

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Chr. Reiners

Manuelle versus automatisierte Bestimmung von Schilddrüsenantikörpern:

Vergleich des VarELISA mit dem KRYPTOR

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katrin Wagner

aus Schweinfurt

Würzburg, Mai 2010

Referent: Prof. Dr. med. M. Luster

Koreferent: Prof. Dr. med. Chr. Reiners

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:
26. Oktober 2010

Die Promovendin ist Ärztin.

1. Einleitung	1
1.1. Definition und historischer Überblick	1
1.2. Epidemiologie.....	1
1.3. Pathogenese	3
1.3.1. Krankheitsbild	3
1.3.2. Genetische Disposition.....	4
1.3.3. Familiäre Häufung der Chronischen lymphozytären Thyreoiditis (CLT).....	5
1.3.4. Allgemeine Mechanismen der Immunregulation	6
1.3.5. Immunantwort und Apoptose	7
1.4. Antigene und Antikörper	9
1.5. Antikörperbestimmungsmethoden.....	11
1.6. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	11
2. Material und Methodik	13
2.1. Patientenkollektiv	13
2.2. Testkits und Testdurchführung.....	15
2.2.1. Elias-VarELISA (<i>Variable Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>), Pharmacia Diagnostics	15
2.2.2 <i>BRAHMS</i> anti-TPO _n und anti-TG _n KRYPTOR	18
2.3. Qualitätskontrolle	21
2.4. Statistische Methoden.....	21
2.4.1. Darstellung der Ergebnisse beim Vergleich zweier Messverfahren.....	21
2.4.2. Angewandte statistische Methoden der vorliegenden Arbeit.....	24
3. Ergebnisse.....	26
3.1. Intra- und Inter-Assay Varianz bei <i>BRAHMS</i> KRYPTOR.....	26
3.2. Verteilung der Antikörper (TPO-, TG-AK) in den verschiedenen Kollektiven..	28
3.2.1. Normalkollektiv.....	28
3.2.2. Patientenkollektiv CLT	31

3.3. Bland-Altman Auswertung.....	35
3.4. Korrelationsanalyse (Korrelationskoeffizient nach Spearman).....	39
3.5. Kappa Test zur Beurteilung der Übereinstimmung.....	41
3.6. ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristics).....	42
3.7. Kappa Test Auswertung anhand unter 3.6. neu ermittelter Cut-Off Werte.....	45
4. Diskussion	47
5. Zusammenfassung	55
6. Literaturverzeichnis	57

1. Einleitung

1.1. Definition und historischer Überblick

Autoimmunerkrankungen weisen ein breites Spektrum auf, das auf der einen Seite Erkrankungen umfasst, für die Antikörper gegen ein spezifisches Organ charakteristisch sind, während auf der anderen Seite Krankheitsbilder gefunden werden, bei denen Antikörper gegen eine Vielzahl von Geweben gerichtet sind (1). Die häufigste organspezifische Autoimmunerkrankung ist die Autoimmunthyreoiditis (AIT) (2;3).

Die Begriffe Struma lymphomatosa, Chronische lymphozytäre Thyreoiditis (CLT) und Hashimoto-Thyreoiditis (HT) sowie deren Kombinationen werden oft synonym verwendet; bisher hat sich keine eindeutige Terminologie durchsetzen können (4).

Im weiteren Verlauf soll der Terminus CLT verwendet werden, der sowohl die hypertrophe (klassische) als auch die atrophische Verlaufsform umfasst.

Die Erstbeschreibung dieser Erkrankung geht zurück auf das Jahr 1912, als Hashimoto von einer lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse, die mit einer Struma einhergeht, berichtete (5).

Der Nachweis von Antikörpern (AK) gegen zelluläre Bestandteile der Schilddrüse gelang erstmals im Jahre 1956, als AK gegen Thyreoglobulin (TG) nachgewiesen werden konnten (6). Dadurch wurde der autoimmune Charakter dieser Erkrankung erstmals evident. Nur wenige Jahre später konnte ein weiteres Antigen dargestellt werden, das nach seiner Lokalisation als mikrosomales Antigen bezeichnet wurde (7). Im Jahre 1964 folgte schließlich der Nachweis von AK, die gegen das mikrosomale Antigen gerichtet sind (8), das erst weitere 22 Jahre später als Thyreoperoxidase (TPO) identifiziert wurde (9).

1.2. Epidemiologie

Das Verhältnis der Prävalenz der CLT beträgt 8-9:1 bei Frauen gegenüber Männern (10). Schätzungen über Prävalenz und Inzidenz der CLT variieren entsprechend der zugrunde liegenden Definition der Erkrankung und der diagnostischen Methoden (11).

Viele große Studien bestätigten den Nutzen der AK-Messung, um eine spätere autoimmun-bedingte Hypothyreose rechtzeitig zu erkennen (12).

Eine große epidemiologische Untersuchung, die sog. Whickham-Studie, berichtete, dass bei mindestens 10% der britischen Bevölkerung erhöhte TG- und/oder TPO-AK nachweisbar sind (2). Sie zeigte außerdem unter Frauen eine Prävalenz der manifesten Hypothyreose von 1,4%-1,9%, verglichen mit weniger als 0,1% bei Männern. (13).

Andere große Studien zeigten etwas höhere Werte (4%-5%) hinsichtlich der Prävalenz einer Hypothyreose. Allerdings waren diese Studien begrenzt auf ältere Bevölkerungsgruppen (14;15), bei denen die Erkrankung generell häufiger zu beobachten ist.

In einer jüngeren Studie, die Patienten mit streng festgelegten Kriterien für die Diagnosestellung HT einschloss, wurde von einer Prävalenz von 0,7% berichtet, wobei die Inzidenzrate 22 neue Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr betrug (16). Diese relativ geringe Zahl zeigt deutlich auf, dass die Definition der Erkrankung einschließlich der verwendeten diagnostischen Maßnahmen epidemiologische Studien beeinflussen kann (11).

Bei Einschluss der Patienten mit erhöhtem TSH-(Thyroidea-stimulierendes Hormon)Wert (>6 mU/ml) zeigte sich in der Whickham-Studie eine Zunahme der Prävalenz der HT auf 7,5% bei Frauen sowie auf 2,8% bei Männern (13). Die Studie zeigte außerdem einen deutlichen altersabhängigen Trend, da die meisten Fälle in der fünften bis siebten Lebensdekade auftraten.

20 Jahre später, als die Patienten erneut untersucht wurden, betrug die Odds Ratio (OR) eine manifeste Hypothyreose zu entwickeln bei nur erhöhtem TSH-Wert bei Frauen 8, bei Männern 44; bei lediglich erhöhten Antikörpern betrug sie bei Frauen 8, bei Männern 25; bei erhöhtem TSH und gleichzeitig positiven AK war die OR bei Frauen 38 und bei den Männern 173 (12;17).

Bei einer amerikanischen Studie, die 82 Frauen mit latenter Hypothyreose über 9,2 Jahre prospektiv untersuchte, entwickelten 59% der Patientinnen mit positiven TPO-AK eine manifeste Hypothyreose verglichen mit 23% mit negativen TPO-AK (18). Diese Zahlen sind vergleichbar mit denen der Whickham-Studie (12); so zeigen auch die Ergebnisse der recht aktuellen Colorado Thyroid Disease Prevalence Study, die mehr als 25000 Einwohner untersuchte, einen ähnlichen Befund. Bei 9,5% der

Gesamtbevölkerung wurden als Folge einer AIT erhöhte ($>5\text{mU/l}$) und bei 2,2% erniedrigte TSH-Werte dedektiert (19).

Weiterhin demonstrierten Autopsie-Studien die Relevanz subklinischer autoimmuner Erkrankung der Schilddrüse (11). Eine fokale Form der Thyreoiditis mit lymphozytären Infiltrationen wurde bei 40% der post mortem untersuchten Frauen gefunden, die in ihrer Vergangenheit keine SD-Erkrankung aufgewiesen hatten (20). Die Zahlen variieren wiederum je nach Definition der Krankheit (21). Die fokale Thyreoiditis ist ein altersabhängiges Phänomen mit einem Gipfel um die sechste Lebensdekade. In einer weit zurückliegenden Studie aus dem Jahr 1967 zeigten fast alle Patienten mit fokaler Thyreoiditis antithyreoidale AK (22). Die fokale Thyreoiditis kann als das pathologische Korrelat erhöhter Serum-AK bei euthyreoten Patienten gesehen werden; die prognostische Relevanz dieser Erkrankung ist weiterhin unbekannt (11).

