7%).

This indicator of a clinically adequate accuracy of measurements in the feline patient is even more relevant, when considering the different sampling media (blood plasma versus interstitial fluid). In contrast, the ISO 15197 criteria are designed for instruments, which measure blood glucose. In our study, we have therefore to consider that the discrepancy between values measured with both methods may not always be simply due to a real inaccuracy of the assessed continuous glucose monitoring system, but could be at least partly also a consequence of the time lag for the equilibration between the two compartments. In humans, the interstitial glucose content reacts with a delay of 5–10 min to sudden changes of the intravenous glucose concentration (Basu et al., 2013). In cats, the time period for equilibration of glucose between these compartments is specified with 11.4 min (Moretti et al., 2010). As cats can develop a pronounced stress hyperglycaemia (Nibblett et al., 2015), after blood sampling for example, it is possible that venous glucose concentration is increased, whereas the glucose concentration in the interstitium is still in the equilibration phase. In this context

it is also relevant that many samples were taken in the initial phase of insulin therapy adjustment with strong fluctuations of the blood glucose concentration, whereas for example in the cited human study (Bailey et al., 2015) mainly samples during the stable phase of insulin treatment were collected. This aspect can be an important cause for the fact that in our study the difference between measurements with both methods frequently exceeded the limit of $\pm 15\%$ and with regard to this criterion did not meet the ISO 15197 requirements.

Furthermore, a certain extent of inaccuracy of the reference measurements due to preanalytical and methodological factors has to be taken into account (e.g., inconsistent localisation of blood collection and sample volumes). Taking all the already mentioned limitations into consideration, all indications point to an appropriate reliability of “FreeStyle Libre” individual measurements, whereby readout repetitions are possible at any time and continuous recording will further increase the reliability of the results.

The major limitation of this study appears to be the low number of subnormal and normal samples included, so that strictly speaking, a significant statement regarding measurement accuracy in this clinically relevant area can be made only with caution. This aspect is a worthwhile objective for further studies.

5. Conclusions

Accurate measurements (at least in the hyperglycaemic range) in addition to high acceptance and good skin compatibility seem very promising aspects for the clinical application of the “FreeStyle Libre” novel continuous glucose monitoring system

in cats. Perhaps, if the system's sensors can be customised and catered to cats and dogs, with the appropriate adhesive and fixation aid better adopted to either species' skin properties and behaviour, that would be an important step to easify home use of this system by pet owners.

References

- Bailey, T., Bode, B.W., Christiansen, M.P., Klaff, L.J., Alva, S., 2015. The performance and usability of a factory-calibrated flash glucose monitoring system. *Diabetes Technol. Ther.* 17, 787–794.
- Basu, A., Dube, S., Slama, M., Errazuriz, I., Amezcua, J.C., Kudva, Y.C., Peyser, T., Carter, R.E., Cobelli, C., Basu, R., 2013. Time lag of glucose from intravascular to interstitial compartment in humans. *Diabetes* 62, 4083–4087.
- Corradini, S., Pilosio, B., Dondi, F., Linari, G., Testa, S., Brugnoli, F., Gianella, P., Pietra, M., Fracassi, F., 2016. Accuracy of a flash glucose monitoring system in diabetic dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 983–988.
- Deiting, V., Mischke, R., 2019. Practical application of the novel glucose monitoring system „Freestyle Libre“ in cats. *Prakt. Tierarzt* 100, 540–550. (article in German)
- Gottlieb, S., Rand, J., 2018. Managing feline diabetes: current perspectives. *Vet. Med. (Auckl.)*. 9, 33–42. doi: 10.2147/VMRR.S125619
- Hafner, M., Lutz, T.A., Reusch, C.E., Zini, E., 2013. Evaluation of sensor sites for continuous glucose monitoring in cats with diabetes mellitus. *J. Feline Med. Surg.* 15, 117–123.

- Kang, M.-H., Kim, D.-H., Jeong, I.-S., Choi, G.-C., Park, H.-M., 2016. Evaluation of four portable blood glucose meters in diabetic and non-diabetic dogs and cats. *Vet. Q.* 36, 2–9.
- Knust, A., Draeger, B., Ziegenhorn, J., 1984. Metabolites 1: Carbohydrates. In: Bergmeyer, H.U. (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. Volume VI. Verlag Chemie, Weinheim, 163–172.
- Moretti, S., Tschuor, F., Osto, M., Franchini, M., Wichert, B., Ackermann, M., Lutz, T.A., Reusch, C.E., Zini, E., 2010. Evaluation of a novel real-time continuous glucose-monitoring system for use in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 120–126.
- Nibblett, B.M., Ketzis, J.K., Grigg, E.K., 2015. Comparison of stress exhibited by cats examined in a clinic versus a home setting. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 173, 68–75.
- O'Neill, D.G., Gostelow, R., Orme, C., Church, D.B., Niessen, S.J.M., Verheyen, K., Brodbelt, D.C., 2016. Epidemiology of Diabetes mellitus among 193,435 cats attending primary-care veterinary practices in England. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 964–997.
- Parkes, J.L., Slatin, S.L., Pardo, S., Ginsberg, B.H., 2000. A new consensus error grid to evaluate the clinical significance of inaccuracies in the measurement of blood glucose. *Diabetes Care* 23, 1143–1148.
- Pfützner, A., Klonoff, D.C., Pardo, S., Parkes, J.L., 2013. Technical aspects of the Parkes error grid. *J. Diabetes Sci. Technol.* 7, 1275–1281.
- Scott, D.W., 1980. Feline dermatology 1900–1978: A monograph. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 16, 331–459.

Figures and Legends



Fig. 1: Sensor unit of the flash glucose monitoring system “FreeStyle Libre” fixed on the upper chest wall of a cat: Additional fixation using skin stitches proved to be an advantage.

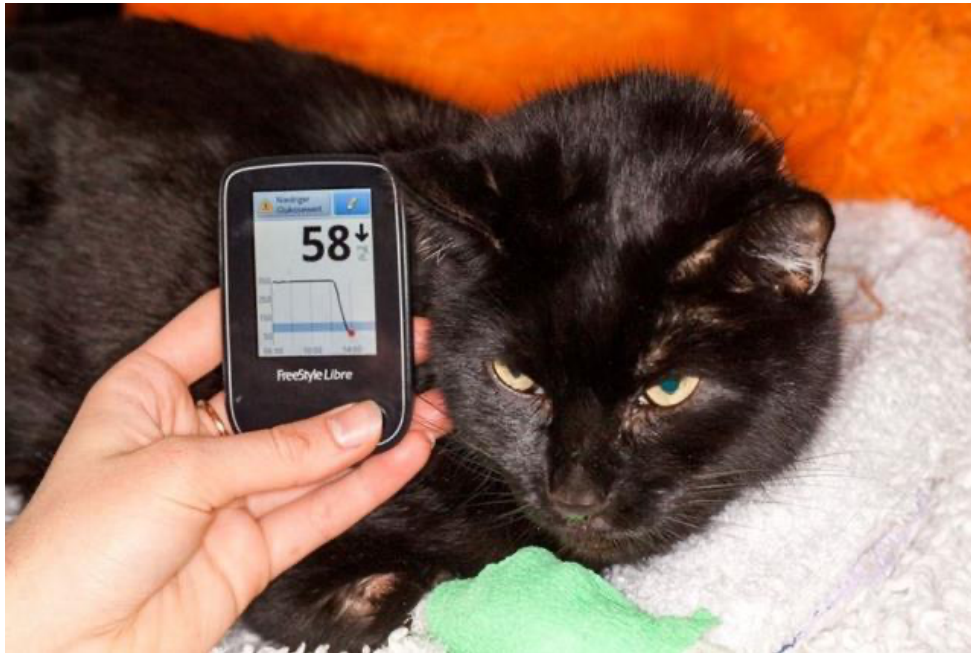


Fig. 2: Easy reading of the actual blood glucose value from the sensor using the handheld reader.



Fig. 3: The sensor does not affect the overall behaviour of cats.

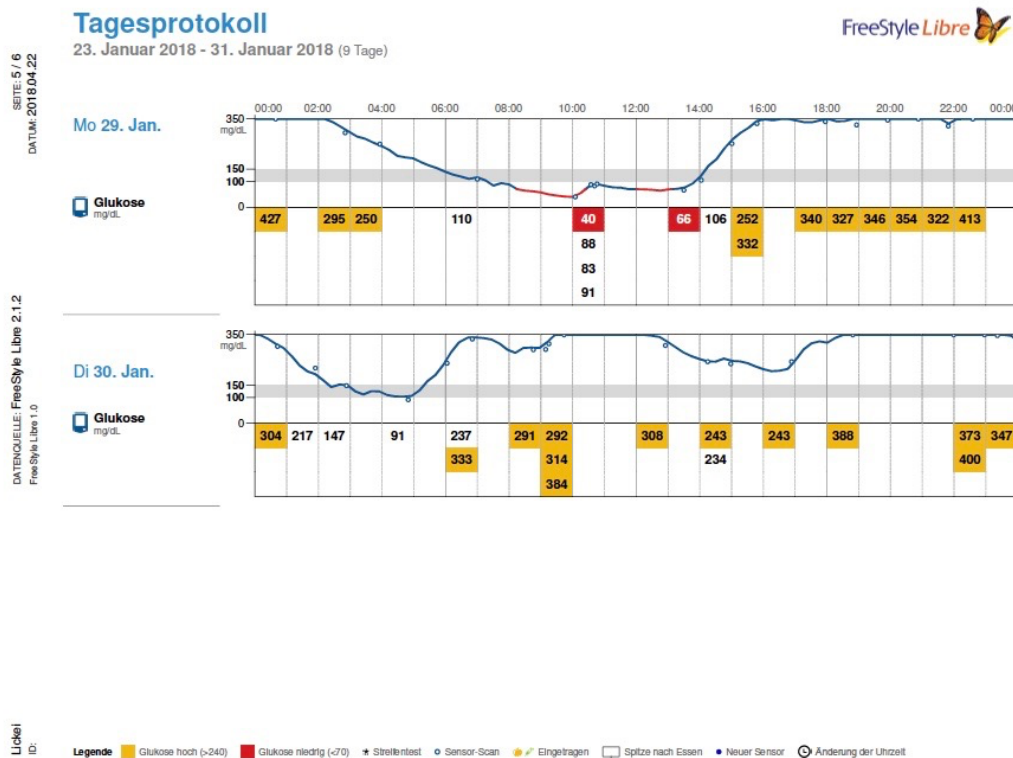


Fig. 4: Daily protocols (graphs with highlighted scanned values) of the blood glucose in a diabetic cat created by the software provided by the manufacturer of the continuous glucose measurement device “FreeStyle Libre”. The censorship of the graphical illustration above a cut-off value of 19.4 mmol/l (350 mg/dl) proved to be a limitation of the method. Values highlighted with a yellow background indicate time points when the sensor was scanned with the reading device. In addition, the software highlights hypoglycaemic values automatically with a red background. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

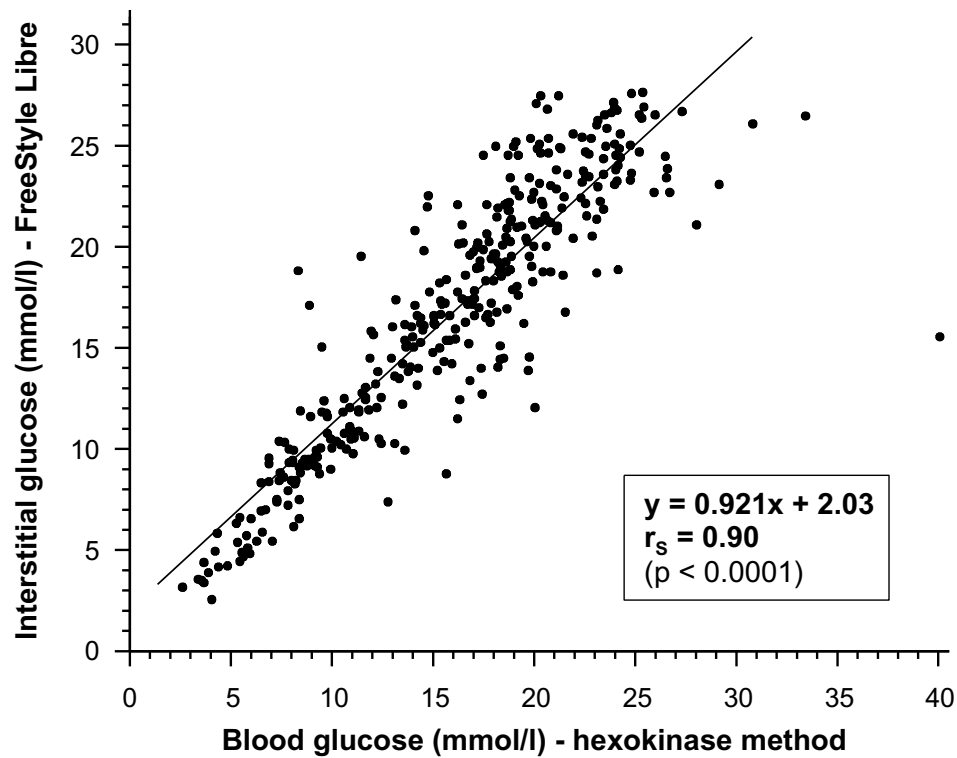


Fig. 5: Relationship between blood glucose concentrations measured with the hexokinase method and interstitial glucose concentrations determined using the continuous glucose monitoring system “FreeStyle Libre” in 34 diabetic cats (359 samples with parallel measurements): Results of linear regression and Spearman's rank correlation analysis.

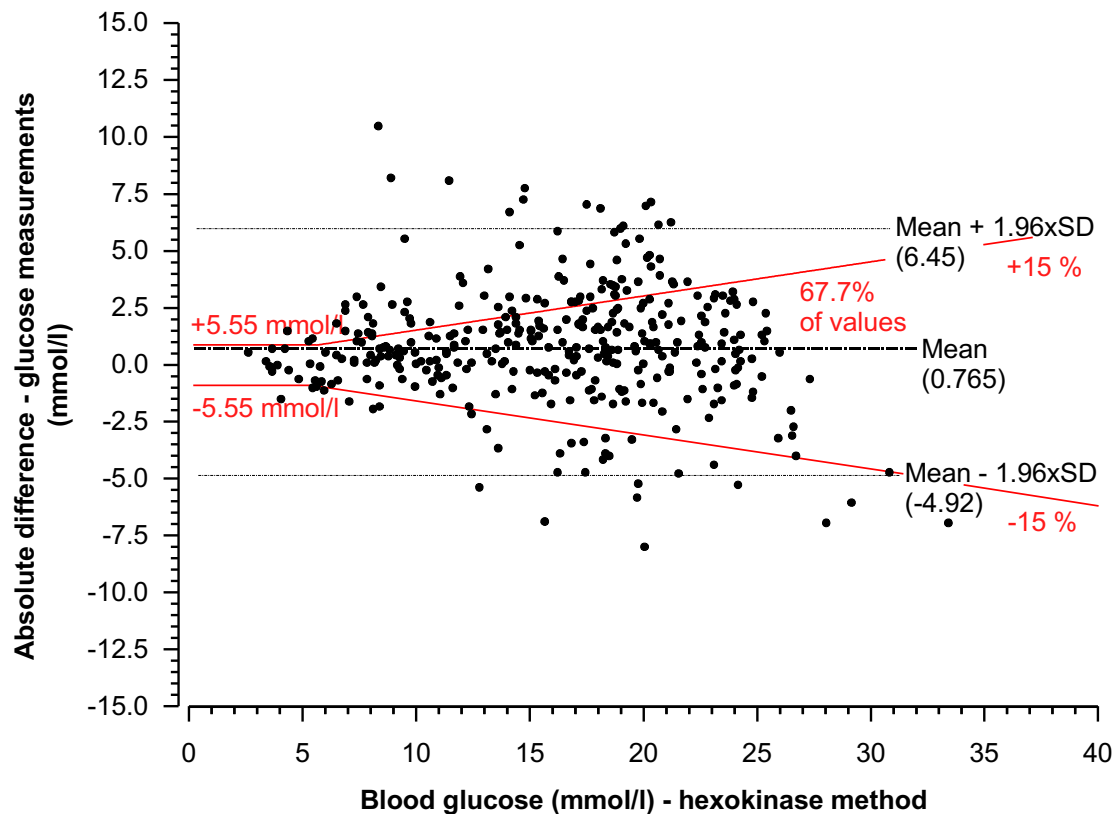


Fig. 6: Difference plot: Relationship between glucose concentrations measured in the venous blood with the reference (hexokinase method) and the absolute difference between glucose concentrations measured with the continuous glucose monitoring system “FreeStyle Libre” and the reference method in 34 diabetic cats (359 samples with simultaneous measurements). Red lines indicate the limits of deviation from reference measurements according to ISO 15197.