Die Prävalenz erhöhter SD-AK variiert zudem je nach Rasse und ethnischem Hintergrund (10). So wurden in der dritten 'U.S. National Health and Nutrition Examination Survey' hohe SD-AK-Konzentrationen bei 14,3% der weißen, 10,9% der mexikanischen und nur bei 5,3% der schwarzen Bevölkerung gefunden (10).

1.3. Pathogenese

1.3.1. Krankheitsbild

Die AIT und Autoimmunerkrankungen im Allgemeinen sind gekennzeichnet durch den Verlust der während der Entwicklung erworbenen Toleranz gegen körpereigene Antigene. Die im Laufe der Erkrankung auftretenden AK sind somit Folge der Krankheit und nicht deren Auslöser (2). Die CLT ist ein multifaktorielles Geschehen basierend auf genetischer Prädisposition und verschiedenen Umweltfaktoren, wie hochdosierte Iodzufuhr, virale Infektionen, Sexualhormonveränderungen (z.B. nach Gravidität und in der Perimenopause), Stress oder bestimmte das Immunsystem beeinflussende Medikamente wie Interferone und Interleukin-2 (2;3;10;23;24). Ein Zusammenspiel aus genetischen und endogenen Faktoren sowie aus Umweltbedingungen ist ursächlich für die Initiation, Progression und den klinischen Verlauf der Erkrankung (3).

Das klinische Bild der CLT bei Erwachsenen beginnt meistens mit dem einer primären Hypothyreose; diese entwickelt sich langsam und zeigt sich vor allem bei älteren Patienten oligosymptomatisch und uncharakteristisch. Die Patienten zeigen typischerweise eine schmerzlose Struma mit Symptomen einer Hypothyreose wie Obstipation, Antriebsschwäche, Kälteempfindlichkeit und psychomotorische Trägheit. In manchen Fällen tritt initial eine vorübergehende Hyperthyreose als Korrelat eines massiven Zellzerfalls auf (2). Oft verbessert sich das klinische Bild der CLT spontan und normalisiert sich sogar in einigen Fällen. Die CLT ist eine in Schüben verlaufende Erkrankung, was offensichtlich in Zusammenhang mit den zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen steht (2).

1.3.2. Genetische Disposition

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten drei Gene und mehrere Genregionen identifiziert werden, die mit der Entwicklung einer CLT assoziiert und/oder verknüpft sind (23). Alle bisher erkannten Gene sind entweder das Immunsystem regulierende (HLA, CTLA-4) oder SD-spezifische Gene (TG) (23). Höchstwahrscheinlich interagieren diese Loci untereinander und so könnte durch deren Wechselwirkung der Phänotyp und Schweregrad der CLT beeinflusst werden (24).

Die MHC (major histocompatibility complex) Region kodiert die **HLA** (human leucocyte antigen) Glykoproteine und besteht aus einem Genkomplex, der auf Chromosom 6p21 lokalisiert ist (25). Eine Verknüpfung zwischen der klassischen Variante der CLT und HLA-DR5 (Relative Risk = 3,1) und der atrophischen Form und HLA-DR3 (RR = 5,1) konnte bisher festgestellt werden (24). Vor einigen Jahren wurde außerdem von einer Assoziation zwischen CLT und HLA-DR4 berichtet (23). Die meisten 'linkage studies' bei AIT waren bisher negativ (23;24). Daher geht man davon aus, dass HLA Gene nicht die Hauptgene, sondern eher modulierende Gene bei der Pathogenese (PG) der CLT sind (24).

Das zweite immunregulierende Gen ist **CTLA-4** auf Chromosom 2q33. So wurde gezeigt, dass das CTLA-4 Gen mit der TG-AK Produktion assoziiert ist (23;24). Da die Entwicklung von TG-AK oftmals das präklinische Stadium der AIT präsentiert, könnte CTLA-4 die Entwicklung der AIT unspezifisch beeinflussen (24). Ausserdem beinhaltet dieses Gen einen Alanin/Threonin (G/A) Polymorphismus, der mit der AIT verknüpft ist. Es konnte gezeigt werden, dass das Alanin (G) Allel sowohl mit Morbus Basedow

(MB) als auch mit CLT mit einem relativen Risiko von 2,0 verknüpft ist (26). Das G-Allel des CTLA-4 A/G₄₉ SNP (single nucleotide polymorphism) reduziert den suppressiven Effekt von CTLA-4 auf die T-Zell Aktivierung (27). Die Verbindung von CTLA-4 quer durch Bevölkerungen verschiedener Ethnizitäten spricht für eine Hauptrolle dieses Gens bei CLT.

Das SD-spezifische Gen TG, lokalisiert auf Chromosom 8q24 ist mit AIT im allgemeinen und der CLT im speziellen verknüpft (23;24;28). Dies wurde in zwei unabhängigen Studien bestätigt (28). Nachfolgende Analysen zeigten eine Assoziation zwischen Markern innerhalb des Gens und AIT (28). Außerdem waren single nucleotide Polymorphismen (SNPs) im TG-Gen sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen mit AIT assoziiert (28). Auch hier sprechen bevölkerungsübergreifende Verbindungen zwischen dem Gen und der Erkrankung für eine Hauptrolle von TG bei der PG der CLT (24).

1.3.3. Familiäre Häufung der Chronischen lymphozytären Thyreoiditis (CLT)

Seitdem die CLT erstmals als unabhängige Erkrankung erkannt und SD-AK detektiert worden waren, erschienen Berichte über Familien mit gehäuften Auftreten einer CLT (29;30).

In den 60er Jahren zeigten Hall und Stanbury, dass 33% der Geschwister von Patienten mit CLT oder Morbus Basedow (MB) selbst eine AIT entwickelten (31). Zusätzlich fanden sie bei 56% der Geschwister von AIT-Patienten SD-AK (TG-AK) (31). Die 'Sibling Risk Ratio' beschreibt die Prävalenz einer Krankheit bei Geschwistern von erkrankten Patienten verglichen mit der Prävalenz der Krankheit in der allgemeinen Bevölkerung; sie ist eine Möglichkeit, die Vererbbarkeit einer Krankheit einzuschätzen und ist bei Werten >5 als signifikant zu bewerten (32). Bei AIT wurde von Werten zwischen 5,9 (33) und >10 berichtet, was auf einen starken genetischen Einfluss bei der Pathogenese der AIT schließen lässt.

In Dänemark wurden verschiedene große Zwillingsstudien durchgeführt, die bei AIT unter monozygoten Zwillingen (MZ) eine höhere Übereinstimmung zeigten als unter dizygoten Zwillingen (DZ). Bei CLT lag die Konkordanzrate (KR) bei MZ bei 55%, bei DZ bei 0% (34). Bei diesen Zahlen muss jedoch berücksichtigt werden, dass DZ

aufgrund der somatischen Rekombination, die T- und B-Zellen während der Entwicklung unterlaufen, kein identisches Immunrepertoire besitzen (3).

In einer jüngeren englischen Studie betrug die Konkordanzrate für TG-AK 59% bei MZ im Verhältnis zu 23% bei DZ (35). Bei TPO-AK belief sie sich auf 47% zu 29% bei MZ im Vergleich zu DZ (35). Manche Studien sprechen bei der Vererbung der SD-AK von einem Modus, der den Mendel'schen Gesetzen folgt, andere beziehen sich auf eine dominante Vererblichkeit, wobei ein gemischtes Model nicht ausgeschlossen werden kann (36).

1.3.4. Allgemeine Mechanismen der Immunregulation

Die antigenen Moleküle, die von MHC-Molekülen (major histocompatibility complex) auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ) präsentiert werden, werden von T-Lymphozyten erkannt. Zur Aktivierung der T-Lymphozyten durch deren Interaktion mit APZ sind zwei bestimmte Signale notwendig. Das eine Signal wird vermittelt vom T-Zell-Rezeptor (TZR), der an sein Antigen bindet, was Spezifität sicherstellt. Das zusätzliche Signal stammt von Molekülen auf der Zelloberfläche von APZ (3). Von den bekannten kostimulierenden Signalen scheint die Familie der Proteine namens B7 die wichtigste zu sein (37). Von den B7-Proteinen induziert und kostimuliert B7·1 (CD80) die Th1-Zell Produktion, während B7·2 (CD70) die Th2-Zell Produktion stimuliert (38-40). B7·1 und B7·2 interagieren mit ihrem Rezeptor CD28 und CTLA-4 (cytolytic T lymphocyte associated antigen-4) (41;42). Die Interaktion zwischen B7·1 und B7·2 mit dem Molekül CD28 führt zu einem positivem Signal und aktiviert die T-Lymphozyten. Das auf den aktivierten T-Lymphozyten exprimierte CTLA-4 konkurriert mit CD28 um die kostimulierenden Rezeptoren B7·1 und B7·2 (3). Die Bindung zwischen dem Molekül B7 und CTLA-4 führt zu einer negativen Regulation der T-Lymphozyten und induziert Toleranz. (10;23;43). An der T-Zell Aktivierung sind zudem weitere Faktoren beteiligt, wie ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule 1) und LFA-1 (lymphocyte functional antigen 1) (10). Inwieweit diese am Autoimmunprozess beteiligt sind, bleibt weiter zu klären.

1.3.5. Immunantwort und Apoptose

Die Immunantwort der CLT ist sowohl zellulärer als auch humoraler Art und führt zur Infiltration der Schilddrüse mit T- und B-Lymphozyten, die mit Antigenen (AG) der Schilddrüse interagieren, zur Produktion von antithyreoidalen Antikörpern und zu klinischen Manifestationen (v.a. Hypothyreose) (24).

Die Pathogenese der CLT verläuft in mehreren Schritten (3):

Die autoimmune Reaktion wird initiiert durch eine große Zahl an APZ, die in die Schilddrüse eindringen (44). Die Akkumulation der APZ wiederum ist wahrscheinlich Folge inflammatorischer Signale vermittelt von Toxinen, Viren, bakteriellen Infektionen oder einem Iodexzess (3). In dieser frühen Phase präsentieren die APZ den T-Helferzellen die AG in den drainierenden Lymphknoten der SD, später erfolgt dieser Prozess in der SD selber.

In einem nächsten Schritt interagieren die Lymphozyten mit den präsentierten Antigenen. In dieser Phase kommt die periphere Immuntoleranz und deren Regulation von kostimulierenden Molekülen zum Tragen (3). Zwei kürzlich identifizierte Liganden-Rezeptoren sind solche kostimulierende Proteine, die eine kritische Rolle bei der Regulation der peripheren Immuntoleranz und Autoimmunität zu spielen scheinen (3): ein positiv regulierender Korezeptor namens ICOS (inducible co-stimulator) bindet an B7RP-1 und führt zu einem positivem Signal (45;46), wohingegen der negativ regulierende Korezeptor PD-1 (programmed death-1) an seine Liganden PD-L1 und PD-L2 bindet (47;48). Bei einem Verlust der Immuntoleranz durch oben angeführte Prozesse werden antigenspezifische T-Lymphozyten aktiviert. Diese wiederum stimulieren durch die Produktion verschiedener Zytokine die zelluläre und humorale Immunantwort (3). Bezüglich der zellulären Antwort geht man bei CLT von einem Überwiegen der Th1-Lymphozyten aus (49-52).

Die Thyreozyten können hierbei selber als APZ agieren und MHC II Moleküle exprimieren, die für die Präsentation an CD4+ T-Lymphozyten erforderlich sind (53;54). Die Expression der MHC II Moleküle ist wahrscheinlich die Folge der Zytokin-Produktion (IFN- γ) von infiltrierenden T-Lymphozyten (55). Battifora et al. (39) fanden heraus, dass B7-1 (CD80) bei CLT-Patienten häufig auf Follikelzellen der SD exprimiert wird. Eine Interaktion zwischen B7-1 und CD28, das von der Vielzahl an infiltrierenden T-Lymphozyten exprimiert wird, könnte zur Induktion autoreaktiver T-Lymphozyten führen. Außerdem könnten die SD-Zellen bei der Expression

chemotaktischer Zytokine und somit in der Rekrutierung von Immunzellen involviert sein (56). In kultivierten SD-Zellen induzierten Zytokine (IL-1 α und IFN- γ) diese Rekrutierung (57).

Die Aufrechterhaltung des Immunprozesses erfolgt durch Restimulation der T-Lymphozyten von den auf den Thyreozyten exprimierten MHC II Molekülen (3).

In der letzten Phase akkumulieren eine Vielzahl an generierten autoreaktiven B- und T-Lymphozyten und infiltrieren das Schilddrüsenparenchym (3).

Im letzten Stadium der Pathogenese scheint die *Apoptose* die Hauptrolle zu spielen (57;58). Diese wird wahrscheinlich durch eindringende zytotoxische Immunzellen (CD8+-T-Zellen) getriggert (3). Bei der CLT scheint eine gesteigerte Apoptose der vorherrschende Mechanismus der Zellzerstörung zu sein (59).

Spezielle Signale wie Liganden, die an death-Rezeptoren binden oder ein geringeres Angebot an Wachstumshormonen oder trophischen Hormonen könnten den Apoptosemechanismus aktivieren (3). Bezüglich des Apoptosemechanismus bei CLT bestehen verschiedene Auffassungen (3). Die vorherrschende Sicht ist, dass die Fas-vermittelte Zellzerstörung der Thyreozyten von zytotoxischen T-Lymphozyten, die FasL und Bcl-2 exprimieren, induziert wird (59-62). Nach neueren Erkenntnissen wird der Fas-Weg, der von den Thyreozyten normalerweise gehemmt wird, von einer bestimmten Zusammensetzung proinflammatorischer Zytokine induziert, die von den lokal infiltrierenden Lymphozyten gebildet werden (63;64). Die vorherrschenden Zytokine hierbei sind IFN- γ , TNF- α , IL-1 β (3):

Eine alternative Hypothese beschreibt eine gleichzeitige Expression von Fas und FasL auf Thyreozyten und die Tatsache, dass Thyreozyten über diesen Mechanismus untereinander Verbindungen eingehen, was die Apoptose zur Folge hat (62;63). Über diese Möglichkeit besteht jedoch Uneinigkeit, da normalerweise Fas (CD95) und nicht FasL auf Thyreozyten exprimiert wird (65;66). Weiterhin zu klären bleibt die Bedeutung der löslichen Varianten von Fas und FasL, die bei CLT eine Rolle zu spielen scheinen (3). Ebenso an der PG beteiligt ist das antiapoptotische Protein Bcl-2, das in den Thyreozyten von CLT-Patienten herunterreguliert ist und somit ein proapoptotisches Signal liefert (62;67).

Jüngste Beobachtungen zeigen dass andere Ligandenpaare an der Apoptose beteiligt sein könnten: aktivierte Immunzellen könnten durch Freisetzung von TNF- α und IL-1 β die Thyreozyten für eine TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)-vermittelte

Apoptose sensibilisieren (3). TRAIL induziert Apoptose durch Bindung an seine Liganden TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) über einen Kaspase-abhängigen Weg (3).

Eine weitere Rolle im Zelluntergang neben der Apoptose könnten exozytotische Granula, die Perforin und Granzym B enthalten, und die Komplementaktivierung spielen (68;69). Die Komplementaktivierung spielt wahrscheinlich keine direkte Rolle bei der Zellzerstörung, könnte jedoch zur Aufrechterhaltung und Verschlimmerung der CLT beitragen (70). Letztendlich könnte der Verlust intrazellulärer Kommunikation zur Zellzerstörung beitragen (3).

1.4. Antigene und Antikörper

Die drei schilddrüsenpezifischen Hauptantigene, gegen die sich die Autoantikörper richten, sind: Schilddrüsenperoxidase (TPO), Thyreoglobulin (TG) und der TSH-Rezeptor (TSH-R). Bei der AIT erscheinen zudem weitere Autoantikörper beteiligt, solche die gegen den Natrium-Iodid-Symporter, gegen SD Hormone oder gegen ein zweites Kolloid (neben TG) gerichtet sind. Diese AK sind jedoch weitaus weniger gut untersucht und kommen seltener vor (12).

Die **Schilddrüsenperoxidase (Thyroid Peroxidase = TPO)** ist ein 105 kDa schweres, membranständiges Protein der apikalen Zellmembran der Schilddrüsenzelle (12). Dieses Enzym spielt eine Schlüsselrolle bei der Schilddrüsenhormonsynthese, indem es sowohl die Iodierung der Tyrosylreste des TG (12) als auch die Kopplung zweier Dityrosinreste im TG-Molekül unter Bildung von Thyroxin katalysiert (71). Die TPO setzt sich aus einem großen extrazellulären, einem transmembranären und einem intrazellulärem Anteil zusammen (72). Die Mehrheit der TPO-AK bindet an die die Zellmembran überragenden Epitope in zwei extrazellulären Domänen (12), wobei die Bindung auf Seiten der AK zum größten Teil von den Kappa-Leichtketten eingegangen wird (90% der Sequenzen) (12;73). Aufgrund der geringen Entfernung zwischen den beiden Epitopen können die TPO-AK Komplement binden (12).