For reasons of clarity, the graphical illustration did not consider one outlier (hexokinase 40.1 mmol/l, deviation –24.5 mmol/l) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

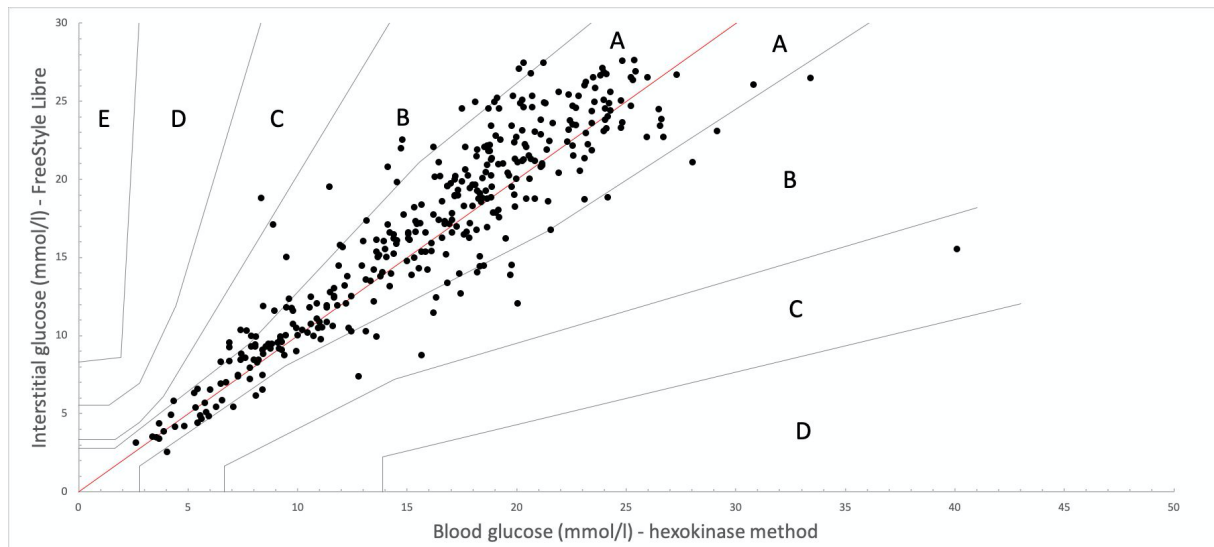


Fig. 7: Parkes error grid analysis for measurements of the “FreeStyle Libre” flash glucose monitoring system when compared with results of the reference (hexokinase method) (Parkes et al., 2000). 99.4% (357/359 values) are within zones A and B, 0.6% (2/359) in zone C, and none in zones D and E.

The different zones indicate the risk as a consequence of the deviating result: A – no effect on clinical action, B – altered clinical action, little or no effect on clinical outcome, C – altered clinical action, likely to effect clinical outcome, D – altered clinical action, could have significant medical risk, E – altered clinical action, could have dangerous consequences

4.3 Manuskript 3: Praktische Anwendung des kontinuierlichen Glukosemesssystems „FreeStyle Libre“ beim Hund

Das folgende Manuskript wurde zur Manuskripteinreichung vorbereitet.

Praktische Anwendung des kontinuierlichen Glukosemesssystems „FreeStyle Libre“ beim Hund

Use of the continuous glucose monitoring system “FreeStyle Libre” in dogs.

Kurztitel: Glukosemesssystem „FreeStyle Libre“ beim Hund

Verena Deiting, Reinhard Mischke*

Klinik für Kleintiere, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Deutschland

Zusammenfassung

Ziel: Überprüfung der Akzeptanz und Messrichtigkeit des kontinuierlichen Glukose Monitoring-Systems „FreeStyle Libre®“ beim Hund.

Material und Methoden: Die Studie umfasst 26 Hunde, denen insgesamt 40 Sensoren appliziert wurden. Es wurde das Verhalten während der Sensorapplikation, der Monitoring-Phase und der Sensorentfernung beobachtet und anschließend die Hautstelle, auf die der Sensor geklebt war, begutachtet. Parallel zum Ablesen des Sensors wurden mehrfach täglich venöse Blutproben entnommen, welche mittels Hexokinase-Methode auf ihren Glukosegehalt untersucht wurden.

Ergebnisse: Bei der Sensorapplikation war als deutlichste Reaktion ein Wunden des Kopfes wahrzunehmen (n = 14). 58 % (23/40) aller Sensoren stellten ihre Funktion selbstständig nach im Median 14 Tagen (1,5–14 Tage) ein, wobei 83 % (19/23) dieser Sensoren die vom Hersteller angegebene Messdauer von 14 Tagen erreichten. Von den 31 Sensoren, bei denen die mögliche Hautreaktion an der Klebefläche beurteilt werden konnte, zeigte sich 16-mal (52 %) keine Reaktion; dreizehnmal (42 %) eine leichte Rötung und nur zweimal (6 %) eine oberflächliche Dermatitis. 20 Tiere wiesen während der Monitoring-Phase Glukosewerte > 27,8 mmol/l auf, die vom Lesegerät undifferenziert als „HI“ angezeigt wurden. Von diesen zeigten 15 Hunde sogar über einen längeren Zeitraum (zwischen 3 und 29 Stunden) „HI“-Werte, sodass zusätzliche Messungen mittels Hexokinase-Methode notwendig waren. Es zeigte sich eine hohe Korrelation zur Referenzmethode ($r_s = 0,90$, n = 269), wobei die Korrelation im hypo- und normoglykämischen Bereich deutlich geringer war. Die Ergebnisse des Messsystems entsprachen nur eingeschränkt den Vorgaben der ISO 15197:2015 für humane Blutzuckermessgeräte. Für Werte $\geq 5,6$ mmol/l lagen nur 63,6 % der Differenzen von der Referenzmessung innerhalb des Toleranzbereichs von maximal ± 15 %, für Werte < 5,6 mmol/l sogar nur 40 % innerhalb der Toleranz von $\pm 0,8$ mmol/l. Erfreulicherweise befanden sich 99,3 % aller Messdifferenzen in den bezüglich des klinischen Managements unbedenklichen Zonen A und B der Parkes Error Grid-Analyse.

Schlussfolgerung und klinische Relevanz: Das neue kontinuierliche Glukose-Monitoring-System bietet durch seine einfache Handhabung, die gute Akzeptanz durch das Tier und die akzeptabel genauen Daten Verbesserungsmöglichkeiten für das Management von diabetischen Hunden. Limitierend ist die obere Messgrenze.

Schlüsselwörter: Flash Glukose Messsystem, canin, Hyperglykämie, Hypoglykämie, Diabetes mellitus

Abstract

Objective: To check the accuracy of measurement and acceptance of the continuous glucose monitoring system "FreeStyle Libre®" in dogs.

Material and methods: The results of 26 dogs that received a total of 40 sensors are included. The behaviour during sensor application, monitoring phase and sensor removal was observed and the skin at the adhesive area was assessed. Blood samples were taken simultaneously with reading out the sensor several times per day, and the glucose content was measured using a hexokinase reaction.

Results: The most obvious reaction during sensor attachment was a turning of the head ($n = 14$). 58 % (23/40) of sensors terminated their function in situ after a median period of 14 days (1.5–14 days). 83 % (19/23) of these sensors reached the maximal functional life of 14 days as specified by the manufacturer. Of the 31 sensors, where skin reaction at the adhesive area could be assessed, 16 times (52 %) no reaction, 13 times (42 %) a mild erythema and 2 times (6 %) a superficial dermatitis appeared. Twenty animals showed glucose values > 27.8 mmol/l during the monitoring phase, which were displayed by the reader as "HI", i.e. without precise value. 15 of these dogs showed "Hi" values even over a longer period of time (3–29 hours), so that additional measurements using hexokinase method were necessary. A high correlation was calculated between the "Freestyle Libre" values and those measured with the reference method (Spearman rank correlation coefficient, $r_s = 0.90$, $n = 269$). A noticeably less close correlation was found in the hypo- and normoglycaemic range. Results of the device were only partially compliant with ISO 15197:2015 for human blood glucose measuring instruments. Only 63.6 % or 40 % of the differences from reference measurements were inside the maximal tolerance of ± 15 % (for values ≥ 5.6 mmol/l) or ± 0.8 mmol/l (for values < 5.6 mmol/l), respectively. Fortunately, 99.3% of all measurement differences were in zones A and B of the Parkes error grid analysis, which are unproblematic with respect to the clinical management.

Conclusion and clinical relevance: The new continuous glucose monitoring system offers opportunities for improvement in the management of diabetic dogs due to its ease of use, good acceptance by the animal and acceptably precise data. The upper measurement limit is a limitation.

Key words: flash glucose monitoring system, canine, hyperglycaemia, hypoglycaemia, diabetes mellitus

Einleitung

Beim Hund liegt die Inzidenz für Diabetes mellitus in der Gesamtpopulation bei schätzungsweise 0,3–1 % (NEUVIANS et al., 2002). Für das erfolgreiche klinische Management dieser Patienten ist insbesondere in der Initialphase der Insulineinstellung eine engmaschige Glukoseüberwachung wichtig (CORRADINI et al., 2016). Kontinuierlich messende Glukosemonitoringsysteme (continuous glucose monitoring system, CGMS) messen den Glukosegehalt in der interstitiellen Flüssigkeit durch auf die Haut aufgebrachte Sensoren (BLUM, 2018). Bei modernen Geräten sind die Messergebnisse sofort ablesbar (Flash Glucose Monitoring Systeme, FGMS) (MALERBA, 2020), sodass die Blutentnahmeintervalle deutlich verlängert werden oder die Blutentnahme sogar ganz entfallen können (SURMAN et al., 2013).

Erste CGMS wurden bereits seit 2003 sowohl beim Hund erprobt (u. a. DAVISON et al., 2003; WIEDMEYER et al., 2005; REINEKE, 2010) als auch bei weiteren Tierarten wie dem Pferd, der Katze und dem Rind (WIEDMEYER et al., 2005). Das in all diesen Studien verwendete System „MiniMed“ (Medtronic Ltd. Dublin, Irland) hatte den Nachteil, dass der auf der Haut angeklebte Sensor mit einem Kabel an einen kleinen, tragbaren LCD-Monitor

angeschlossen werden musste. Der Monitor musste dann an einem Brustgeschirr fixiert werden. In diesen Studien wurden die Sensoren jeweils nur 24–48 Stunden am Tier belassen und dann entfernt. Die maximale Messdauer hätte jedoch auch nur lediglich 72 Stunden betragen. Außerdem musste dieser Gerätetyp initial und auch mehrmals im weiteren Verlauf mit Referenzmessungen aus Blutproben kalibriert werden (DAVISON et al., 2003; REINEKE, 2010). Die Daten waren erst nach der Messperiode verfügbar, sodass ein zeitnahes Handeln, wie zum Beispiel die Anpassung der Insulindosis, nicht möglich war.

Die zweite Generation von CGMS besaß bereits den Vorteil, dass der Sensor und die Empfangseinheit nicht mehr durch ein Kabel verbunden werden mussten, jedoch musste sich der Empfänger in einem engen Radius (1,5 bis 6 m, je nach Gerätetyp und -hersteller) um das Tier mit dem Sensor befinden. Das hierbei verwendete System „Guardian Real-Time“ (Medtronic plc, Dublin, Irland) wurde erfolgreich beim Hund (SURMAN et al., 2013) und bei der Katze (MORETTI et al., 2010; SURMANN et al., 2013) getestet.

Das innovativere FGMS „FreeStyle Libre“ (Abbott Laboratories, Chicago, USA) wurde für die Anwendung beim Menschen entwickelt. Sensor und Lesegerät sind nun vollkommen getrennte Einheiten.⁵Am Patienten verbleibt lediglich der Sensor, welcher mit einer Applikationsvorrichtung auf der Haut angebracht wird. Das Handlesegerät muss nur noch für den Ablesevorgang und Datentransfer in Sensornähe (ca. 4 cm) gebracht werden (BLUM, 2018). Die initiale Sensorkalibrierung erfordert keine zusätzlichen Blutentnahmen (BLUM, 2018). Die maximale Messdauer beträgt nach Herstellerangaben¹ für den Menschen bis zu 14 Tage. Laut einer Umfrage des Geräteherstellers empfanden 80 % der menschlichen Anwender die Überwachung mittels "FreeStyle Libre" deutlich weniger schmerzhaft als bei konventioneller Überwachung. In einer umfassenden Evaluierungsstudie korrelierten die Messwerte sehr gut mit denen der Kapillarblutmethode ($r = 0,96$) und die mittlere relative

¹ Quelle: <https://www.freestylelibre.de/libre/discover/erste-schritte.html> (aufgerufen am 17.09.2020)

Differenz betrug 11,4 % (BAILEY et al., 2015). Evaluationen beim Menschen zeigten allerdings, dass niedrige Glukosewerte vom „FreeStyle Libre“ unterschätzt wurden, während hohe Glukosewerte im Vergleich zur gewählten Referenzmethode Glukometer (StatStrip) überschätzt wurden (FOKKERT et al., 2017). Jedoch lagen – gemessen an Referenzmessungen mit der Kapillarblut-Messmethode – 99,7 % der Abweichungen in den Zonen A und B der Parkes-Konsensus-Fehlerrasteranalyse (Consensus Error Grid, Parkes Error Grid) (BAILEY et al., 2015). Die Fehlerrasteranalyse (PARKES et al., 2000) dient der Bewertung der klinischen Relevanz von Messwertabweichungen von Blutzuckermessungen und ist wesentliches Kriterium der ISO 15197 (s. u.) zur Bewertung von Blutzuckermesssystemen (PFÜTZNER et al., 2013). Es wurden nur geringe Nebenwirkungen in Form von kleinen Verletzungen an der Einstichstelle des Sensors, leichter Rötung im Bereich des Sensors, einer milden Infektion oder einer Pustelbildung beschrieben (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

Im Jahr 2016 wurde die erste Pilotstudie zum "FreeStyle Libre" bei 10 diabetischen Hunden (CORRADINI et al., 2016) publiziert, deren positive Ergebnisse sowohl bezüglich Verträglichkeit, Lebensdauer und auch Messgenauigkeit uns zu eigenen Studien motivierte. Es bestand eine sehr hohe Korrelation mit den Werten der Referenzmethode ($r = 0,94$) (CORRADINI et al., 2016). Für die Beurteilung der Messrichtigkeit wurde die für menschliche Blutzuckermessgeräte geltende ISO 15197:2013 (BSI STANDARDS PUBLICATIONS, 2013) zugrunde gelegt. Die dort angeführten Mindestkriterien beinhalten, dass: (1) 95 % der gemessenen Glukosewerte innerhalb des Bereichs der Referenzmessung ± 15 % bei Werten $\geq 5,6$ mmol/l (≥ 100 mg/dl) bzw. $\pm 0,8$ mmol/l (± 15 mg/dl) für Werte $< 5,6$ mmol/l (< 100 mg/dl) liegen sollen; (2) 99 % der gemessenen Glukosewerte innerhalb der Zonen A und B der Parkes-Konsensus-Fehlerrasteranalyse für Typ-1-Diabetes liegen sollen. Das erste Kriterium wurde deutlich verfehlt, da nur 68 % der Werte innerhalb der Toleranz lagen; hingegen wurde das zweite Kriterium erfüllt (CORRADINI et al., 2016). Kürzlich erschienen zwei weitere

Publikationen zur Anwendung des „Freestyle Libre“ bei Hunden in Ketoazidose, die die Aktualität und Relevanz des CGMS „Freestyle Libre“ für die Glukosemessung beim Hund dokumentieren. Auch hier wurde eine gute Korrelation von $r_s = 0,93$ und adäquate Genauigkeit der Messungen (99,6 % der Werte in die Zonen A und B des Parkes Consensus Error Grid) (MALERBA et al., 2020), jedoch eine reduzierte Messgenauigkeit im hypoglykämischen Bereich dokumentiert (SILVA et al., 2020).