Thyreoglobulin (TG) ist ein großes globuläres Glykoprotein (660kDa), das aus zwei identischen, über Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten besteht (12;73;74). Das

TG Protein hat 4-8 hormonbildende Bereiche, an denen Tyrosylreste iodiert und miteinander gekoppelt werden, um die SD Hormone zu bilden. TG wird im Schilddrüsenfollikel gespeichert und per Endozytose aufgenommen, wenn die SD stimuliert wird; die nachfolgende Hydrolyse in Lysozymen führt zur Freisetzung von gespeichertem Thyroxin (T4) und Trijodthyronin (T3) und deren Abgabe in die Blutbahn (12). Der Iodierungsstatus des TG bestimmt seine Antigenität (12). Gegen TG gerichtete AK sind gegen eine Vielzahl von Epitopen gerichtet, von denen zwei die wichtigsten sind (75). Diese Epitope können aufgrund ihrer weiten Entfernung voneinander kein Komplement binden (12).

TG- und TPO-AK gehören überwiegend der Immunglobulin (Ig) Klasse G an, vor allem der Klasse IgG1; einige verteilen sich auf die Klasse IgG2, wenige auf IgG3 und sehr wenige gehören der Klasse IgG4 an, hierunter fallen vorwiegend die TG-AK (74). Die Messung beider Autoantikörper im Serum korreliert mit der Präsenz einer lymphozytären Infiltration der SD, die von fokaler Thyreoiditis bis zur lymphomatösen Struma bei CLT reicht (12). Nachweisverfahren wie Hämagglutination oder ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay) zeigen, dass ungefähr 10% der Frauen (und 1-2% der Männer) TPO-AK positiv sind (12). Es ergaben sich höhere Werte (20-40%) für die Prävalenz einer lymphozytären Thyreoiditis bei Frauen, deren Befunde durch Feinnadelbiopsie oder Autopsie erhoben wurden (12). Sensitive Methoden für die TPO-AK Messung zeigen bei Frauen eine Prävalenz von 20%, sogar in Gebieten mit grenzwertig geringer Iodzufuhr, die als protektiver Faktor für die Entwicklung einer AIT gesehen wird (76).

Der Ultraschallbefund bei lymphozytärer Thyreoiditis zeigt eine distinktiv echoarme Reflexstruktur (12). In einer Kohortenstudie aus dem Jahr 2002 (77), die an 451 Personen mit vorher unbekanntem Status der SD durchgeführt wurde, konnte eine enge Korrelation zwischen diesem Marker der AIT und dem Vorhandensein von TPO-AK gefunden werden: eine ausgeprägte Echoarmut der SD zeigte 96% Sensitivität und eine mäßige Echoarmut zeigte 84% Sensitivität für die Koexistenz von TPO-AK (77). TPO- und TG-AK-Erhöhen treten sehr häufig gemeinsam auf: 99% der TG-AK positiven Seren sind auch TPO-AK positiv (73). Das Gegenteil trifft jedoch nicht zu: etwa 65% der TPO-AK positiven Seren sind TG-AK negativ (73). Diese Tatsache hat zu der Einschätzung geführt, dass die Messung der TG-AK keinen eigenständigen Platz bei der

Diagnose der AIT einnimmt (78). Andere Studien, die isoliert TG-AK positive Seren mittels ELISA untersuchten, zeigten, dass eine TG-AK-Positivität bei 20% der Patienten mit AIT mit einem größerem SD Volumen, mit dem Vorhandensein kleiner Knoten und seltenerem Auftreten einer Hypothyreose assoziiert ist (12). Diese Unterschiede hängen in großem Ausmaß von der verwendeten Methode ab (12). Eine wichtige Indikation für die Messung der TG-AK ist jedoch, deren Interferenz mit der TG-Bestimmung auszuschließen: TG-AK werden bei bis zu 20% der Patienten mit SD Karzinom gefunden und können die Interpretation des TG-Spiegels beeinträchtigen, der ein wichtiger Marker in der Nachsorge im Hinblick auf Rezidive oder Metastasierung ist (12).

1.5. Antikörperbestimmungsmethoden

Frühere Techniken zur Antikörperbestimmung beinhalteten die Methoden der Präzipitation und Diffusion bei TG-AK und den Komplexfixationstest für mikrosomale AK (73). Diese Verfahren bereiteten den Weg für den Nachweis mittels Immunfluoreszenz und passive (indirekte) Hämagglutination-Hemmtests. Diese Tests waren jedoch lediglich semiquantitativ und für die individuelle Auswertung und Interpretation eingeschränkt tauglich. In der Routineanwendung werden nun Immunoassays benutzt, die als Antigene gereinigtes TG oder rekombinante TPO einsetzen. Zu der neueren Gruppe dieser Methoden gehören IRMA (immunoradiometrischer Assay), RIA (Radioimmunoassay) und ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay); sie sind meist günstiger als deren Vorgänger und gewährleisten eine höhere Sensitivität und Spezifität. Außerdem wurde durch die Entwicklung antigen-behafteter Mikropartikel der Zugang zu vollautomatisierten Assaymethoden ermöglicht (73).

1.6. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In dieser Studie sollen zwei Immunoassays zur Bestimmung von TG- und TPO-Antikörpern hinsichtlich diagnostischer Trennschärfe sowie klinischer Relevanz in der Diagnostik autoimmun bedingter Schilddrüsenerkrankungen wie Hashimoto-Thyreoiditis untersucht werden.

Verglichen wurden der an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg für die Routinediagnostik manuell durchgeführte VarELISA TG und TPO Antibodies Assay, PHARMACIA Diagnostics mit dem automatisierten BRAHMS anti-TGn bzw. anti-TPOn KRYPTOR Assay.

2. Material und Methodik

2.1. Patientenkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden zwei Gruppen erfasst. Hierunter fiel ein Kollektiv mit der Diagnose CLT (n=203) und das sogenannte Normalkollektiv, das 205 Probanden umfasste. Insgesamt wurden die bei -20°C tiefgefrorenen Seren von 408 Patienten bzw. Probanden analysiert, die sich im Zeitraum von 2002 bis 2005 in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg zu einer SD-Untersuchung vorgestellt hatten.

Die diagnostischen Kriterien zur Diagnosestellung CLT ergaben sich aus dem Zusammenspiel von klinischem Befund, Ultraschalluntersuchung und Antikörpertiter.

Die Seren des Normalkollektivs entstammten Seren der Papillon-Studie; diese Studie wurde im Jahr 2004 bundesweit an 96278 schilddrüsengesunden Personen durchgeführt. Dazu wurden derzeit sowohl der Schilddrüsenbefund sonographisch als auch die Hormone freies Thyroxin (fT3), freies Trijodthyronin (fT4) sowie der basale TSH-Wert laborchemisch bestimmt. Als Einschlusskriterien für die Stichprobe aus der Papillon-Studie galten zudem das Nichtvorhandensein von schilddrüsenpezifischer Medikation sowie ein SD-Volumen im Normbereich. Bei den 205 Probanden, deren Seren untersucht wurden, handelte es sich um Mitarbeiter der Universität Würzburg.

Für das Patientenkollektiv mit der Diagnose CLT wurden aus den Patientenakten die Parameter fT4 bzw. fT3, der basale TSH-Wert, das sonographisch ermittelte Schilddrüsenesamtvolumen, die schilddrüsenpezifische Medikation, die Stoffwechsellage und die schilddrüsenpezifischen Antikörper gegen Schilddrüsen-Peroxidase und Thyreoglobulin (TPO-AK, TG-AK), ermittelt mit dem als Routinetest verwendeten VarELISA, zusammengestellt.

Des Weiteren wurden diese Listen durch Geburtsdatum, Untersuchungsdatum, Alter und Geschlecht der Patienten ergänzt.

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Übersicht über das Untersuchungsgut und die Gruppencharakteristika.

Tabelle 1: Übersicht über das Untersuchungsgut

Patientengruppe	Anzahl n	weiblich	männlich	Alter in Jahren (Median, Range)
CLT	203	183	20	47 (9-81)
Normalkollektiv	205	103	102	39 (9-69)

Tabelle 2: Verschiedene Variablen der CLT-Patienten

Variablen	
fT4 [pmol/l] (Median; Variationsbreite)	18,9 (5,4-57,0)
fT3 [pmol/l] (Median; Variationsbreite)	4,8 (2,3-9,2)
TSH [mU/l] (Median; Variationsbreite)	1,3 (0,01-87,0)
Schilddrüsengesamtvolumen [ml] (Median; Variationsbreite)	50,5 (0-87,0)
Stoffwechsellage:	
·Euthyreose	142
·Latente Hypothyreose	26
·Hypothyreose	3
·Latente Hyperthyreose	22
·Hyperthyreose	10
SD-spezifische Medikation:	
·ja	136
·nein	66
·keine Aussage	1

Folgende Normwerte liegen den Untersuchungen zu Grunde:

- fT4: 11,0 – 23,0 pmol/l
- fT3: 2,7 - 7,6 pmol/l
- TSH: 0,3 - 4,0 mU/ml
- SD-Volumen: m < 25ml, w < 18ml

Als manifeste Hyperthyreose definierten wir einen erniedrigten TSH-Wert und erhöhte fT3- bzw. fT4-Werte. Für die manifeste Hypothyreose galten analog die umgekehrten Bedingungen (erhöhtes TSH, erniedrigtes fT3- bzw. fT4-Werte). Latente Hyper- bzw. Hypothyreosen waren durch ausschließliche erniedrigte beziehungsweise erhöhte TSH-Werte charakterisiert.

Die Messung der peripheren SD-Hormone erfolgte im Vorfeld auf der Plattform Immulite 2000 der Firma Siemens. Dabei handelt es sich um einen immunoluminometrischen Assay zur quantitativen Bestimmung von fT3 und fT4 im Serum.

2.2. Testkits und Testdurchführung

2.2.1. Elias-VarELISA (*Variable Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), Pharmacia Diagnostics

Testprinzip:

Die VarELISA TG und TPO Antikörper Assays sind indirekte, nicht-kompetitive Enzym-Immunoassays zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von TG- und TPO-AK im Plasma oder Serum. Sie realisieren das Prinzip des "Heterogenen Solid Phase Enzymimmunoassays im Mikrotiterplattensystem". Die Kavitäten sind mit Antigenen beschichtet und führen nach der Bindung der TG- bzw. TPO-AK im Serum durch einen zweiten Antikörper als Enzymkonjugat zur Ausbildung eines indirekt enzymmarkierten Antigen-Antikörper-Komplexes. Die enzymmarkierten Antigen-Antikörper-Komplexe setzten ein zugegebenes Substrat zu einer gefärbten Lösung um. Die Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der im Komplex gebundenen Enzymkonjugatmenge und damit zu der gesuchten TG- bzw. TPO-AK-Konzentration proportional. Im VarELISA TPO-AK-Assay wird als antigene Festphase rekombinante humane TPO verwendet, die eukaryotisch hergestellt wurde. Laut Angaben des Herstellers ist das eingesetzte TPO-Antigen aufgrund der gentechnologischen Gewinnung absolut frei von möglicherweise kontaminierendem Thyreoglobulin. Analog dazu wird im TG-AK-Assay als Festphase humanes TG verwendet.

Assay-Charakteristika:

TG-AK:

Kalibrierung:	Die Kalibrierung der VarELISA TG Antibodies Assays erfolgte gegen die erste internationale Referenzpräparation für humanes Anti-Thyreoglobulin-Serum mit dem Code 65/93.
Normbereich:	<100 U/ml
Analytische Sensitivität:	Die untere Nachweisgrenze liegt bei 3 U/ml.
Analytische Spezifität:	Der Assay weist gegen das Antigen gerichtete IgG-AK nach.
Assaypräzision:	Diese ergibt sich aus der Auswertung der Messung dreier Seren in vier verschiedenen Assays mit jeweils 26 Replikaten.

Tabelle 3: VarELISA; Intra- und Interassay VK bei TG-AK (Angaben des Herstellers)

Probe	Mittelwert (U/ml)	Varianz (VK %)	
		Intrassay	Interassay
1	72,1	11,1	11,8
2	286,8	5,5	7,3
3	2779,8	6,2	7,8

TPO-AK:

Kalibrierung:	Die Kalibrierung der VarELISA TPO Antibodies Assays erfolgte gegen die internationale WHO Referenzpräparation NIBSC 66/378.
Normbereich:	<100 U/ml
Analytische Sensitivität:	Die untere Nachweisgrenze liegt bei 1 U/ml.
Analytische Spezifität:	Der Assay weist gegen das Antigen gerichtete IgG-AK nach.
Assaypräzision:	Diese erfolgte analog zum TG-AK Assay mit drei Seren in fünf verschiedenen Assays mit jeweils 26 Replikaten.

Tabelle 4: VarELISA; Intra- und Interassay VK bei TPO-AK (Angaben des Herstellers)

Probe	Mittelwert (U/ml)	Varianz (VK %)	
		Intrassay	Interassay
1	34,8	11,1	11,8
2	276,5	5,5	7,3
3	2779,8	6,2	7,8

Testprotokoll:

Je 100µl Patientenserum, Standards und Kontrollen wurden in die Kavitäten pipettiert. Nach 30 minütiger Inkubationszeit wurden die Reagenzien aus den Kavitäten entfernt und dreimal „gewaschen“.

Nach Zugabe von je 100µl Konjugat und weiterer 30 minütiger Inkubation wurden nun die Reagenzien entfernt und die Kavitäten erneut dreimal gewaschen. Daraufhin wurden je 100µl Enzymsubstrat pipettiert und für zehn Minuten an lichtgeschützter Stelle inkubiert.

Als letzter Schritt folgte die Zugabe von 50µl Stoplösung, die in gleicher Reihenfolge wie das Enzymsubstrat pipettiert wurde. Nach dem "Abstoppen" der Mikrotiterplatten wurden diese leicht geschüttelt und innerhalb von 30 Minuten mit einem Photometer bei 450nm als Doppelbestimmung gemessen.

Hinsichtlich der Testauswertung musste bei jeder Testdurchführung eine neue Standardkurve erstellt werden. Diese ergab sich aus der Interpolation aus den Messpunkten, die sich aus den optische-Dichte-/optische-Dichte-max-Werten (in %) und dem Logarithmus der TG- bzw. TPO-AK-Standardkonzentrationen (in U/ml) ableiteten.

Die Berechnung der Konzentrationen der Patientenproben erfolgte anschließend anhand der gemessenen optischen Dichten.

Die reine Arbeitszeit für die Testung von 32 Seren betrug 100 Minuten, wobei weitere 100 Minuten Inkubationszeit hinzukamen; insgesamt betrug somit der **Zeitaufwand** für die Testung von 32 Seren 200 Minuten.

2.2.2 BRAHMS anti-TPO_n und anti-TG_n KRYPTOR

Testprinzip:

BRAHMS KRYPTOR ist ein automatisierter Immunofluoreszenzassay für TPO- und TG-AK im Serum oder Plasma. Das zu messenden Ag bindet hierbei zwei Antikörper, die jeweils mit einem speziellen Molekül, entweder einem Donator (Europium-Kryptat)- oder einem Akzeptormolekül (XL665) verbunden sind. Zwischen den eng miteinander verbundenen Molekülen kann es zum Energieaustausch kommen, wenn diese entsprechend durch einen Laser mit der Wellenlänge 337nm angeregt wurden. Sind Donator und Akzeptor in einem Ag-AK-Komplex miteinander verbunden, übernimmt der Akzeptor den größten Teil der Energie und sendet diese als Licht der Wellenlänge 665nm in Form eines langlebigen Fluoreszenzsignals aus.

Ist der Donator ungebunden, emittiert er nach Anregung ein langlebiges Fluoreszenzsignal bei 620nm. Ein ungebundener Akzeptor sendet dagegen ein kurzlebige Signal bei 665nm aus. Durch eine zeitverzögerte Erfassung der Signale und deren spektralen Selektion, das heißt durch simultane Messung bei 620 und 665nm, kann somit zwischen freien und gebundenen Molekülen unterschieden werden. Dieses Prinzip wird von BRAHMS als TRACE-Technologie bezeichnet (Time Resolved Amplified Cryptate Emission).

Die in der Assayprobe vorhandenen Autoantikörper konkurrieren mit den markierten Antikörpern um die Bindungsstelle der TPO bzw. des TG. Die Intensität des Signals ist umgekehrt proportional zur Menge der jeweiligen Autoantikörper.

Für den anti-TPO_n KRYPTOR wird enzymatisch aktive, native TPO verwendet, die indirekt mit einem monoklonalen AK markiert ist, der für den Erhalt der TPO in ihrer nativen Struktur zuständig ist. Dieser AK ist wiederum mit XL665 markiert.

Für den anti-TG_n KRYPTOR werden native humane polyklonale Antikörper verwendet, die mit den AK aus der Serumprobe kompetitieren. Zudem wird humanes TG verwendet, das mit dem Kryptat markiert ist, während der AK mit XL665 markiert ist.