In dieser Arbeit sollen die Ergebnisse unserer Studie bezüglich der Überprüfung der Messrichtigkeit des „FreeStyle Libre“ im Vergleich zur Referenzmethode Hexokinasereaktion und dessen Akzeptanz durch die Patienten dargestellt werden, wobei ein modifiziertes Fixationsverfahren zur Anwendung gelangte.

Material und Methoden

Studiendesign

Die Studie umfasste 26 Hunde aus dem Patientengut der Klinik für Kleintiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Bei diesen Patienten war aus medizinischer Indikation eine kontinuierliche Glukoseüberprüfung notwendig. Wenn möglich, wurde der Sensor noch am Einstellungstag der stationären Betreuung appliziert.

Initial wurde das Tierverhalten bei der Sensorapplikation beurteilt und ebenso bei der Entfernung des Sensors. 10 der 26 Hunde (38 %) erhielten mehr als einen Sensor. Während der Tragezeit wurden die Hunde täglich allgemeinuntersucht und das Verhalten während des Ablesevorgangs beurteilt.

Als Referenzmethode diente die Glukosebestimmung mittels Hexokinasereaktion. Dazu wurden zu Beginn der Monitoringphase mindestens viermal pro Tag (im späteren Therapieverlauf bei stabileren Werten ggf. in einer reduzierten Anzahl) jeweils maximal 0,5 ml

Heparinblut mittels Venenpunktion (bei Vorhandensein eines Zentralvenenkatheters ggf. aus diesem) entnommen. Die Blutentnahmezeitpunkte wurden durch die Applikationsart des Insulins und die individuellen Glukoseverläufe bestimmt. Bei der Insulinapplikation im 12-Stunden-Intervall wurde den Hunden kurz vor der Insulingabe und zum Zeitpunkt des niedrigsten Glukosegehaltes (Nadir) Blut entnommen. Besonders kritische Tiere erhielten anfänglich eine Altinsulin-Dauertropfinfusion, wobei sich die Blutentnahmezyklen nach der Höhe des jeweiligen Glukosewert richteten (ca. 1–4 h). Simultan zur Blutentnahme wurde der Sensor ausgelesen und der Glukosewert auf dem Überwachungsprotokoll des Patienten zum späteren Abgleich mit dem Hexokinasewert notiert. Direkt nach Sensorentfernung wurde die Haut an der Sensorklebestelle auf Veränderungen untersucht.

Alle Untersuchungen und Behandlungen wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes nach Prüfung des Tierversuchsantrages durch den Tierschutzbeauftragten der Tierärztlichen Hochschule Hannover und nach Anzeige beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) (Aktenzeichen 17A 172) durchgeführt. Zudem wurde jeweils vor Anbringung der Sensoren die Erlaubnis des Besitzers eingeholt.

Tiere

Die Studie wurde an Hunden aus dem Patientengut der Klinik für Kleintiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt. Bedingung zur Teilnahme an der Studie war eine Glukose-Imbalance in Form einer Hyper- oder Hypoglykämie. 25 Tiere wiesen einen Diabetes mellitus auf, von denen sich 6 Hunde in einer diabetischen Ketoazidose befanden. Bei 8 Tieren konnte sonografisch eine Pankreatitis diagnostiziert werden und bei 3 Tieren wurde eine Umfangsvermehrung im Bereich des Pankreas detektiert. Nur einer der 26 Hunde war zum Zeitpunkt der Erstvorstellung hypoglykämisch und zeigte sonografisch eine

Umfangsvermehrung im Bereich des Pankreas, so dass der Verdacht auf ein Insulinom bestand, was auf Besitzerwunsch aber nicht näher untersucht wurde.

Die 26 Studienpatienten umfassten neben 6 Mischlingen folgende Rassehunde: 3 West Highland White Terrier, je 2 Havaneser, Jack Russell Terrier und Yorkshire Terrier, sowie je einen Australien Shepherd, Boxer, Cairn Terrier, Deutschen Schäferhund, Golden Retriever, Labrador, Malteser, Mittelschnauzer, Pinscher, Rhodesian Ridgeback und Riesenschnauzer. Davon waren 4 Hunde weiblich-unkastriert, 8 weiblich-kastriert, 4 männlich-unkastriert und 10 männlich-kastriert. Das mediane Alter betrug 10,4 Jahre (5,2–15,6 Jahre; Minimum–Maximum). Die Hunde hatten ein medianes Gewicht von 9,3 kg (2,0–44,5 kg).

Gerätebeschreibung des „FreeStyle Libre“

Die beiden Hauptkomponenten des Glukosemesssystems „FreeStyle Libre“ sind der im Durchmesser ca. 3,5 cm kleine und 0,5 cm hohe Sensor (Sensoreinheit mit feinem Messfilament an der klebenden Unterseite) und das Handlesegerät (Abb. 1, 2). Nach einer Autokalibrierungsphase von einer Stunde ist der Sensor einsatzbereit und kann beliebig oft mit dem Handlesegerät ausgelesen werden (Abb. 3). Ein direkter Tierkontakt ist nur für den Sensor nötig, da das Handlesegerät schon in einem Abstand von 4 cm die Daten des Sensors kabellos empfangen kann. Auf dem Touch Display des Handlesegeräts werden neben dem aktuellen Glukosewert auch Trendpfeile angezeigt. Außerdem können die Glukoseverlaufskurven der letzten Tage eingesehen werden. Der Sensor hat einen Messbereich von 2,2–27,8 mmol/l (40–500 mg/dl) und kann laut Herstellerangaben¹ für den Menschen bis zu 14 Tage belassen werden und muss dann ausgetauscht werden. Mit einem Handlesegerät kann während der Messphase auch nur ein Sensor ausgelesen werden. Eine Parallelüberwachung mehrerer Sensoren benötigt ebenso viele Handlesegeräte wie

¹ Quelle: <https://www.freestylelibre.de/libre/discover/erste-schritte.html> (aufgerufen am 17.09.2020)

Sensoren. Bekommt ein Patient mehrere Sensoren nacheinander, so ist die Überwachung mit nur einem Handlesegerät möglich. Das Handlesegerät funktioniert zusätzlich als eigenständiges Glukometer. Teststreifen sind separat erhältlich.

Die gewonnenen Messdaten können auf dem Sensor selbst für bis zu 8 Stunden gespeichert werden und müssen dann durch einen kabellosen Auslesevorgang auf das Handlesegerät übertragen werden. Sonst beginnt der Sensor die ältesten Werte zu überschreiben und es entstehen Datenlücken. Auf dem Handlesegerät können die Daten für 3 Monate gespeichert werden. Für eine dauerhafte Speicherung ist der Export auf einen Computer mittels vom Hersteller kostenlos bereitgestellter Software notwendig, der somit spätestens nach 3 Monaten erfolgen sollte. Mit der Software können auch weitere Diagramme (detaillierte Tages-, Wochen- und Monatsübersichten) erstellt werden.

Applikation und Handhabung des Sensors

36/40 (90 %) Sensoren wurden an der dorsalen lateralen Thoraxwand appliziert. Hierzu wurde bei den Tieren an der dorsalen Thoraxwand hinter dem Schulterblatt eine ca. 5x5 cm große Hautstelle freirasiert und mit den mitgelieferten Desinfektionstüchern desinfiziert. Ein Hund wies an der vorgesehenen Stelle ein großflächiges Narbengewebe auf, sodass der Bereich zwischen den Schulterblättern gewählt wurde, was aufgrund des guten Ernährungszustandes hier gut möglich war. Bei einem weiteren Hund wurde ein Sensor ebenfalls zwischen den Schulterblättern und zusätzlich im weiteren Verlauf zwei weitere Sensoren (2/40, 5 %) im Bereich der Kniefalte positioniert.

Nach der Rasur und Desinfektion wurde die Sensoreinheit am unsedierten Patienten mit der mitgelieferten Applikationsvorrichtung auf die – wie oben angeführt – vorbereitete Hautstelle aufgebracht und geklebt, wobei gleichzeitig eine Nadel in die Haut einstach und das Messfilament in die Haut leitete (Abb. 4). Beim Abziehen der Applikationseinheit bewährte sich die Fixation der Sensoreinheit am Kleberand mittels Klemme. Analog zur feline Studie (6)

erfolgte auch in der vorliegenden caninen Studie eine Fixierung am Kleberand mittels 8 Einzelheften (Abb. 5), um die Gefahr des unbeabsichtigten vorzeitigen Sensorverlustes zu minimieren.

Der Sensor wurde spätestens alle 8 Stunden ausgelesen, um die gespeicherten Messergebnisse auf das Handlesegerät zu übertragen. Die Sensoren wurden so lange belassen, bis sie selbstständig ihre Funktion einstellten oder aus anderen Gründen vorzeitig entfernt werden mussten. Die Handlesegeräte wurden spätestens am Ende der jeweiligen Monitoringphase durch die zugehörige Software am PC ausgelesen und die Daten dabei übertragen und gespeichert. Die erstellten detaillierten Tagesprotokolle, Tagesdurchschnittsverläufe, Wochen- und Monatsübersichten gaben einen guten Überblick über die Behandlungsverläufe.

Glukose-Referenzmethode

Für die Referenzmessungen wurden die mittels Venenpunktion gewonnenen heparinisierten Blutproben innerhalb von maximal 15 Minuten zentrifugiert und das Plasma in ein unbeschichtetes Kunststoffreaktionsgefäß pipettiert. Bis zur Serienmessung wurden die Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Nach dem Auftauen der Proben im Wasserbad wurde die Glukosekonzentration im Analysenautomaten Cobas c 311 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit der Hexokinase-Methode (KNUST et al., 1984) mittels eines kommerziellen Testkits (Glucose HK Gen.3) unter Verwendung eines humanen Universalstandardplasmas („Calibrator for automated systems“) und täglicher Kontrollen mit humanen Kontrollseren (Precinorm U, Precipath U; alle Reagenzien von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gemessen.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung umfasste 269 Datenpaare innerhalb des Messbereichs des "FreeStyle Libre"-Messsystems (2,2–27,8 mmol/l; 40–500 mg/dl). Es wurden eine lineare Regressionsanalyse und eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Zusätzlich wurden die Medianwerte aus den Beträgen (vorzeichenfreien Werten) der relativen Differenzen zwischen den Ergebnissen der Referenzmethode und denjenigen des CGMS „FreeStyle Libre“ bezogen auf die Referenzmethode sowohl für die Gesamtheit aller Proben als auch für die Untergruppen im hypo- und normoglykämischen ($< 6,7$ mmol/l bzw. < 120 mg/dl) und hyperglykämischen Bereich ($> 6,7$ mmol/l bzw. 120 mg/dl) berechnet. Der hypo- und normoglykämische Bereich wurde aufgrund der geringen Probenzahl zusammengefasst.

Zur Visualisierung und Überprüfung der Kriterien der ISO 15197 wurde ein Differenzdiagramm der absoluten Abweichung der Messwerte von den Referenzmessungen gegen die Werte der Referenzmethode erstellt. Mit Hilfe dieses Plots wurde deutlich, wie viele Werte innerhalb einer Toleranz (gemäß ISO 15197:2013) von $\pm 0,8$ mmol/l (± 15 mg/dl) für Werte $< 5,6$ mmol/l (< 100 mg/dl) bzw. ± 15 % für Werte $\geq 5,6$ mmol/l (≥ 100 mg/dl) lagen. Außerdem wurde die Verteilung der Werte im Parkes-Error-Grid (PARKES et al., 2000) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel.

Ergebnisse

Bei der Sensorapplikation und Fixierung mittels Einzelheften konnte bei 14/40 Sensoren (35 %) eine geringfügige Abwehrreaktion in Form eines Kopfwindens beobachtet werden. 22/40 Sensorapplikationen (55 %) blieben ohne Reaktion. 2 Hunde reagierten aggressiv auf die Applikation von 4 Sensoren. Die heftigen Abwehrreaktionen (Beißversuche und starke Vokalisierung) können nicht nur auf die Sensorapplikation zurückgeführt werden, da diese

beiden Tiere auch im täglichen Umgang starke Aggressionen gegenüber dem Personal zeigten. Veränderungen im Allgemeinbefinden konnten während der Monitoringphase nicht beobachtet werden (Abb. 6).

58 % (23/40) aller Sensoren stellten ihre Messfunktion im Median nach 14 (1,5–14) Tagen selbstständig in angebrachter Lokalisation ein, sodass sie entfernt und gegebenenfalls durch einen neuen Sensor ersetzt werden mussten. 83 % (19/23) dieser Sensoren mit selbstständigem Funktionsverlust erreichten dabei die maximale Messdauer von 14 Tagen, wie sie vom Hersteller für den Menschen angegeben ist. Die restlichen 43 % aller Sensoren (17/40) wurden vorzeitig funktionierend entfernt. 8 von diesen 17 Sensoren wurden durch den Hund selbst entfernt (0,9–9,6 Tage nach Applikation, Median 3,4 Tage). Zu diesen durch den Hund nach kurzer Zeit selbst entfernten Sensoren zählten die 2 Sensoren, die nacheinander versuchsweise in der Kniefalte einer Rhodesian Ridgebackhündin appliziert wurden, nachdem ein erster zwischen den Schulterblättern angebrachter Sensor nach der einstündigen Kalibrierungsphase nur hypoglykämische Werte anzeigte, die nicht mit der Referenzmethode bestätigt werden konnten. Die beiden an der Kniefalte angebrachten Sensoren lieferten (kurzzeitig) korrekte Daten. Die Hündin wurde dann zur weiteren Therapie nach Hause entlassen und erhielt zum weiteren Monitoring ein herkömmliches Glukometer. 4 dieser 8 Sensoren wurden während des stationären Aufenthaltes in einem unbeobachteten Moment entfernt. 2 von 8 Sensoren wurden zu Hause durch den Hund in einem unbeobachteten Moment selbst entfernt. 6 der 17 Sensoren wurden funktionierend nach der Euthanasie (1,8–13,8 Tage nach Applikation, Median: 5,2 Tage) entfernt und 3 aus anderen Gründen. Zu diesen 3 Sensoren zählt auch der Sensor, der dem bereits erwähnten Rhodesian Ridgeback zwischen den Schulterblättern appliziert wurde, aber offensichtlich fehlerhafte Werte lieferte, sodass er nach 2,7 Tagen entfernt wurde.

Die Sensorentfernung erfolgte generell problemlos. Nach dem Lösen der Einzelhefte konnten die Sensoren einfach von der Haut abgezogen werden. Die Hautreaktion konnte bei

78 % (31/40) aller Sensoren beurteilt werden. Dabei waren bei 52 % (16/31) dieser Sensoren an der Klebestelle keine Hautveränderungen erkennbar, bei 42 % (13/31) war eine leichte, transiente Hautrötung (Abb. 7) und bei 6 % (2/31) der Sensoren eine oberflächliche Dermatitis erkennbar. 6 der 9 Sensoren, bei denen die Hautreaktion nicht beurteilt wurde, wurden nach der Euthanasie entfernt. Einer dieser 6 euthanasierten Hunde wurde pathologisch untersucht. Es konnten im Klebebereich des Sensors keine histopathologischen Veränderungen der Haut gefunden werden. In 2 weiteren Fällen konnte die Hautveränderung nicht beurteilt werden, da sich die Hunde die Sensoren zu Hause selbst entfernt hatten. Ein Sensor wurde durch den Haustierarzt entfernt.

20/26 Hunden wiesen während der Monitoringphase Glukosewerte $> 27,8 \text{ mmol/l}$ ($> 500 \text{ mg/dl}$) auf, die vom Lesegerät zusammenfassend als „Hi“ beschrieben wurden. 15/20 Tieren (45 %) zeigten sogar über einen längeren Zeitraum (3–29 Stunden) „Hi-Werte“ an, sodass zusätzliche Kontrollmessungen mit der Referenzmethode (Hexokinasereaktion) notwendig waren, um die Therapie der Tiere anzupassen. Diese Werte konnten in der Datenanalyse nicht berücksichtigt werden.

Zu insgesamt 4 Messzeitpunkten lag bei 2 Hunden die Glukose $< 2,2 \text{ mmol/l}$ ($< 40 \text{ mg/dl}$), was vom Lesegerät als „Lo“ beschrieben wurde. Auch in diesen Fällen wurden Kontrollmessungen mittels Hexokinasereaktion durchgeführt.

Mit der kostenlosen Herstellersoftware konnten verschiedene Grafiken erstellt werden, die den individuellen Glukoseverlauf übersichtlich visualisieren. Sie waren ein wichtiger Baustein für die optimale Therapieanpassung. Zwar reicht der Messbereich des „FreeStyle Libre“ bis zu $27,8 \text{ mmol/l}$ (500 mg/dl), jedoch werden Werte $> 19,4 \text{ mmol/l}$ ($> 350 \text{ mg/dl}$) nicht mehr grafisch dargestellt. Dadurch wurde die Beurteilung der Kurven unter Umständen erschwert, was sich therapeutisch aber nicht auswirkte (Abb. 8).

18 Hunde (69 %) wurden zur weiteren Glukoseüberwachung mit einem funktionierenden Sensor und einem Lesegerät aus der Klinik nach Hause entlassen. Die

Tierhalter berichteten, dass ihnen das einfache Ablesen des Sensors Sicherheit im Umgang mit ihrem diabetischen Hund gäbe, da sie sich jederzeit mit minimalem Aufwand über den Zustand ihres Tieres informieren können. Sensorbedingte Verhaltensänderungen wurden auch im häuslichen Umfeld nicht beobachtet, obwohl einige Hunde einen Schutzbody oder einen Halskragen trugen, um den Sensor zu schützen.

Die mit dem „FreeStyle Libre“ gemessenen Glukosewerte zeigten eine hohe positive Korrelation zu denen der Referenzmethode. Das wurde durch einen Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) von 0,90 ($p < 0,0001$) bestätigt. Die Korrelation war im hypo- und normoglykämischen ($< 6,7 \text{ mmol/l}$ [$< 120 \text{ mg/dl}$], $r_s = 0,21$, $n = 11$) im Vergleich zu hyperglykämischen Werten ($> 6,7 \text{ mmol/l}$ [$> 120 \text{ mg/dl}$], $r_s = 0,89$, $n = 258$) niedriger (Abb. 9).

Die relative Abweichung (vorzeichenfreie Betragswerte) von den Ergebnissen der Referenzmethode für die Gesamtprobenzahl betrug im Median 12,4 %. Im hypo- und normoglykämischen Bereich lag sie bei 19,4 % und im hyperglykämischen Bereich bei 12,2 %.

Insgesamt wichen nur 63,6 % (171/269) der "FreeStyle Libre"-Ergebnisse weniger als $\pm 15 \%$ (für Werte $\geq 5,6 \text{ mmol/l}$ [$\geq 100 \text{ mg/dl}$]) bzw. $\pm 0,8 \text{ mmol/l}$ ($\pm 15 \text{ mg/dl}$) (für Werte $< 5,6 \text{ mmol/l}$ [$< 100 \text{ mg/dl}$]) von den Messergebnissen der Referenzmethode ab. Es befanden sich sogar nur 40 % (4/10) der Werte $< 5,6 \text{ mmol/l}$ ($< 100 \text{ mg/dl}$) innerhalb der Fehler-Toleranz von $\pm 0,8 \text{ mmol/l}$ ($\pm 15 \text{ mg/dl}$) von den Messergebnissen der Referenzmethode (Abb. 10). Insgesamt lagen 99,3 % (267/269) aller gemessenen Werte des „FreeStyle Libre“ in Zone A und B der Parkes Consensus Error Grid Analyse (Abb. 11). Lediglich 0,7 % (2/269) der Werte lagen in Zone C. In Zone D und E lag kein einziges Messergebnis.

Diskussion

Erfreulicherweise zeigten die Hunde bei der Sensorapplikation, wie auch bereits zuvor beschrieben (CORRADINI et al., 2016), nur wenig Abwehrreaktionen, was die klinische Anwendung deutlich erleichterte. Nur 2 Hunde zeigten ein deutliches Abwehrverhalten, welches sie jedoch während des stationären Aufenthaltes im gesamten Umgang zeigten, sodass das gezeigte Abwehrverhalten bei der Sensorapplikation nicht allein dem Sensor zugerechnet werden kann.

Im Gegensatz zu den bisherigen Studien (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020; SILVA et al., 2020), in denen die Sensoren mit einer zusätzlichen Klebefolie und Bandagen fixiert wurden, wurden in dieser Studie die Fixierung durch Einzelhefte gewählt. Aufgrund der feline Pilotstudie (DEITING und MISCHKE, 2019), in der bereits beobachtet wurde, dass die ersten beiden Sensoren durch das nachwachsende Fell ihre Klebeverbindung verloren und sich lösten, wurde angenommen, dass dies auch ein Problem beim Hund darstellen würde. Deshalb erschienen uns weitere klebende Maßnahmen als wenig aussichtsreich und wir starteten direkt mit der Einzelheftfixierung. Von Verbänden sahen wir ebenfalls ab, da die Gefahr des Verrutschens bestand und die Tiere in ihrer Bewegung eingeschränkt worden wären. Zusätzliche Kleberinge und Armbänder schienen nur für den Humangebrauch nützlich zu sein. Die Tiere zeigten bei der Fixierung mit den Einzelheften keine oder nur geringe Abwehrreaktionen, obwohl keine Sedation oder Lokalanästhesie angewendet wurde. Auf die Anwendung von lokal betäubenden Salben oder Sprays wurde verzichtet, weil diese einen negativen Einfluss auf das Gewebe und damit auch auf die Messgenauigkeit hätten haben können. Die Unterspritzung mit Lokalanästhetikum erschien ebenfalls als ungeeignet, da zum einen ebenfalls das Risiko der Gewebeveränderung bestand, zum anderen hätte das Gewebe mit einer deutlich dickeren Kanüle mehrfach durchstoßen werden müssen, wodurch gegebenenfalls sogar größere Schmerzen hätten entstehen

können. Außerdem konnte aufgrund des Einsatzes der Einzelhefte unterstellt werden, dass die beabsichtigte oder auch unbeabsichtigte Sensorentfernung erschwert worden wäre.

Die bisherige Sensorlokalisierung im Nackenbereich (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020; SILVA et al., 2020) erschien für die vorliegende Studie nicht sinnvoll, da die Hunde während des stationären Aufenthaltes zum Schutz des venösen Zugangs dauerhaft einen Halskragen mit Halsband trugen. Dieser hätte den Sensor massiv mechanisch belastet. Zwar haben Sensoren am Thorax die kürzeste Verweildauer, jedoch zeigten die Sensoren hier die besten Korrelationen zur Referenzmethode (KOENIG et al., 2016), sodass wir uns für die Applikation an dorsalen Thoraxwand hinter den Schulterblättern entschieden. Ein Patient zeigte jedoch in diesem Bereich ein großflächiges Narbengewebe, sodass der Verdacht bestand, dass der Sensor in diesem Bereich nicht funktionieren könnte. Wir entschieden uns als Alternative für die Applikation zwischen den Schulterblättern, da der Hund gut genährt war und sich in diesem Bereich viel Gewebe befand. Da dieser Sensor gut korrelierende Werte lieferte, konnte die Lokalisation zunächst als geeignet beschrieben werden. Der Fall der Ridgebackhündin zeigte jedoch, dass sich der Bereich zwischen den Schulterblättern sich auch bei gut genährten Tieren als nicht unbedingt optimal herausstellen kann. Ob es sich bei dem fehlerhaft messenden Sensor zwischen den Schulterblättern um einen Applikationsfehler handelte oder um eine anatomische Abweichung der Haut im Bereich des rassetypischen „Ridge“, konnte nicht geklärt werden. Obwohl die Messwerte übereinstimmten, zeigte sich auch die Kniefalte als Applikationsort ungeeignet, da beide Sensoren durch den Hund selbst entfernt werden konnten. Zusammenfassend kann auch im Bezug zu den früheren Studien (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020; SILVA et al., 2020) festgestellt werden, dass die Wahl des Applikationsortes weitestgehend von praktischen Erwägungen abhängen sollte, da die Lokalisation ohne Einfluss auf die Messgenauigkeit zu sein scheint. Während der Monitoringphase zeigten die Hunde ein

normales Allgemeinverhalten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sie den Sensor nicht als Störfaktor empfanden.

Sowohl in der caninen Pilotstudie (CORRADINI et al., 2016) (7/10 Sensoren, 70 %) als auch in der vorliegenden Studie erreichte erfreulicherweise ein Großteil der Sensoren (19/23, 83 %) funktionierend die maximale Funktionsdauer, obwohl unterschiedliche Lokalisationen und zusätzliche Fixierungen gewählt wurden.

Die gute Hautverträglichkeit des Sensors wird sowohl in 2 der 3 Studien (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020) bereits beschrieben und konnte auch in unserer Studie sowohl klinisch als auch histopathologisch bestätigt werden. So fanden CORRADINI et al. (2016) nach der Sensorentfernung nur bei der Hälfte der Patienten eine vorübergehende leichte Hautrötung im Bereich der Klebefläche des Sensors. Auch bei anderen Spezies wie der Katze (DEITING und MISCHKE, 2019) und dem Menschen (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017) wird lediglich von leichten, transienten Veränderungen berichtet. Bei den euthanasierten Hunden wurde die Hautreaktion nicht beurteilt, da mögliche Hautreaktionen schlechter detektierbar gewesen wären. Lediglich in einer Studie (SILVA et al., 2020) wurde beschrieben, dass bei 2 Sensoren, die 14 Tage am Hund belassen werden konnten, eine starke Kontaktallergie auftrat, jedoch sowohl im Bereich der klebenden Substanz des Sensors als auch unter der zusätzlich angebrachten Folie. Es bleibt also unklar, ob die Kontaktallergie nur durch den Sensor oder nicht auch durch die Folie ausgelöst wurde.

Die obere Messgrenze von 27,8 mmol/l (500 mg/dl) erschwerte die intensivmedizinische Betreuung von extrem hyperglykämischen Patienten, wie es bei Patienten in einer Ketoazidose der Fall ist. Auf der einen Seite bot der „FreeStyle Libre“ optimale Voraussetzungen für diese Situation, da die schnell sinkenden Glukosewerte unter der ALT-Insulin-Dauertropfinfusion ohne großen personellen Aufwand engmaschig überwacht werden konnten. Auf der anderen Seite waren initial trotzdem zusätzliche Blutentnahmen und

Messungen mittels Hexokinasereaktion nötig, bis der Glukosegehalt in den messbaren Bereich den „FreeStyle Libre“ gesunken war.

In der vorliegenden Studie konnte eine gute Messgenauigkeit des „Freestyle Libre“ im Vergleich zur Referenzmethode durch eine sehr gute Korrelation zwischen den Ergebnissen mit $r_s = 0,90$ und eine ebenfalls gute mediane Abweichung von 12,4 % nachgewiesen werden. Ein ähnlicher Korrelationsgrad ($r = 0,94$) wurde in der Pilotstudie (CORRADINI et al., 2016) bei Hunden auf der Grundlage einer etwas größeren Stichprobe ($n = 432$) beobachtet. Auch im Vergleich zu einem Glukometer ergab sich eine gute Korrelation ($r_s = 0,91$; MALERBA et al., 2020 bzw. $r_s = 0,89$; SILVA et al., 2020).

Die Überprüfung der Genauigkeitskriterien nach ISO 15197 wurde sowohl in den 3 bisherigen Studien (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020; SILVA et al., 2020) als auch in der aktuellen Studie mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Es lagen deutlich weniger als 95 % der Ergebnisse des Glukoseüberwachungssystems im Bereich der Referenzmessungen ± 15 % bei Werten $\geq 5,6$ mmol/l (≥ 100 mg/dl). Im Bereich $< 5,6$ mmol/l (< 100 mg/dl) wiesen ebenfalls nur wenige Messungen die geforderte maximale Abweichung von < 15 mg/d auf. In unserer Studie handelte es sich allerdings um eine kleine Probenzahl in diesem Bereich ($n = 10$), sodass unser Ergebnis in diesem Bereich zwar nur eingeschränkt zu beurteilen ist, jedoch die gleiche Tendenz aufweist wie in den Studien mit größerem Stichprobenumfang in diesem Bereich. Dieser Teil der Anforderungen wurde also nicht erfüllt. Umso erfreulicher war es jedoch, dass im Parkes Error Grid nur 0,7 % der Abweichungen in Zone C lagen, also klinisch relevante Therapieänderungen zur Folge hatten. 99,3 % der Abweichen lagen in den unkritischen Zonen A und B und damit sogar über den geforderten mindestens 99 %. Damit war dieser Teil der ISO 15197 erfüllt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch 2 weitere Studien (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020). Lediglich in einer Studie mit einem geringen Patientengut ($n = 6$) wurde dieses Kriterium verfehlt, da lediglich 94,8 % der Abweichungen in Zone A und B lagen (SILVA et al., 2020). Alle Studien

belegen doch die Sicherheit des „FreeStyle Libre“, da keine Abweichungen in den kritischen Zonen D und E liegen. Es bleibt dabei zu berücksichtigen, dass die ISO 15197 für die Kontrolle von Blutzuckermessgrößen entwickelt wurde. Da der „FreeStyle Libre“ jedoch den Glukosegehalt in der interstitiellen Flüssigkeit misst, können die Anforderungen nicht 1:1 übertragen werden. In unserer Studie müssen wir daher berücksichtigen, dass die Diskrepanz zwischen den mit beiden Methoden gemessenen Werten nicht immer einfach auf eine reale Ungenauigkeit des „FreeStyle Libre“ zurückzuführen ist, sondern zumindest teilweise auch eine Folge der Zeitverzögerung für die Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden Kompartimenten sein könnte. Diese Gleichgewichtseinstellung dauert beim Mensch ca. 5–10 Minuten (BASU et al., 2013), bei der Katze ca. 11,4 Minuten und für den Hund wird sie mit < 10 Minuten (REBRIN et al., 1999) angegeben. Schnelle Blutglukoseschwanken, wie sie zum Beispiel zu Beginn der Therapie einer diabetischen Ketoazidose auftreten, können also nicht direkt in der interstitiellen Flüssigkeit nachgewiesen werden, sodass im direkten Vergleich unter Umständen große Differenzen sichtbar werden. In einer aktuellen Studie wurde die Korrelation der Werte zu Beginn der Therapie einer diabetischen Ketoazidose und nach der diabetischen Ketoazidose getrennt beurteilt (MALERBA et al., 2020) und es war erkennbar, dass die Korrelation zum Therapiebeginn geringer war ($r_s = 0,88$) und dass auch die Abweichungen deutlich höher waren als $\pm 0,8 \text{ mmol/l}$ ($\pm 15 \text{ mg/dl}$) bzw. $\pm 15 \%$ (MALERBA et al., 2020). Nach dem Erreichen der stabilen Phase verbesserte sich die Genauigkeit deutlich (MALERBA et al., 2020). Die zeitliche Verzögerung in Kombination mit sich schnell ändernden Blutglukosewerten kann also eine wichtige Ursache dafür sein, dass in unserer Studie der Unterschied zwischen den Messungen mit beiden Methoden häufig den Grenzwert von $\pm 15 \%$ bzw. $\pm 0,8 \text{ mmol/l}$ ($\pm 15 \text{ mg/dl}$) überschritt und deshalb hinsichtlich dieses Kriteriums nicht den Anforderungen der ISO 15197 entsprach. Außerdem kamen auch präanalytische und methodische Störfaktoren als Ursache für die negative Beeinflussung der Genauigkeit der

Referenzmethode in Betracht. Hingegen zeigte sich, dass weder Körpergewicht noch Tragezeit einen Einfluss auf die Messgenauigkeit haben (MALERBA et al., 2020).