Assay-Charakterisika:

TG-AK:

- Kalibrierung:** Bezogen auf den internationalen NiBSC-Standard 65/93 werden 1000 U/ml der Referenzpräparation des NiBSC-Standard als 160 U/ml im KRYPTOR gefunden.
- Normbereich:** ≤ 60 U/ml
- Messbereich:** Der direkte Messbereich reicht von 0 bis 850 U/ml. Proben mit Konzentrationen > 850 U/ml und ≤ 20000 U/ml werden automatisch verdünnt.
- Analytische Sensitivität:** 10 U/ml
- Funktionelle Sensitivität (20% Inter-Assay-VK):** 25 U/ml
- Analytische Spezifität:** Die eingesetzten AK zeigen keine Kreuzreaktivität mit anti-TPO Autantikörpern (bis 1000 U/ml) und mit TG (bis zu 150 ng/ml).
- Assaypräzision:** Diese wurde anhand dreier Proben unterschiedlicher Konzentrationen ermittelt.

Tabelle 5: KRYPTOR; Intra-Assay VK bei TG-AK (Angaben des Herstellers)

Probe	Mittelwert (U/ml)	Intra-Assay (n=30) VK (%)
1	12,1	26,3
2	55,4	6,4
3	502	2,0

Tabelle 6: KRYPTOR; Inter-Assay VK bei TG-AK (Angaben des Herstellers)

Probe	Mittelwert (U/ml)	Inter-Assay (n=12) VK (%)
1	41,6	12,7
2	69,3	9,1
3	517	1,8

TPO-AK:

Kalibrierung:	Bezogen auf den internationalen Standard 66/387 werden 500 U/ml der Referenzpräparation des NIBSC-Standard 66/387 als 2518 U/ml im KRYPTOR gefunden.
Normbereich:	≤ 60 U/ml
Messbereich:	Der direkte Messbereich reicht von 0 bis 2000 U/ml. Über dieser Konzentration und bis zu 20000 U/ml werden die Proben automatisch verdünnt.
Analytische Sensitivität:	10 U/ml
Funktionelle Sensitivität (20% Inter-Assay-VK):	28 U/ml
Analytische Spezifität:	Die eingesetzten AK zeigen keine Kreuzreaktivität mit anti-TG Autoantikörpern (bis 1735 U/ml).
Assaypräzision:	Sie wurde analog zu TG-AK anhand von drei Proben unterschiedlicher Konzentration ermittelt.

Tabelle 7: KRYPTOR; Intra-Assay VK bei TPO-AK (Angaben des Herstellers)

Probe	Mittelwert (U/ml)	Intra-Assay (n=30) VK (%)
1	52,5	4,4
2	195	5,7
3	1477	1,5

Tabelle 8: KRYPTOR; Inter-Assay VK bei TPO-AK (Angaben des Herstellers)

Probe	Mittelwert (U/ml)	Inter-Assay (n=30) VK (%)
1	44,8	14
2	202	5,5
3	910	7,6

Der **Zeitaufwand** für die Testung von 32 Patientenseren Seren betrug insgesamt 175 Minuten; diese Zeitspanne setzte sich zusammen aus 100 Minuten reiner Arbeitszeit und 75 Minuten Inkubationszeit.

2.3. Qualitätskontrolle

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Messungen auf dem Laborsystem KRYPTOR wurde die Intraassay- und Interassay-Varianz, also die Streuung mehrerer Messwerte der gleichen Probe im gleichen bzw. in verschiedenen Ansätzen, bestimmt.

Dabei wurde der Intraassay-Variationskoeffizient bzw. Interassay-Variationskoeffizient aus der 10-fach-Bestimmung bzw. aus der 10-maligen Messwiederholung aus Patientenseren mit vier verschiedenen Konzentrationen (sehr niedrig, d.h. ca. 30 U/ml; niedrig, d.h. ca. 60 U/ml; mittel, d.h. ca. 300 U/ml; hoch, d.h. ca. 1500 U/ml für anti-TPO, ca. 600 U/ml für anti-TG) berechnet.

2.4. Statistische Methoden

2.4.1. Darstellung der Ergebnisse beim Vergleich zweier Messverfahren

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Ergebnisse in Messverfahren-vergleichenden Studien darzustellen. Hierzu können folgende Analysen angewendet werden:

- Korrelations- und Regressionsanalysen
- Varianzanalytische Methoden
- Kappa Test nach Cohen
- Bland-Altman-Plots
- ROC-Analyse

Korrelations- und Regressionsanalysen

In dieser Analyse wird ein Scatterplot (Streu- oder Korrelationsdiagramm) erstellt und nachfolgend eine Korrelations- und Regressionsanalyse durchgeführt. Die Abszisse des Korrelationsdiagramms stellt die Ergebnisse der einen Methode dar, während auf der Ordinate die der anderen Methode aufgetragen werden. Durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten kann man die Übereinstimmung der zu vergleichenden Messverfahren aufzeigen, das heißt man prüft, ob ein linearer stochastischer

Zusammenhang zwischen x und y besteht. Theoretisch angenommen, alle Punkte lägen auf der Winkelhalbierenden ($x=y$), so würden beide Verfahren genau übereinstimmen und der Korrelationskoeffizient wäre 1. In der Praxis ist dies infolge von Messfehlern so gut wie nicht möglich und somit werden Korrelationskoeffizienten ab 0,8 im allgemeinen als befriedigend bewertet; bei Vergleichen von Labormessverfahren werden jedoch Werte $>0,9$ angestrebt. Die Regressionsanalyse prüft den Zusammenhang zwischen x und y und außerdem, inwieweit man die Variable y aus der Variablen x schätzen kann. Wenn beide Variablen mit Fehlern behaftet sind, so muss man bestimmen, welche Variable die abhängige und welche die unabhängige ist. Wenn diese Entscheidung nicht getroffen werden kann, tritt das Problem der linearen Strukturgleichungen auf. Im Allgemeinen setzt dieses Verfahren eine Normalverteilung der voneinander unabhängigen Variablen voraus.

Varianzanalytische Methoden

Diese Verfahren vergleichen Wertepaare mit Hilfe der Varianz zwischen den Messwerten. Am häufigsten wird der Intraklassen-Korrelationskoeffizient angewandt; dazu sollten die Werte normalverteilt sein. Die Intraklassenkorrelation ist ein Maß der Beobachtungsübereinstimmung und damit ein Indikator der Reliabilität des zu untersuchenden Systems.

Kappa Test nach Cohen

Dieser Test ist ein Maß für die Interrater-Reliabilität, also ein Maß für die Übereinstimmung zwischen Urteilern (Ratern). Die Analyse kann für nominal- und ordinalskalierte Merkmale angewendet werden.

Mit Hilfe des Kappa Tests wird der über das Maß der zufälligen Übereinstimmungen hinausgehende Anteil berechnet.

Bland-Altman-Plots

Alle soweit erwähnten Verfahren weisen gewisse Mängel auf. Bland und Altman diskutieren die Nachteile der Regressions- und Korrelationsverfahren bei ihrer Anwendung in Methoden-vergleichenden Untersuchungen (79;80). Hier kritisieren sie die falsche Interpretation des Korrelationskoeffizienten, der nämlich nicht die Übereinstimmung zwischen zwei Variablen messen würde, sondern nur deren

Zusammenhang. Somit wäre ein hoher Korrelationskoeffizient nicht gleichzusetzen mit einer guten Übereinstimmung der zu vergleichenden Verfahren. Außerdem verdeutlichen sie, dass die anderen Methoden mögliche Abhängigkeiten des Fehlers von der Größe der Messerwerte nicht berücksichtigen.

Somit entwickelten Bland und Altman die Bland-Altman-Plots; diese sind eine anerkannte Methode zur Darstellung der Ergebnisse zweier Messverfahren. Die Bedeutung dieser Methode wächst stetig und wird durch Ergänzungen diverser Wissenschaftler ständig optimiert (81-83).

Zur Beurteilung von Messergebnissen, die ein Testsystem liefert, dienen die drei Begriffe:

- Genauigkeit
- Richtigkeit
- Präzision

Die Genauigkeit beschreibt die Übereinstimmung des einzelnen Messwertes mit dem wahren Wert des Messergebnisses und beschreibt, wie nahe das Ergebnis am wahren Wert liegt.

Die Richtigkeit ist ein Maß für die systematische Abweichung von dem Mittelwert einzelner Messwerte und dem wahren Wert des Messergebnisses und definiert das Ausmaß der Übereinstimmung zwischen Mittelwert und wahren Wert.

Die Präzision ist ein Maß für die zufällige Abweichung unabhängiger Messergebnisse unter festgelegten Bedingungen und beschreibt die Reproduzierbarkeit eines Messwertes.