Trotz aller bereits erwähnten Limitierungen deutet sich dennoch eine angemessene Zuverlässigkeit und gute Messgenauigkeit der "FreeStyle Libre"-Einzelmessungen an, wobei das Ablesen der Messwerte jederzeit möglich ist und eine kontinuierliche Aufzeichnung die Zuverlässigkeit der Ergebnisse weiter erhöht und die Therapie erleichtert.

Aufgrund der guten Messgenauigkeit wäre weiterhin zu überlegen, ob das CGMS „FreeStyle Libre“ nicht auch als innovative Kontrollmöglichkeit in die „AAHA Diabetes Management Guidelines for Dogs and Cats“ (BEHREND et al., 2018) integriert werden könnte. Hier wird bislang die Anfertigung eines Tagesprofils mittels Blutentnahme alle 2 Stunden empfohlen. Wie bereits erwähnt, ist dieses Vorgehen mit Stress für den Patienten verbunden und es besteht trotzdem die Gefahr, dass der für die Therapie so wichtige Nadir übersehen wird. Daher würde die kontinuierliche Messung sowohl deutlich mehr Informationen bezüglich des Nadirs liefern als auch deutlich weniger Stress für das Tier bedeuten.

Die größte Limitierung dieser Studie ist die geringe Anzahl der eingeschlossenen subnormalen und normalen Proben, sodass die für diesen Bereich getroffenen Aussagen nur eingeschränkt gültig sind. Sie sollten an einer größeren Probenanzahl verifiziert werden. In der Praxis kann das Intervall der Kontrolluntersuchungen mit Blutentnahmen zur Fruktosaminbestimmung deutlich verlängert werden, da die Besitzer die abfotografierten Kurven und Protokolle per E-Mail an die/den behandelnden Tierärztin/Tierarzt schicken können. Aufgrund der Möglichkeit eines plötzlichen Ausfalls bzw. des vorzeitigen Sensorverlusts sollte hierbei immer eine alternative Blutzuckermessmethode, z. B. in Form eines Glukometers, zur Verfügung stehen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es auch bei verschiedenen Glukometern Unterschiede in der Messgenauigkeit gibt (KANG et al., 2016).

Fazit für die Praxis

Durch seine adäquate Messgenauigkeit, die ausgezeichnete Akzeptanz durch die caninen Patienten und die gute Hautverträglichkeit liefert das CGMS „FreeStyle Libre“ gute Voraussetzungen sowohl für die Überwachung von stationären Intensivpatienten als auch für die Überwachung diabetischer Hunde zu Hause durch den Tierbesitzer, da es zudem einfach anzuwenden und verhältnismäßig kostengünstig ist. Da die Abweichung der Messergebnisse von der Referenzmethode im klinisch relevanten hypoglykämischen Bereich größer ist, empfehlen sich hier bei kritischen Patienten ggf. Kontrollmessungen, z. B. mit einem Glukometer.

Interessenkonflikt

Keiner der Autoren hat finanzielle oder persönliche Beziehungen zu Personen oder Organisationen, die geeignet sind, die Inhalte des Artikels zu beeinflussen.

Literatur

1. Bailey T, Bode BW, Christiansen MP et al. The performance and usability of a factory-calibrated flash glucose monitoring system. *Diabetes Technol Ther* 2015; 17: 787–794
2. Basu A, Dube S, Salma M. Time lag of glucose from intravascular to interstitial compartment in humans. *Diabetes* 2013; 60: 4083–4087
3. Behrend E, Holford A, Lathan P, et al. 2018 AAHA Diabetes Management Guidelines for Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 2018; 54: 1–21
4. Blum A. Freestyle Libre Glucose Monitoring System. *Clin Diabetes* 2018; 36: 203–204
5. BSI Standards Publication. In vitro diagnostic test systems – Requirements for blood glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus (ISO 15197:2013. Im Internet: <https://www.iso.org/standard/54976.html>; Stand: 01.09.2020
6. Clarke WL, Cox D, Gonder-Frederick LA et al. Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood glucose. *Diabetes Care* 1987; 10: 622–630
7. Corradini S, Pilosio B, Dondi F et al. Accuracy of a flash glucose monitoring system in diabetic dogs. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 983–988
8. Davison LJ, Slater LA, Herrtage ME et al. Evaluation of a continuous glucose monitoring system in diabetic dogs. *J Small Anim Pract* 2003; 44: 435–442

9. Deiting V, Mischke R. Praktische Anwendung des neuen Glukosemonitoringsystems „Freestyle Libre“ bei der Katze. *Prakt Tierarzt* 2019; 100: 540–550
10. Fokkert MJ, Van Dijk PR, Edens S et al. Performance of the FreeStyle Libre Flash glucose monitoring system in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *BMJ Open Diabetes Research and Care* 2017; 5, e000320
11. Kang MH, Kim DH, Jeong IS et al. Evaluation of four portable blood glucose meters in diabetic and non-diabetic dogs and cats. *Vet Q* 2016; 36: 2–9
12. Knust A, Draeger B, Ziegenhorn J. Metabolites 1: Carbohydrates. In: Bergmeyer HU Hrsg. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. Volume VI. Weinheim: Verlag Chemie; 1984: 163–172
13. Koenig A, Hoenig ME, Jimenez DA. Effect of sensor location in dogs on performance of an interstitial glucose monitor. *Am J Vet Res* 2016; 77, 805–817
14. Reusch C. Erkrankungen des endokrinen Pankreas. In: KOHN B, SCHWARZ G, Hrsg. *Praktikum der Hundeklinik*. 12. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag in Georg Thieme Verlag KG; 2018: 1005–1011
15. Malerba E, Cattani C, Del Baldo F et al. Accuracy of flash glucose monitoring system in dogs with diabetic ketoacidosis. *J Vet Intern Med* 2020; 34: 83–91
16. Moretti S, Tschuor F, Osto M et al. Evaluation of a novel real-time continuous glucose-monitoring system for use in cats. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 120–126

17. Neuvians Tp, Berger M. Diabetes care in cats and dogs. *Diabet Med* 2002; 19: 77–79
18. Parkes JL, Pardo S, Slatin SL et al. A New Consensus Error Grid to Evaluate the Clinical Significance of Inaccuracies in the Measurement of Blood Glucose. *Diabetes Care* 2000; 23: 1143–1148
19. Pfützner A, Klonoff DC, Pardo S et al. Technical aspects of the Parkes error grid. *J Diabetes Sci Technol* 2013; 7: 1275–1281
20. Rebrin K, Steil GM, Van Antwerp WP et al. Subcutaneous glucose predicts plasma glucose independent of insulin: implications for continuous monitoring. *Am J Physiol* 1999; 277: E561–E571
21. Reineke EL, Fletcher DJ, King LG et al. Accuracy of a continuous glucose monitoring system in dogs and cats with a diabetic ketoacidosis. *J Vet Emerg Crit Care* 2010; 20: 303–312
22. Silva DD, Cecci GRM, Biz G et al. Evaluation of a flash glucose monitoring system in dogs with diabetic ketoacidosis. *Domest Anim Endocrinol* 2020; 74, 106525
23. Surman S, Fleeman L. Continuous Glucose Monitoring in Small Animals. *Vet Clin Small Anim* 2013; 43: 381–406

24. U.S. Food and Drug Administration. Freestyle Libre Pro Flash Glucose Monitoring System: summary of safety and effectiveness data (SSED); PMA P160030/S017. Im Internet:
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma.cfm?id=P160030>;
Stand 16.09.2020
25. Wiedmeyer CE, Johnson PJ, Cohn LA et al. Evaluation of a continuous glucose monitoring system for use in veterinary medicine. Diabetes Technol Ther 2005; 7: 885–895

Abbildungen und Legenden



Abb. 1: „Starterpaket“ des Glukosemonitoring-Systems „FreeStyle Libre“ bestehend aus Sensor mit Applikationsvorrichtung, Handlesegerät, USB-Kabel und Ladegerät für die Steckdose (Foto: Abbott Laboratories, mit freundlicher Genehmigung)

Fig. 1: "Starter Kit" of the glucose monitoring system "FreeStyle Libre" consisting of a sensor with application device, handheld reader, USB cable and charger for the socket (Photo: Abbott Laboratories, courtesy of Abbott Laboratories).



Abb. 2: Sensor in der Frontal- und Seitenansicht (Fotos: Abbott Laboratories, mit freundlicher Genehmigung)

Fig. 2: Sensor in front and side view (Photos: Abbott Laboratories, courtesy of Abbott).



Abb. 3: Einfaches Ablesen des aktuellen, vom Sensor in der interstitiellen Flüssigkeit gemessenen Glukosewertes mit dem Handlesegerät

Fig. 3: Simple reading of the current glucose value measured by the sensor in the interstitial fluid with the handheld reader.



Abb. 4: Anbringen des Sensors des Glukosemonitoring-Systems „FreeStyle Libre“ mit der Applikationsvorrichtung

Fig. 4: Attachment of the sensor of the glucose monitoring system "FreeStyle Libre" using the application device.



Abb. 5: Die zusätzliche Fixierung des Sensors mit Einzelheften ist von Vorteil.

Fig. 5: The additional fixation of the sensor with individual stitches is advantageous.



Abb. 6: Der an der Brustwand angebrachte Sensor beeinflusst nicht das Allgemeinverhalten der Hunde.

Fig. 6: The sensor attached to the chest wall does not influence the general behavior of the dogs.



Abb. 7: Bei 13/34 Sensoren blieb nach der Sensorentfernung eine leichte Hautrötung zurück.

Fig. 7: With 13/34 sensors a slight reddening of the skin remained after sensor removal.

Tagesprotokoll

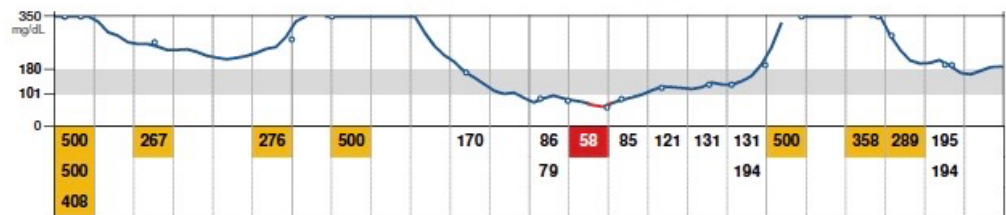
24. April 2018 - 9. Mai 2018 (16 Tage)

FreeStyle Libre 

Mo 30. Apr.

Glukose
mg/dL

Di 1. Mai

Glukose
mg/dL

Mi 2. Mai

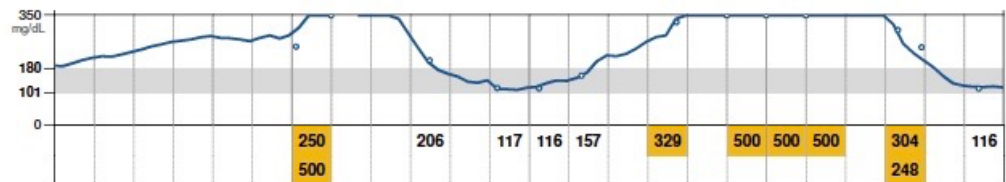
Glukose
mg/dL

Abb. 8: Tagesprofile eines hypoglykämischen Hundes, gemessen mit dem Testsystem „FreeStyle Libre“. Die angegebenen Glukosewerte (in mg/dl) entsprechen Zeitpunkten zu denen eine Ablesung mit dem Lesegerät erfolgte. Gescannte Werte < 70 mg/dl (< 3,9 mmol/l) werden von der Software rot markiert und gescannte Werte > 240 mg/dl (13,3 mmol/l) werden gelb markiert. Werte zwischen 70–240 mg/dl (3,9–13,3 mmol/l) werden nicht farblich hinterlegt. Limitierend ist die grafische Zensur der Werte > 350 mg/dl (>19,4 mmol/l).

Fig. 8: Daily profiles of a hypoglycaemic dog, measured with the "FreeStyle Libre" test system. Specified glucose values (in mg/dl) correspond to time points when the values were read off using the reading device. Scanned values < 70 mg/dl (< 3.9 mmol/l) are highlighted in red by the software and scanned values > 240 mg/dl (13.3 mmol/l) are highlighted in yellow. Values between 70–240 mg/dl (3.9–13.3 mmol/l) are not highlighted. The graphic censorship of values > 350 mg/dl (>19.4 mmol/l) is a limiting factor.

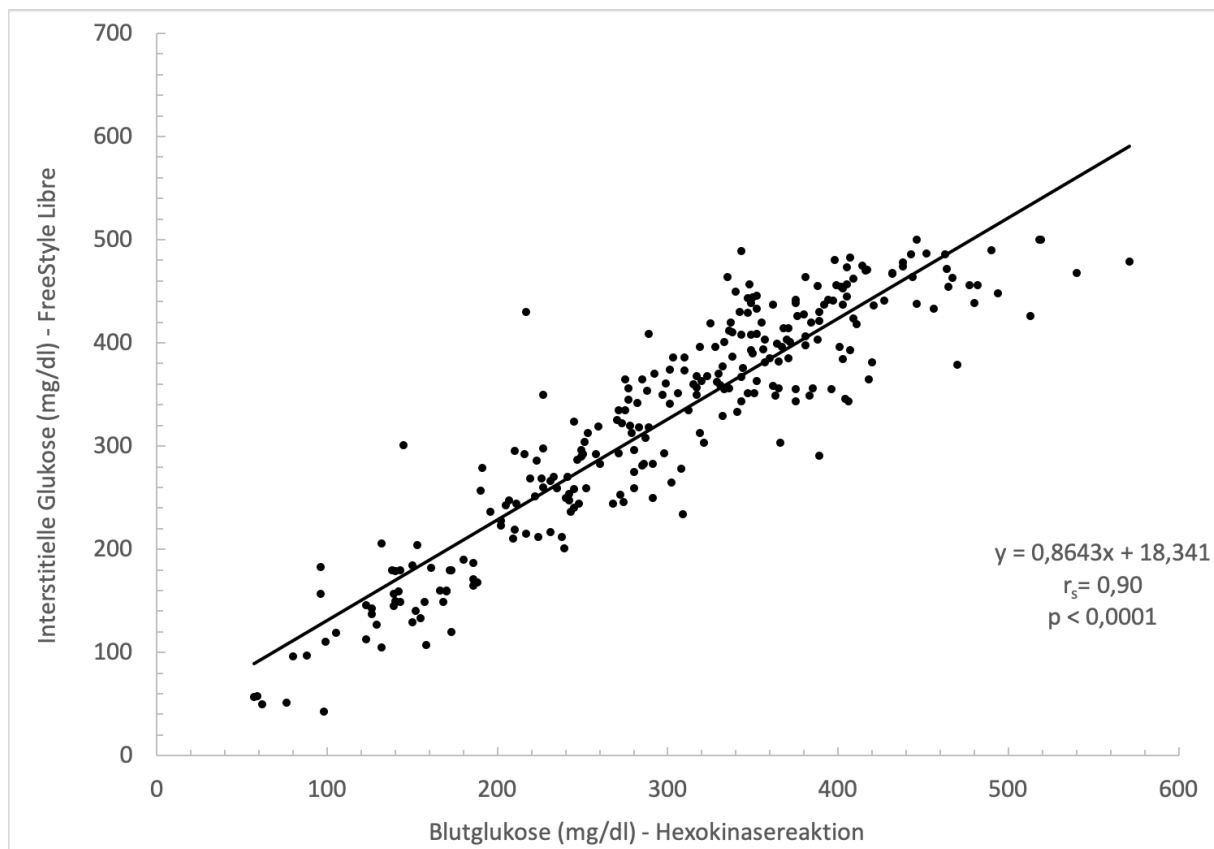


Abb. 9: Beziehung zwischen den mit der Hexokinase-Methode gemessenen Blutglukosekonzentrationen und den interstitiellen Glukosekonzentrationen, die mit dem kontinuierlichen Glukose-Überwachungssystem "FreeStyle Libre" bei 26 diabetischen Hunden (269 Proben mit Parallelmessungen) bestimmt wurden: Ergebnisse der linearen Regression und der Spearman-Rang-Korrelationsanalyse.

Fig. 9: Relationship between blood glucose concentrations measured with the hexokinase method and interstitial glucose concentrations determined with the continuous glucose monitoring system "FreeStyle Libre" in 26 diabetic dogs (269 samples with parallel measurements): Results of linear regression and Spearman rank correlation analysis.

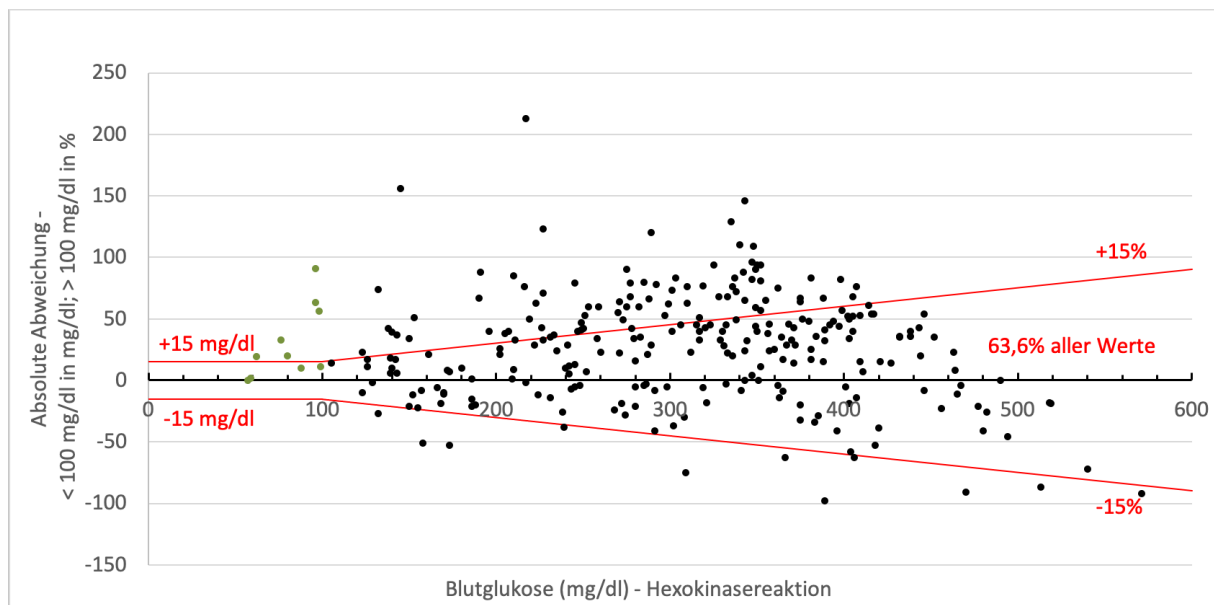


Abb. 10: Differenzdiagramm: Beziehung zwischen den im venösen Blut mit der Referenzmethode (Hexokinase-Methode) gemessenen Glukosekonzentrationen und der absoluten Differenz zwischen den mit dem kontinuierlichen Glukose-Überwachungssystem "FreeStyle Libre" und der Referenzmethode gemessenen Glukosekonzentrationen bei 26 diabetischen Hunden (269 Proben mit gleichzeitiger Messung). Rote Linien zeigen die zulässigen Grenzen der Abweichung von der Norm gemäß ISO 15197 an.

Fig. 10: Difference chart: Relationship between the glucose concentrations measured in venous blood with the reference method (hexokinase method) and the absolute difference between the glucose concentrations measured with the continuous glucose monitoring system "FreeStyle Libre" and the reference method in 26 diabetic dogs (269 samples with simultaneous measurement). Red lines indicate the acceptable limits of deviation from the reference measurements according to ISO 15197.

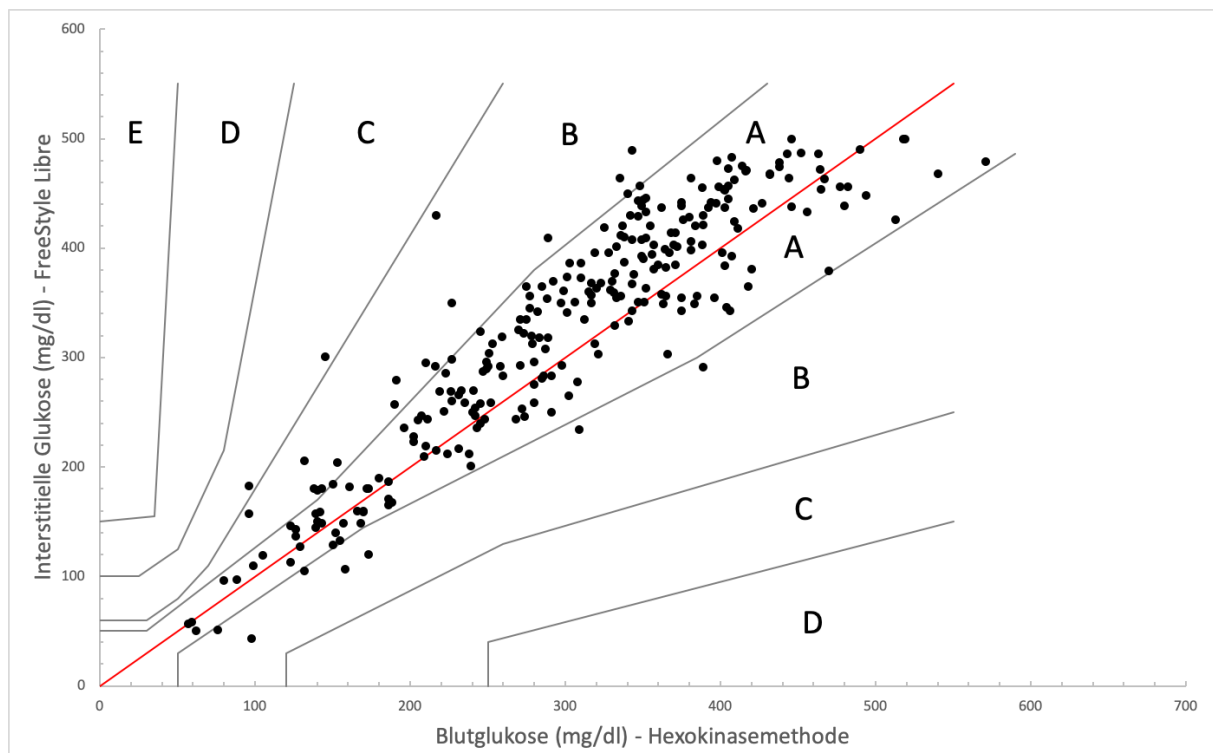


Abb. 11: Parkes Error Grid Analyse für Messungen des Glukose-Überwachungssystems "FreeStyle Libre" im Vergleich mit den Ergebnissen der Referenzmethode (Hexokinase-Methode). 99,3 % der Abweichungen (257/259 Werte) lagen innerhalb der Zonen A und B, 0,7 % (2/259) in Zone C, und keine in den Zonen D und E.

Die verschiedenen Zonen geben das Risiko als Folge des abweichenden Ergebnisses an: A - keine Auswirkung auf die klinische Handlung, B - geänderte klinische Handlung, geringe oder keine Auswirkung auf das Ergebnis, C - geänderte klinische Handlung, die wahrscheinlich das Ergebnis beeinflusst, D - geänderte klinische Handlung, könnte ein erhebliches medizinisches Risiko haben, E - geänderte klinische Handlung, könnte gefährliche Folgen haben.

Fig. 11: Parkes Error Grid analysis for measurements of the glucose monitoring system "FreeStyle Libre" compared to results of the reference method (hexokinase method). 99.3 % of deviations (257/259 values) were within zones A and B, 0.7 % (2/259) in zone C, and none in zones D and E.

The different zones indicate the risk as a consequence of the deviating result: A - no effect on clinical act, B - altered clinical act, little or no effect on outcome, C - altered clinical act, likely to affect outcome, D - altered clinical act, could have a significant medical risk, E - altered clinical act, could have dangerous consequences.

5 Diskussion

Die Sensorapplikation rief sowohl bei der Katze als auch beim Hund nur wenig Abwehrreaktionen hervor, was die praktische Anwendung sehr einfach gestaltete. Nur eine der 34 Katzen (3 %) bzw. zwei der 26 Hunde (8 %) zeigten deutliches Abwehrverhalten, wobei sich diese Tiere auch im täglichen Umgang als abwehrbereit zeigten, sodass von einem nicht durch die Applikation selbst verursachten Verhalten ausgegangen werden kann. Dieses Ergebnis ist umso überraschender, da in der vorliegenden Studie die Sensoren sowohl bei der Katze als auch beim Hund mittels Einzelheften befestigt wurden, in den bisherigen Studien (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020; SILVA et al., 2020) jedoch mit selbstklebenden Folien und Verbänden zusätzlich fixiert wurden. In unserer feline Studie lösten sich die ersten beiden Sensoren vorzeitig durch das nachwachsende Fell, sodass danach die Sensoren mittels Einzelheften fixiert wurden. Wir nahmen an, dass das nachwachsende Fell auch ein Problem beim Hund darstellen würde, sodass direkt alle Sensoren angenäht wurden. Für den Humangebrauch waren zwar zusätzliche Kleberringe und Armbänder verfügbar, die den Sensor in Position halten sollten, doch erschienen uns weitere klebende Maßnahmen nur nützlich für weniger behaarte Spezies wie den Menschen. Für die Fixierung mittels Einzelheften war bei beiden Tierarten weder eine Sedation noch eine Lokalanästhesie notwendig. Letztere hätte sogar kontraindiziert sein können, da zum Beispiel Kältesprays oder Lokalanästhetikum enthaltende Gele einen negativen Einfluss auf das Gewebe und die dortige Messung bzw. die Klebefläche des Sensors hätten haben können. Bei einer Unterspritzung des Bereiches mit einem Lokalanästhetikum hätte die Haut und das

Gewebe mehrfach mit einer größeren Kanüle durchstochen werden müssen, was vermutlich Schmerzen und größeres Unbehagen erzeugt hätte als die Durchstechung der oberen Hautschichten mit einer feinen Nadel. Die zusätzliche Fixierung durch Verbände erschien uns als nicht geeignet, da die Verbände bei der Sensorlokalisation an der dorsalen lateralen Thoraxwand sehr umfangreich ausgefallen wären, was die Bewegungsfreiheit und vermutlich auch das Allgemeinbefinden deutlich eingeschränkt hätte. Durch das Verrutschen hätten weitere Komplikationen folgen können. Zusammenfassend hat sich die neue Fixierungsmethode als sehr geeignet erwiesen.

Im Gegensatz zu den bisherigen Studien (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020; SILVA et al., 2020) erfolgte die Sensorapplikation nicht im Nackenbereich der Tiere, sondern an der lateralen dorsalen Thoraxwand. Diese Stelle wurde für den Hund bereits als geeignet für CGMS beschrieben (KOENIG et al., 2016). Für die Katze eignete sich der Nackenbereich am besten (HAFNER et al., 2013). Die Ergebnisse sind jedoch nicht einfach übertragbar, da die damaligen Untersuchungen mit älteren CGMS durchgeführt wurden. Die Applikation im Nackenbereich war für unsere Zwecke ungeeignet, da die Patienten im Rahmen des klinischen Aufenthaltes zum Schutz des venösen Zugangs stets einen Halskragen tragen mussten, dessen Halsband zu massiven mechanischen Belastungen des Sensors geführt hätte. Die Applikation an der latero-dorsalen Thoraxwand, knapp kaudal des Schulterblattes, erwies sich als deutlich komplikationsloser. Zwei Hunde erhielten abweichend einen Sensor zwischen den Schulterblättern. Ein Sensor zeigte mit der Referenzmethode übereinstimmende Ergebnisse, der andere zeigte stets niedrige Werte an, die nicht mit der Referenzmethode bestätigt werden konnten. Es konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei dem fehlerhaft messenden Sensor um einen Applikationsfehler handelte oder

um eine anatomische Abweichung der Haut im Bereich des rasse-typischen Ridges. Für die Lokalisation zwischen den Schulterblättern war der Ernährungszustand des Tieres von großer Bedeutung. Bei kachektischen Tieren hätte die Gefahr des vorzeitigen Sensorverlusts bestanden, da die Schulterblätter kaum mit Gewebe bedeckt gewesen wären und für den Sensor keine ausreichende Anheftfläche zur Verfügung gestanden hätte. Außerdem erhielt der Rhodesian Ridgeback zwei weitere Sensoren wurden in der Kniefalte, die aber vom Hund selber entfernt wurden, sodass sich die Kniefalte als Applikationsort als ungeeignet erwies. Die Lokalisation zwischen den Schulterblättern ist nur eingeschränkt zu empfehlen.

Auch während der Monitoringphase zeigten die Tiere ein normales Allgemeinverhalten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sie den Sensor nicht als Störfaktor empfanden.

Die maximale Funktionsdauer des Sensors wird vom Hersteller mit 14 Tagen angegeben. Beim Hund zeigten sich ebenfalls sehr lange Tragezeiten von im Median 14 Tagen (1,5–14 Tage). In der caninen Pilotstudie (CORRADINI et al., 2016) erreichten 7/10 (70 %) Sensoren, in der vorliegenden Studie sogar 19/23 (83 %) die maximale Messdauer. Bei der Katze zeigt sich jedoch eine reduzierte Messdauer. Nur 9/46 (20 %) Sensoren bei der Katze erreichten die maximale Messdauer. Mögliche Ursache für die reduzierte Funktionszeit könnte die unterschiedliche Elastizität und Dicke der Katzenhaut sein (SCOTT, 1980), aber auch die unterschiedliche Anatomie im Aufbau des Hautgewebes im Gegensatz zu Hund und Mensch. Vermutlich war das Messfilament größeren Scherkräften ausgesetzt, weil sich die Haut beim Hochheben der Katzen, z.B. für Behandlungen oder Reinigungsarbeiten im Käfig, mehr verschob als beim Hund, was zum vorzeitigen Funktionsverlust führte. Im

Klinikalltag konnten die Tiere durch die Unterbringung in Boxen sehr gut ruhiggehalten werden, doch stellte die Bewegungsfreiheit in der häuslichen Umgebung, wie zum Beispiel das Spiel-, Spring- und Putzverhalten, andere Herausforderungen an den Sensor und seine Lebensdauer. Die reduzierte Messdauer des Sensors bei der Katze sollte in jedem Fall vorher mit dem Patientenbesitzer besprochen werden. Trotz der teilweise reduzierten Messdauer bot der Sensor eine große Unterstützung im klinischen Bereich sowohl bei der Katze als auch beim Hund.