Zur Beurteilung von den Qualitätsparametern Genauigkeit und Richtigkeit eignet sich im Besonderen die Analyse mittels Bland-Altman-Plot.

Da die Datenauswertung der vorliegenden Arbeit einen größenabhängigen Fehler aufweist und die Daten logarithmisch normalverteilt sind, wurden diese hier logarithmisch dargestellt. Diese Darstellung empfiehlt sich, da absolute Fehler in relative Fehler umgewandelt werden. Somit wurde auf der Abszisse das geometrische Mittel der Ergebnisse [$\frac{1}{2}(\log x_1 + \log y_1) = \frac{1}{2}(\log x_1 \times y_1) = \log \sqrt{x_1 \times y_1}$], ermittelt von den zu vergleichenden Messmethoden, aufgetragen. x_1 und y_1 sind die Wertepaare für ein bestimmtes Patientenserum; „x“ bedeutet, dass der Wert auf der Plattform KRYPTOR gemessen wurde und „y“ bezieht sich auf VarELISA. Auf der Ordinate wurde der

Logarithmus des Verhältnisses der beiden Messmethoden aufgetragen [$\log(x_1) - \log(y_1) = \log(x_1/y_1)$]. Gleiche Werte (Differenz=0) liegen auf der Abszissenachse. Um die **Richtigkeit** zu visualisieren wird der Mittelwert der Differenzen als Parallele zur x-Achse eingezeichnet. Mit Hilfe von 95%-Konfidenzgrenzen, innerhalb derer 95% der Differenzen zu erwarten sind lässt sich die **Genauigkeit** beurteilen. Für die obere bzw. untere Grenze gilt: Mittelwert der Differenzen + bzw. - $1,96 \times$ Standardabweichung der Differenzen (84).

ROC-Analyse

Die „Receiver Operating Characteristik“ (ROC)-Kurve wird seit den 80er Jahren verwendet, um das Vermögen diagnostischer Tests zu bewerten, d.h. zwischen zwei (Krankheits-)Zuständen zu unterscheiden. Voraussetzung für die Durchführung dieses Tests ist die Festlegung einer Diagnose (Ja/Nein); es sollen also zwei Zustände unterschieden werden: Krankheit vorhanden/nicht vorhanden. Somit ist auch das Testresultat eine Ja/Nein-Aussage: krank (=positiv) / nicht krank (=negativ). Bei Laborverfahren, d.h. Tests mit quantitativen Ergebnissen, erfolgt die Unterscheidung „positiv“/„negativ“ mit einem Trennwert (Cut-Off-Wert). Wichtige Begriffe der ROC-Analyse sind außerdem Sensitivität und Spezifität, da mit Hilfe dieser Analyse eine Methodik nach ihrer Sensitivität, d.h. dem relativen Anteil der richtig erfassten Patienten, und ihrer Spezifität, d.h. dem Anteil der Probanden mit normalem Testausfall, beurteilt wird.

Die ROC-Kurve beschreibt somit die Wertepaare von Sensitivität und Spezifität für alle Cut-Off-Werte. Die Trennschärfe eines diagnostischen Tests ist gegeben, wenn sich die ROC-Kurve signifikant von der Diagonalen unterscheidet und somit ist sie umso besser, je größer der Abstand der Kurve von der Diagonalen ist.

Die Fläche unterhalb der Kurve (AUC=Area under curve) ist ein Maß für die Güte des Tests; sie kann zwischen 0,5 und 1 liegen (85).

2.4.2. Angewandte statistische Methoden der vorliegenden Arbeit

Die Daten wurden mittels des ‚Excel-ad-in‘ Datenverarbeitungssystems ‚Analyse-it‘ ausgewertet.

Um das Ausmaß der Übereinstimmung beider Methoden zu beurteilen, wurden die Daten mittels *Bland-Altman-Plots* dargestellt.

Um die Abhängigkeit zweier Variablen zu prüfen wurden Rangkorrelationen analysiert (*Korrelationskoeffizient nach Spearman*).

Zur Abschätzung, inwieweit die zwei Methoden hinsichtlich der subjektiven Beurteilung übereinstimmen, ob das Serum als positiv bzw. negativ in Bezug auf das Auftreten antithyreoidaler Antikörper zu bewerten ist, wurde der *Kappa-Koeffizient nach Cohen* bestimmt.

Die Prüfung der diagnostischen Treffsicherheit des Assays KRYPTOR erfolgte mit der *ROC-Analyse*.

Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgesetzt.

3. Ergebnisse

Da die Daten wie zuvor erwähnt einen größenabhängigen Fehler zeigen und logarithmisch normalverteilt (lognormalverteilt) sind, wurden diese in den Unterpunkten 3.2. (ausgenommen Punkt 3.2.1.) bis 3.4. logarithmisch dargestellt. Dabei ist „log“ der Logarithmus zur Basis 10. Die logarithmische Darstellung ermöglicht, dass absolute Fehler in relative Fehler transformiert werden.

3.1. Intra- und Inter-Assay Varianz bei BRAHMS KRYPTOR

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Messungen wurden die Patientenseren vier verschiedener Konzentrationen (sehr niedrig, d.h. ca. 30 U/ml; niedrig, d.h. ca. 60 U/ml; mittel, d.h. ca. 300 U/ml; hoch, d.h. ca. 1500 U/ml für anti-TPO, ca. 600 U/ml für anti-TG) in einer Zehnfachbestimmung (Intra-Assay) sowie in einer zehnmaligen Wiederholung (Inter-Assay) gemessen.

Aus den zehn Werten wurden jeweils der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient in % für jede Konzentration berechnet.

Die Zehnfachbestimmung der Messwerte (**Intraassay**) ergab folgende Werte:

Tabelle 9: Intraassay-Varianz für TPO-AK

Konzentrationen für TPO-AK [U/ml]	Mittelwert [U/ml]	Standardabweichung [U/l]	VK [%]
30	24,0	4,5	18,1
60	59,5	3,6	6,1
300	370,3	13,5	3,7
1500	1708,0	20,2	1,2

Die beste Reproduzierbarkeit bei der Messung von TPO-AK zeigte sich beim höchsten Messwert von 1500 U/ml (VK 1,2%); am schlechtesten ließen sich die niedrigsten Werte von 30 U/ml reproduzieren (VK 18,1%). Dazwischen lagen die Konzentrationen 300 U/ml mit einem VK von 3,7% und 60 U/ml mit einem VK von 6,1%.

Tabelle 10: Intraassay-Varianz für TG-AK

Konzentrationen für TG-AK [U/ml]	Mittelwert [U/ml]	Standardabweichung [U/l]	VK [%]
30	27,1	2,2	8,0
60	47,2	2,2	4,7
300	280,5	5,72	2,0
600	548,4	11,6	2,1

Die Reproduzierbarkeit und somit die Präzision der Messung war bei den höheren TG-AK Konzentrationen von 300 U/ml und 600 U/ml am höchsten und lag bei einem VK von 2,0 bzw. 2,1%. Bei dem Messwert 60 U/ml zeigte sich ein VK von 4,7% und bei der niedrigsten Konzentration 30 U/ml wies dieser 8,0% auf.

Die Präzision von „Analysenserie zu Analysenserie“ (**Interassay**) der jeweiligen AK betrug:

Tabelle 11: Interassay-Varianz für TPO-AK

Konzentrationen für TPO-AK [U/ml]	Mittelwert [U/ml]	Standardabweichung [U/l]	VK [%]
30	15,6	13,1	84,0
60	28,4	24,4	85,9
300	339,4	39,2	11,6
1500	1568,0	49,1	3,1

Die Präzision zwischen den Analysenserien fiel bei den höheren AK Konzentrationen am besten aus und lag bei 300 U/ml und 1500 U/ml bei einem VK von 11,6 bzw. 3,1%. Bei den niedrigen Messwerten von 30 U/ml und 60 U/ml zeigte sich eine sehr niedrige „Wiederholgenauigkeit“ bei einem VK von 84,0 bzw. 85,9%.

Tabelle 12: Interassay-Varianz, Werte für TG-AK

Konzentrationen für TG-AK [U/ml]	Mittelwert [U/ml]	Standardabweichung [U/l]	VK [%]
30	38,9	16,5	42,4
60	61,9	9,6	15,5
300	296,8	10,6	3,6
600	637,8	47,0	7,4

Die beste Reproduzierbarkeit bei der Messung von TG-AK zeigte sich beim zweithöchsten Messwert von 300 U/ml (VK 3,6%); am schlechtesten ließ sich der niedrigste Werte von 30 U/ml reproduzieren (VK 42,4%). Dazwischen lagen die Konzentrationen 600 U/ml mit einem VK von 7,4% und 60 U/ml mit einem VK von 15,5%.