Aus dem positiven Feedback der Katzen- und Hundebesitzer konnte geschlossen werden, dass das CGMS auch als Heimmonitoring einsetzbar war, da es einfach anzuwenden war und den Besitzern ein sicheres Gefühl im Umgang mit ihrem Tier und der Insulinapplikation gab. Das Intervall der Kontrolluntersuchungen mit Blutentnahmen zur Fructosaminbestimmung könnte in Zukunft deutlich verlängert werden, da der Besitzer die abfotografierten Kurven und Protokolle per Email an den behandelnde/n Tierärztin/Tierarzt schicken kann. Aufgrund eines möglichen Funktionsausfalls des Sensors sollte immer eine alternative Blutzuckermessmethode, zum Beispiel in Form eines Glukometers, welches für den Gebrauch bei Katze und Hund zugelassen ist, zur Verfügung stehen.

Bei beiden Tierarten konnte jeweils in nur in zwei Fällen eine oberflächliche Dermatitis nach Sensorentfernung beobachtet werden. Die meisten Katzen und Hunde zeigten keine Hautreaktionen oder lediglich eine leichte transiente Rötung im Klebebereich des Sensors. Bei der Beurteilung der reaktiven Hautveränderungen blieben die euthanasierten Tiere unberücksichtigt, da in diesen Fällen eine mögliche Hautreaktion nach dem Tod schlechter oder gar nicht erkennbar gewesen wäre. Die gute Hautverträglichkeit deutete sich auch anhand von einer histopathologischen

Untersuchung der Sensorklebestelle bei einem euthanasierten Hund an. Die Klebefläche wies, soweit beurteilbar, eine sehr gute Hautverträglichkeit auf.

Die von dem verwendeten Glukosemesssystem vorgegebene obere Messgrenze von 27,8 mmol/l (500 mg/dl) erschwerte die intensivmedizinische Betreuung von extrem hyperglykämischen Patienten. Dies war besonders relevant bei der initialen Behandlung von hyperglykämischen Katzen und Hunden, die sich in einer Ketoazidose befanden. In diesen Fällen musste vermehrt Kontrollmessungen mittels Hexokinasereaktion oder Messungen mit einem Glukometer erfolgen bis der Glukosewert wieder in den messbaren Bereich des „FreeStyle Libre“ gesunken war. Da diese Patienten eine ALT-Insulin-Dauertropfinfusion erhielten, war eine stündliche Kontrolle des Glukosegehalts notwendig, deren Durchführung durch den „FreeStyle Libre“ deutlich erleichtert werden konnte, da der personelle Aufwand und der Stress für das Tier durch das einfache Ablesen der Werte reduziert werden konnte.

Die untere Messgrenze von 2,2 mmol/l (40 mg/dl) wurde nur in wenigen Fällen unterschritten. Da dieser Zustand lebensbedrohlich ist, wurden zügig Glukoseboli intravenös oder oral verabreicht, sodass in diesem kritischen Bereich keine ausreichend große Probenmenge zum Vergleich mit der Hexokinasereaktion gewonnen werden konnte. Eine Ausnahme stellte der bereits erwähnte Fall der Ridgebackhündin dar, deren Sensor dauerhaft niedrige Glukosewerte lieferte, die nicht mit den Kontrollmessungen übereinstimmten.

Es zeigte sich sowohl bei der Katze als auch beim Hund eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen des Messsystems „FreeStyle Libre“ und der Referenzmethode Hexokinasereaktion. In der vorliegenden Studie konnte trotz des abweichenden Sensorapplikationsortes und der veränderten Fixationsmethode eine

ähnliche gute Korrelation wie in den vorausgegangenen caninen Studien (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020; SILVA et al., 2020) ermittelt werden. Es bestätigte sich sowohl bei den Katzen als auch bei den Hunden die bereits beschriebene (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020; SILVA et al., 2020) schlechtere Korrelationen für den hypo- und normoglykämischen Bereich, obwohl in den Vorgängerstudien (CORRADINI et al., 2016; SILVA et al., 2020) größere Probenzahlen in diesem Bereich vorlagen. Die mit dem „FreeStyle Libre“ ermittelten Werte in diesen Bereichen sollten also immer kritisch beurteilt werden.

Diese Messunterschiede können teilweise durch die unterschiedlichen Messmedien entstehen. Während bei der Hexokinasereaktion der Glukosegehalt direkt im Blut bestimmt wird, misst der „FreeStyle libre“ den Glukosegehalt der interstitiellen Flüssigkeit. Der Glukosegehalt der interstitiellen Flüssigkeit passt sich dem des Blutes an, aber es besteht eine gewisse Zeitverzögerung. Für den Menschen beträgt diese Zeitverzögerung ca. 5–10 Minuten (BASU et al., 2013), für die Katze 11,4 Minuten (MORETTI et al., 2010) und für den Hund wird sie mit < 10 Minuten angegeben (REBRIN et al., 1999). Die Abweichungen könnten also vielmehr durch die Zeitverzögerung als durch eine reelle Messungenauigkeit erklärt werden. Auch präanalytische und methodische Faktoren, wie zum Beispiel unterschiedliche Blutentnahmeorte, -volumina und -techniken, können Einfluss auf diese Abweichung haben.

Wie auch in den Vorgängerstudien zum Hund (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020; SILVA et al., 2020) fanden auch wir fast identische Ergebnisse bei Katze und Hund für die Genauigkeitsuntersuchung nach ISO 15197. Obwohl eins der beiden Kriterien der ISO 15197:2013 bei beiden Spezies verfehlt wurde, zeigte die

Verteilung der Abweichungen im Parkes Error Grid, dass keine der Abweichungen zu ernsthaften Fehlentscheidungen in der Therapie der Tiere geführt hätte. Es wäre zu prüfen, ob das CGMS „FreeStyle Libre“ als innovative Kontrollmöglichkeit in die „AAHA Diabetes Management Guidelines for Dogs and Cats“ (BEHREND et al., 2018) aufgenommen werden kann. Bisher wird empfohlen, die Tagesprofile mittels Blutentnahme im Zwei-Stunden-Intervall anzufertigen. Wie bereits erwähnt, ist dieses Vorgehen mit Stress für den Patienten verbunden und es besteht trotzdem die Gefahr, dass der für die Therapie so wichtige Nadir trotzdem übersehen wird. Daher würde die kontinuierliche Messung sowohl deutlich mehr Informationen bezüglich des Nadirs liefern als auch deutlich weniger Stress für das Tier bedeuten. Durch die Etablierung dieser neuen Monitoringroutine würde das Tierwohl verbessert und das Management erleichtert.

Die geringe Probenzahl im hypo- und normoglykämischen Bereich sowohl bei der Katze als auch beim Hund ist ein limitierender Faktor dieser Studie, sodass die Messgenauigkeit in diesen Bereichen eingeschränkt beurteilt werden sollten und mit einer Blutglukosemessung (Glukometer oder Hexokinasereaktion) überprüft werden sollten.

Aufgrund der guten Toleranz sowohl durch Katze und Hund, der einfachen Anwendbarkeit auch durch den Besitzer und die gute Messgenauigkeit bietet das verwendete Glukosemesssystem neben der optimalen Gestaltung des stationären Monitorings eine hervorragende Voraussetzung für das Heimmonitoring und die Anpassung der Insulineinstellung. Insbesondere in der initialen Phase ist die Überwachung der Patienten mit dem „FreeStyle Libre“ von Vorteil, wenn die Glukosewerte im messbaren Bereich des „Freestyle Libre“ liegen. Sollte dies initial

nicht der Fall sein, muss auf Kontrollmessungen im Blut zurückgegriffen werden. Außerdem könnte das Intervall der bis dahin sehr engmaschig notwendigen Kontrolluntersuchungen mit Blutentnahmen zur Glukose- und Fructosaminbestimmung deutlich verlängert werden.

In weiteren Studien sollte die Messgenauigkeit speziell im hypo- und normoglykämischen Bereich an einer größeren Probenmenge sowohl bei der Katze als auch beim Hund näher untersucht werden. Auch sollte das Heimmonitoring mittels „Freesyle Libre“ weiter ausgebaut werden, da der Besitzer die abfotografierten Kurven und Protokolle per Email an die/ den behandelnde/n Tierärztin/ Tierarzt schicken könnte und eventuell notwendige Anpassungen der Insulindosis telefonisch oder per E-Mail abgesprochen werden könnten. Des Weiteren könnte die eingebaute Glukometerfunktion im Handlesegerät des „FreeStyle Libre“ auf seine Messgenauigkeit im Vergleich zur Referenzmethode Hexokinasereaktion überprüft werden. Außerdem könnte überprüft werden, ob die für den Menschen definierten Zonen des Parkes Error Grids auch für Katzen und Hunde gelten oder ob die Zonendefinitionen für die jeweilige Tierart angepasst werden sollten.

Der wissenschaftliche Nachweis, dass der erhöhte Informationsgehalt durch die hochfrequente Glukosemessung tatsächlich zu einem verbesserten Behandlungsergebnis führt, ist noch zu erbringen.

6 Zusammenfassung

Verena Deiting

Praktische Anwendung des Glukosemesssystems „FreeStyle Libre“ bei Katze und Hund

Die kontinuierliche Glukosemessung bietet ein wertvolles Tool zur Überwachung hypo- oder hyperglykämischer Katzen und Hunde. Ziele der Studie waren, das Glukosemesssystem „FreeStyle Libre“ auf die Richtigkeit der Messung und die Akzeptanz und Verträglichkeit bei der Katze und beim Hund zu prüfen.

Im Rahmen der Studie wurden bei 34 Katzen und bei 26 Hunden, jeweils aus medizinischer Indikation, insgesamt 66 bzw. 40 Sensoren appliziert. Es wurde das Tierverhalten bei der Applikation an der dorsalen Thoraxwand einschließlich der Fixierung mittels Einzelheften, dem Tragen und der Entfernung sowie eine eventuelle Hautveränderung an der Klebestelle nach Entfernung des Sensors beurteilt. Zusätzlich wurden den Tieren mehrmals täglich Blutproben für Vergleichsmessungen der Blutglukose mittels Hexokinase-Methode entnommen.

Die Tiere zeigten bei der Applikation keine deutliche Abwehrreaktion, d. h. maximal ein Wenden des Kopfes, obwohl der Sensor nach den ersten beiden feline Patienten mit zusätzlichen Einzelheften fixiert wurde. Bei den Katzen stellten 70 % (46/66) der Sensoren ihre Funktion selbstständig in Position auf dem Tier ein. Diese 46 Sensoren besaßen eine Funktionsdauer von im Median 8,25 (1,6–14) Tagen. Von diesen 46 Sensoren erreichten nur neun (20 %) die maximale Messdauer von 14

Tagen. 27 % (18/66) der Sensoren bei der Katze wurden funktionierend entfernt und zwei Sensoren zeigten keine Funktionstüchtigkeit direkt nach der Kalibrierungsphase.

Beim Hund stellten 58 % (23/40) der Sensoren ihre Funktion in situ selbstständig nach im Median 14 Tagen (1,5–14 Tagen) ein, wobei 83 % (19/23) dieser Sensoren die maximale Messdauer von 14 Tagen erreichten. Die übrigen 17 Sensoren beim Hund wurden aus verschiedenen Gründen vorzeitig funktionierend entfernt.

Die Entfernung der Sensoren erfolgte bei beiden Tierarten ohne Schwierigkeiten. Die Hautreaktionen konnten bei 89 % (59/66) der Sensoren bei der Katze und bei 78 % (31/40) der Sensoren beim Hund beurteilt werden. Nach Entfernung war bei 61 % (36/59, Katze) bzw. 52 % (16/31, Hunde) der Sensoren keine Hautreaktion zu erkennen. Bei 36 % (21/59, Katze) bzw. 42 % (13/31, Hund) war lediglich eine leichte transiente Hautrötung im Bereich der Sensorklebeflächen erkennbar. Eine oberflächliche Dermatitis war bei 3 % (2/59, Katze) bzw. 6 % (2/31, Hund) der Fälle detektierbar. Ein mit angebrachtem Sensor euthanasierter Hund wurde pathologisch untersucht. Es konnten im Klebebereich des Sensors keine histopathologischen Veränderungen der Haut gefunden werden.

Durch die obere Messbereichsgrenze von 27,8 mmol/l (500 mg/dl) wurde bei 21 Katzen und 20 Hunden zu einzelnen Messzeitpunkten nur „HI“ angezeigt, sodass bei elf Katzen und 15 Hunden zusätzliche Referenzmessungen erfolgten. Es bestand bei beiden Tierarten eine hohe Korrelation der „FreeStyle Libre“ Werte zur den mit der Referenzmethode gemessenen (Spearman Rangkorrelationskoeffizient, $r_s = 0,90$). Weniger enge Korrelationen zeigten sich im hypo- und normoglykämischen Bereich sowohl bei der Katze ($< 4,4$ mmol/l [< 80 mg/dl]: $r_s = 0,56$, $n = 10$; $4,4$ – $6,7$ mmol/l [80 – 120 mg/dl]: $r_s = 0,49$, $n = 12$; $> 6,7$ mmol/l [> 120 mg/dl]: $r_s = 0,88$, $n = 337$) als auch

beim Hund ($\leq 6,7$ mmol/l [≤ 120 mg/dl]: $r_s = 0,21$, $n = 11$; $> 6,7$ mmol/l [> 120 mg/dl]: $r_s = 0,89$, $n = 258$).

Die Qualitätskriterien der ISO 15197:2013 für Blutzuckermessgeräte beim Menschen wurden nur zum Teil erfüllt. Außerhalb des dort angegebenen Fehlertoleranzbereiches (maximal $\pm 0,8$ mmol/l [± 15 mg/dl] für Werte $< 5,6$ mmol/l [< 100 mg/dl] bzw. ± 15 % für Werte $\geq 5,6$ mmol/l [≥ 100 mg/dl]) lagen bei der Katze 32,3 % und beim Hund 36,4 % der Abweichungen (Anforderung: < 5 %). Die Verteilungen der Abweichungen im Parkes Error Grid erfüllte jedoch die Vorgaben der ISO 15197:2013. Bei der Katze lagen 99,4 % in den unkritischen Zonen A und B (Vorgabe: mindestens 99 %), beim Hund waren es 99,3 %.

Bei beiden Tierarten limitiert die geringe Zahl an hypo- und normoglykämischen Proben die Beurteilbarkeit der Messgenauigkeit in diesen klinisch wichtigen Bereichen. Ansonsten erwies sich die neue Messmethode als sehr praktikabel, wenig belastend für Katzen und Hunde und die gewonnenen Ergebnisse korrelierten sehr hoch mit denen der Referenzmethode. Obgleich die obere Messbereichsgrenze den Einsatz insbesondere bei kritischen Patienten mit einer diabetischen Ketoazidose und in der initialen Einstellungsphase der Insulintherapie limitiert, bietet das Monitoring mittels des Glukosemesssystems „FreeStyle Libre“ eine durchaus vielversprechende Möglichkeit, das Management von Katzen und Hunden mit Diabetes mellitus bei sehr guter Akzeptanz durch die Besitzer deutlich zu erleichtern und dadurch die Lebensqualität der Kleintierpatienten deutlich zu verbessern.

7 Summary

Verena Deiting

Use of the glucose monitoring system “FreeStyle Libre” in cats and dogs

Continuous glucose monitoring provides a valuable tool for the monitoring of hypo- or hyperglycemic cats and dogs. The objectives of this study were to test the continuous glucose monitoring system "FreeStyle Libre" regarding its accuracy of measurement, acceptance, and tolerability in cats and dogs.

In total, 66 or 40 sensors, respectively, were applied to 34 cats and 26 dogs for medical indications. Animal behaviour during attachment to the dorsal thoracic wall including fixation by means of single skin stitches, wearing and removal as well as possible cutaneous alterations at the adhesive site after removal of the sensor were evaluated. In addition, blood samples were taken from the animals several times per day for comparative measurements of blood glucose using the hexokinase method.

The animals did not show a clear defensive reaction during application, at most a turning of their head, although the sensor was fixed with additional individual stitches after the first two feline patients. In cats, 70 % (46/66) of sensors terminated their function positioned on the animal and without external influence. These 46 sensors had a median functional duration of 8.25 (1.6–14) days. Of these 46 sensors only nine (20 %) reached the maximum functional life of 14 days. 27 % (18/66) of sensors in cats were removed functioning and two sensors did not show any function immediately after the calibration phase.

In dogs, 58 % (23/40) of sensors terminated their function in situ after a median period of 14 days (1.5–14 days). 83 % (19/23) of these sensors reached the maximum functional life of 14 days. The remaining 17 sensors in dogs were prematurely removed for various reasons.

The removal of sensors took place without difficulties in both animal species. Skin reactions after removal of sensors were assessable in 89 % (59/66) of sensors in cats and 78 % (31/40) of sensors in dogs. 61 % (36/59) of sensors in cats and 52 % (16/31) of sensors in dogs did not induce any skin reaction. Only a slight transient erythema in the area of the adhesive surface was visible in 36 % (21/59, cats) and 42 % (13/31, dogs), respectively. Superficial dermatitis was detectable in 3 % (2/59, cat) and 6 % (2/31, dog) of cases. One dog, who was euthanised with attached sensor, was pathologically examined. No histopathological alterations of the skin could be found in the adhesive area of the sensor.

Due to the upper measurement range limit of 27.8 mmol/l (500 mg/dl), only "HI" was displayed at individual measurement points in 21 cats and 20 dogs, so that additional reference measurements were made in eleven cats and 15 dogs. In both species, a high correlation was calculated between the "Freestyle Libre" values and those measured with the reference method (Spearman rank correlation coefficient, $r_s = 0.90$). Less close correlations were found in the hypo- and normoglycaemic range in cats (< 4.4 mmol/l [< 80 mg/dl]: $r_s = 0.56$, $n = 10$; 4.4 – 6.7 mmol/l [80 – 120 mg/dl]: $r_s = 0.49$, $n = 12$; > 6.7 mmol/l [> 120 mg/dl]: $r_s = 0.88$, $n = 337$) as well as in dogs (≤ 6.7 mmol/l [≤ 120 mg/dl]: $r_s = 0.21$, $n = 11$; > 6.7 mmol/l [> 120 mg/dl]: $r_s = 0.89$, $n = 258$). The quality criteria of ISO 15197:2013 for human blood glucose meters were only partially met. Outside of the specified error tolerance range (maximum ± 0.8 mmol/l [$\pm$

15 mg/dl] for values < 5.6 mmol/l [< 100 mg/dl] and $\pm 15\%$ for values ≥ 5.6 mmol/l ≥ 100 mg/dl]) were 32.3 % of the deviations in cats and 36.4 % of those in dogs (requirement: $< 5\%$). However, distributions of deviations in the Parkes Error Grid met the requirements of ISO 15197:2013. 99.4 % of deviations in cats and 99.3 % of deviations in dogs were in the uncritical zones A and B (requirement: $\geq 5\%$).

The low number of hypo- and normoglycemic samples limits the assessability of the measurement accuracy in these clinically relevant areas in both species. Otherwise, the new measuring method proved to be very practicable and less stressful for cats and dogs and gained results were highly correlated with those of the reference method. Although the upper limit of the measuring range limits the use especially in critical patients with diabetic ketoacidosis and in the initial phase of insulin treatment adjustment, monitoring by the glucose monitoring system "FreeStyle Libre" offers a very promising option to significantly facilitate the management of cats and dogs with diabetes mellitus. The device shows very good acceptance by pet owners and can significantly improve small animal patients' quality of life.

8 Literatur

ACKERMANN N, BENCHEKROUN G, BOURNE D, CANEY S, CANNON M, DAMINET S, DAVISON L, DUNNING M, FLEEMAN L, FLEMMING-SMITH E, HERRTAGE M, MOONEY CT, NIESSEN S, PETRIE G, 2018: Diabetes mellitus: Guidance for managing diabetes in practice. Companion Animal 23: 143–151

BAILEY T, BODE BW, CHRISTIANSEN MP, KLAFFL J, ALVA S, 2015: The performance and usability of a factory-calibrated flash glucose monitoring system. Diabetes Technol Ther 17: 787–794

BASU A, DUBE S, SALMA M, 2013: Time lag of glucose from intravascular to interstitial compartment in humans. Diabetes 60: 4083–4087

BEHREND E, HOLFORD A, LATHAN P, RUCINSKY R, SCHULMAN R, 2018: 2018 AAHA Diabetes Management Guidelines for Dogs and Cats. J Am Anim Hosp Assoc 54: 1–21

BLUM A, 2018: Freestyle Libre Glucose Monitoring System. Clin Diabetes 36: 203–204

BSI STANDARDS PUBLICATION, In vitro diagnostic test systems – Requirements for blood glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus (EN ISO 15197:2013); unter <https://www.iso.org/standard/54976.html> (abgerufen am 01.09.2020)

CANEY SM, 2013: Pancreatitis and diabetes in cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract 43: 303-317

CASELLA M, WESS G, HASSIG M, REUSCH CE, 2003: Home monitoring of blood glucose concentration by owners of diabetic dogs. J Small Anim Pract 44: 298–305

CLARKE WL, COX D, GONDER-FREDERICK LA, CARTER W, POHL SL, 1987: Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood glucose. Diabetes Care 10: 622–630

COHEN TA, NELSON RW, KASS PH, CHRISTOPHER MM, FELDMANN EC, 2009: Evaluation of six portable blood glucose meters for measuring blood glucose concentration in dogs. J Am Vet Med Assoc 235: 276–280

CORRADINI S, PILOSIO B, DONDI F, LINARI G, TESTA S, BRUGNOLI F, GIANELLA P, PIETRA M, FRACASSI F, 2016: Accuracy of a flash glucose monitoring system in diabetic dogs. J Vet Intern Med 30: 983–988

CRENSHAW KL, PETERSON ME, HEEB LA, 1996: Serum fructosamine concentration as an index of glycemia in cats with diabetes mellitus and stress hyperglycemia. J Vet Intern Med 10: 360–364

DAVISON LJ, SLATER LA, HERRTAGE ME, CHURCH DB, JUDGE S, RISTIC JME, CATCHPOLE B, 2003: Evaluation of a continuous glucose monitoring system in diabetic dogs. J Small Anim Pract 44: 435–442

DAVISON LJ, 2015: Diabetes mellitus and pancreatitis—cause or effect?. J Small Anim Pract 56: 50–59

DEITING V, MISCHKE R, 2019: Praktische Anwendung des neuen Glukosemonitoringsystems „Freestyle Libre“ bei der Katze. Prakt Tierarzt 100: 540–550

DOMORI A, SUNAHARA A, TATENO M, MIYAMA TS, SETOGUCHI A, ENDO Y, 2014: The clinical utility of two human portable blood glucose meters in canine and feline practice. Vet Clin Pathol 43: 55–62

FOKKERT MJ, VAN DIJK PR, EDENS S, ABBES S, DE JONG D, SLINGERLAND RJ, BLIO HJG, 2017: Performance of the FreeStyle Libre Flash glucose monitoring system in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. BMJ Open Diabetes Research and Care 5: e000320

FRACASSI F, BORETTI FS, SIEBER-RUCKSTUHL NS, REUSCH CE, 2012: Use of insulin glargine in dogs with diabetes mellitus. Vet Rec 170: 52

GINSBERG BH, 2007: The current environment of CGM technologies. J Diabetes Sci Technol 1: 117–121

GOTTLIEB S, RAND J, 2018: Managing feline diabetes: current perspectives. Veterinary Medicine: Research and Reports 9: 33–42

GRAHAM PA, NASH AS, MCKELLAR QA, 1997: Pharmacokinetics of porcine insulin zinc suspension in diabetic dogs. J Small Anim Pract 38: 434–438

HAFNER M, LUTZ TA, REUSCH CE, ZINI E, 2013: Evaluation of sensor sites for continuous glucose monitoring in cats with diabetes mellitus. J Feline Med Surg 15: 117–123

HÄMMERLING R, 2009: Praxis der endokrinologischen Krankheitsbilder bei Hund und Katze, 1. Auflage. Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG; Kap 31 Diabetes mellitus: 163–176

KANG MH, KIM DH, JEONG IS, CJOI GC, PARK HM, 2016: Evaluation of four portable blood glucose meters in diabetic and non-diabetic dogs and cats. Vet Q 36: 2–9

KNUST A, DRAEGER B, ZIEGENHORN J, 1984: Metabolites 1: Carbohydrates. In: Bergmeyer HU (Hrsg.), Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed. Volume VI. Verlag Chemie, Weinheim, 163–172

KOENIG A, HOENIG ME, JIMENEZ DA, 2016: Effect of sensor location in dogs on performance of an interstitial glucose monitor. Am J Vet Res 77: 805–817

KOHN B, SCHWARZ G, 2018: Praktikum der Hundeklinik, 12. Auflage. Enke Verlag in Georg Thieme Verlag KG Stuttgart; Kap 31.5 Erkrankungen des endokrinen Pankreas: 1005–1011

MALERBA E, CATTANI C, DEL BALDO F, CAROTENUTO G, CORRADINI S, GOLINELLI S, DRUDI I, FRACASSI F, 2020: Accuracy of flash glucose monitoring system in dogs with diabetic ketoacidosis. J Vet Intern Med 34: 83–91

MCCANN TM, SIMPSON KE, SHAW DJ, 2007: Feline diabetes mellitus in the UK: the prevalence within an insured cat population and a questionnaire-based putative risk factor analysis. J Feline Med Surg 9: 289–299

MORETTI S, TSCHUOR F, OSTO M, FRANCHINI M, WICHERT B, ACKERMANN M, LUTZ TA, REUSCH CE, ZINI E, 2010: Evaluation of a novel real-time continuous glucose-monitoring system for use in cats. J Vet Intern Med 24: 120–126

NEUVIANS TP, BERGER M, 2002: Diabetes care in cats and dogs. Diabet Med 19: 77–79

PARKES JL, PARDO S, SLATIN SL, GINSBERG BH, 2000: A New Consensus Error Grid to Evaluate the Clinical Significance of Inaccuracies in the Measurement of Blood Glucose. Diabetes Care 23: 1143–1148

PFÜTZNER A, KLONOFF DC, PARDO S, PARKES JL, 2013: Technical aspects of the Parkes error grid. J Diabetes Sci Technol 7: 1275–1281

REBRIN K, STEIL GM, VAN ANTWERP WP, MASTROTOTARO JJ, 1999: Subcutaneous glucose predicts plasma glucose independent of insulin: implications for continuous monitoring. Am J Physiol 277: E561–E571

REINEKE EL, FLETCHER DJ, KING LG, DROBATZ KJ, 2010: Accuracy of a continuous glucose monitoring system in dogs and cats with a diabetic ketoacidosis. J Vet Emerg Crit Care 20: 303–312

REUSCH CE, TSCHUOR F, KLEY S, BORETTI F, SIEBER-RUCKSTUHL N, 2006: Diabetes bei der Katze: Ein Überblick. Schweiz Arch Tierheilk 148: 130–138

SILVA DD, CECCI GRM, BIZ G, CHIARO FN, ZANUTTO MS, 2020: Evaluation of a flash glucose monitoring system in dogs with diabetic ketoacidosis. Domest Anim Endocrinol 74: 106525

ROOMP K, RAND J, 2016: Rebound hyperglycaemia in diabetic cats. J Feline Med Surg 18: 587–596

SCOTT DW, 1980: Feline dermatology 1900–1978: A monograph. J Am Anim Hosp Assoc 16: 331–459

SPARKES AH, CANNON M, CHURCH D, FLEEMAN L, HARVEY A, HOENIG A, PETERSON ME, REUSCH CE, TAYLOR S, ROSENBERG D, 2015: ISFM Consensus Guidelines on the Practical Management of Diabetes Mellitus in Cats. J Feline Med Surg 17: 235–250

SURMAN S, FLEEMAN L, 2013: Continuous Glucose Monitoring in Small Animals. Vet Clin Small Anim 43: 381–406

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017: Freestyle Libre Pro Flash Glucose Monitoring System: summary of safety and effectiveness data (SSED); PMA P160030/S017 unter <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma.cfm?id=P160030> (abgerufen am 16.09.2020)

VAN DE MAELE I, ROGIER N, DAMINET S, 2005: Retrospective study of owners' perception on home monitoring of blood glucose in diabetic dogs and cats. Can Vet J 46: 718–723

WIEDMEYER CE, JOHNSON PJ, COHN LA, MEADOWS RL, KERL ME, TESSMAN RK, PERLIS J, DECLUE AE, 2005: Evaluation of a continuous glucose monitoring system for use in veterinary medicine. *Diabetes Technol Ther* 7: 885–895

ZINI E, MORETTI S, TSCHUOR F, 2009: Evaluation of a new portable glucose meter designed for the use in cats. *Schweiz Arch Tierheilkd* 151: 448–451

9 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Mischke. Vielen Dank für die Unterstützung und Betreuung während der Zeit der Anfertigung der Arbeit. Danke für die lehrreiche Zeit.

Der größte Dank im Zusammenhang mit meiner Dissertation gilt den Patientenbesitzern, die durch die Bereitstellung ihrer Hunde und Katzen diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Danke natürlich auch an das Team des Routinelabors der Klinik für Kleintiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, besonders an Ronja Müller, für die tatkräftige Unterstützung bei den Kontrollmessungen und der Archivierung der Blutproben.

Mama und Papa möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken! Ihr steht immer hinter mir und unterstützt mich in jeder Lebenslage. Zu jeder Zeit habt ihr ein offenes Ohr für Sorgen und Probleme und empfangt mich offenen Armen. Papa, danke, dass du 3 Wochen auf meinem Sofa geschlafen hast, nur um mich vor kleinen und großen Nervenbrüchen zu bewahren. Mama, danke für die vielen Telefonate, die vielen kleinen Motivationspakete und die gute Zusprache.

An dieser Stelle seien auch meine besten Freunde erwähnt, besonders Lena Fels, Anna Frommeyer, Annika Spannhake und Laura Nobis. Die zahlreichen Abende beim

Griechen lieferten stets neue Motivation und Entspannung. Wir haben so viel gelacht, gemeckert und gequatscht- ohne euch hätte ich diese Zeit nur halb so gut überstanden. Laura und Annika konnte ich nicht so häufig sehen, doch durch die zahllosen Telefonate hatte ich nie das Gefühl, räumlich getrennt zu sein. Ich hoffe, unsere Freundschaften werden noch lange anhalten!

Alex, da habe ich es doch noch vor dir mit dem Titel geschafft. Ich hatte wirklich die Befürchtung, meiner kleiner Bruder könnte mich noch überholen. Halte durch und gib nicht auf!

Auch meinen Großeltern und Tata möchte ich danken. Ihr habt immer mitgefiebert, ob „es dieses Jahr wohl was werden wird“ mit dem Titel. So stolz habt ihr meine erste Veröffentlichung euren Freunden gezeigt, obwohl es böhmische Dörfer für euch waren. Aber immerhin waren niedliche Katzenfotos enthalten!