3.2. Verteilung der Antikörper (TPO-, TG-AK) in den verschiedenen Kollektiven

3.2.1. Normalkollektiv

Die Berechnung der Referenzintervalle für TPO- und TG-AK der zu vergleichenden Assays erfolgte mit Hilfe des Datenverarbeitungssystems „Analyse-it“.

TPO-AK:

Tabelle 13: Normalkollektiv, TPO-AK: Parametrische Lagemaße

	N	Mittelwert (U/ml)	Standardabweichung	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes
TPO-AK KRYPTOR	205	14,96	14,307	0,999	12,99 – 16,93
TPO-AK VarELISA	205	8,28	7,987	0,557	7,18 – 9,38

Tabelle 14: Normalkollektiv, TPO-AK: nicht-parametrische Lagemaße

	Median (U/ml)	Interquartilabstand	95%-Konfidenzintervall des Median
TPO-AK KRYPTOR	11,40	17,00	9,60 - 14,90
TPO-AK VarELISA	6,90	10,00	5,70 - 8,30

Das Referenzintervall des Normalkollektivs, indem 95% aller Messwerte liegen, betrug für TPO-AK:

- bei VarELISA: 0,0 – 27,9 U/ml
- bei KRYPTOR: 0,0- 61,18 U/ml.

Der Mittelwert der Seren im Normalkollektiv für TPO-AK lag bei KRYPTOR höher (14,96 U/ml) als bei VarELISA (8,28 U/ml). Des Weiteren zeigte KRYPTOR eine höhere Abweichung der Einzelwerte von ihrem Mittelwert (Standardabweichung: 14,307) als VarELISA (Standardabweichung: 7,987). Dementsprechend war auch der Standardfehler bei KRYPTOR größer (0,999) als bei VarELISA (0,557).

Das 95%-Konfidenzintervall bei KRYPTOR zeigte, dass in 95% aller Stichproben das Intervall von 12,99-16,93 [U/ml] den wahren Wert enthielt; bei VarELISA lag dieses Intervall bei 7,18-9,38 [U/ml].

Entsprechend dem Mittelwert lag auch der Median bei KRYPTOR höher (11,40 U/ml) als bei VarELISA (6,90 U/ml). Der Interquartilabstand, also der Abstand zwischen dem 25%- und 75%-Quartil betrug bei KRYPTOR 17 U/ml und bei VarELISA 10 U/ml.

Zudem reichte das 95%-Konfidenzintervall des Median bei KRYPTOR von 9,60-14,90 [U/ml], währenddessen es bei VarELISA 5,70-8,30 [U/ml] betrug.

TG-AK:

Tabelle 15: Normalkollektiv, TG-AK: Parametrische Lagemaße

	N	Mittelwert (U/ml)	Standard- abweichung	Standard- Fehler	95%-Konfidenz- Intervall des Mittel- wertes
TG-AK KRYPTOR	205	7,42	12,033	0,840	5,77 – 9,08
TG-AK VarELISA	205	14,25	10,311	0,720	12,83 – 15,67

Tabelle 16: Normalkollektiv, TG-AK: nicht-parametrische Lagemaße

	Median (U/ml)	Interquartilabstand	95%-Konfidenzintervall des Median
TG-AK KRYPTOR	2,30	11,30	0,00 – 4,10
TG-AK VarELISA	12,60	12,30	11,70 – 14,50

Das Referenzintervall des Normalkollektivs, indem 95% aller Messwerte liegen, betrug für TG-AK

- bei VarELISA: 0,0 – 43,25 U/ml
- bei KRYPTOR: 0,0 – 39,84 U/ml.

Im Gegensatz zu den Werten für TPO-AK lag der bei TG-AK gemessene Mittelwert bei KRYPTOR tiefer (7,42 U/ml) als bei VarELISA (14,25 U/ml). Die Standardabweichung (12,033) und der Standardfehler (0,840) zeigten bei KRYPTOR höhere Werte als bei VarELISA (Standardabweichung: 10,311; Standardfehler: 0,720). Das 95%-Konfidenzintervall betrug 5,77-9,08 [U/ml] bei KRYPTOR und 12,83-15,67 [U/ml] bei VarELISA.

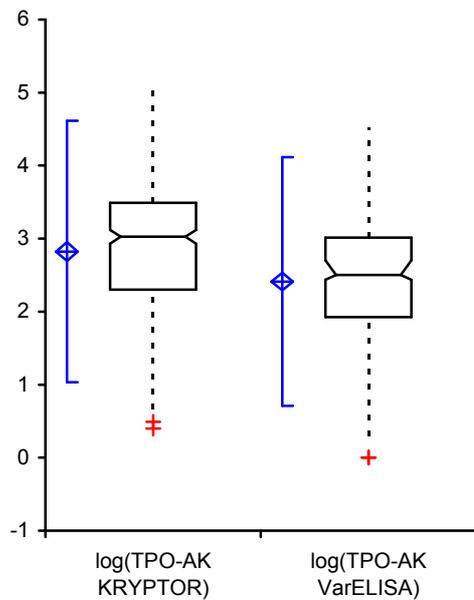
Entsprechend dem Mittelwert war auch der Median bei KRYPTOR niedriger (2,30 U/ml) als bei VarELISA (12,60 U/ml). Der Interquartilabstand betrug bei KRYPTOR 11,30 U/ml und bei VarELISA 12,30 U/ml.

Des Weiteren reichte das 95%-Konfidenzintervall des Median bei KRYPTOR von 0,00 bis 4,10 [U/ml], währenddessen es bei VarELISA 11,70 bis 14,50 [U/ml] betrug.

3.2.2. Patientenkollektiv CLT

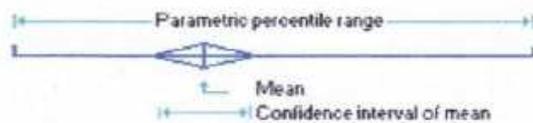
TPO-AK:

Abbildung 1: Box-Whisker Plot: log(TPO-Antikörper) KRYPTOR vs. VarELISA



Legende:

- parametrische Lagemaße:



- nicht-parametrische Lagemaße:

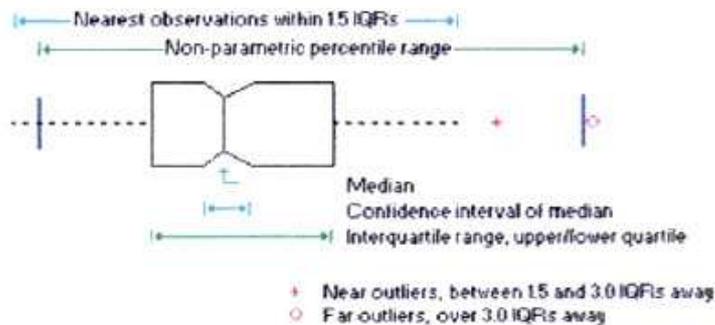


Tabelle 17: CLT, log(TPO-Antikörper): Parametrische Lagemaße

	n	Mittelwert (U/ml)	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenz- Intervall des Mittel- wertes
log(TPO-AK KRYPTOR)	199	2,823	0,9142	0,0648	2,695 - 2,951
log(TPO-AK VarELISA)	202	2,412	0,8689	0,0611	2,291 - 2,532

Tabelle 18: CLT, log(TPO-Antikörper): nicht-parametrische Lagemaße

	Median (U/ml)	Interquartilabstand	95%-Konfidenzintervall des Median
log(TPO-AK KRYPTOR)	3,028	1,190	2,930 – 3,120
log(TPO-AK VarELISA)	2,503	1,089	2,435 – 2,703

Zum Vergleich sollen hier zusätzlich die nicht-transformierten Werte dargestellt werden:

Tabelle 19: CLT, TPO-Antikörper: Parametrische Lagemaße

	n	Mittelwert (U/ml)	Standard- abweichung	Standard- Fehler	95%-Konfidenz- Intervall des Mittel- wertes
TPO-AK KRYPTOR	203	3152,68	9056,089	635,613	1899,40 – 4405,97
TPO-AK VarELISA	203	1145,23	3070,637	215,516	720,28 - 1570,18

Tabelle 20: CLT, TPO-Antikörper: nicht-parametrische Lagemaße

	Median (U/ml)	Interquartilabstand	95%-Konfidenzintervall des Median
TPO-AK KRYPTOR	1009,00	2189,40	734,70 – 1258,00
TPO-AK VarELISA	314,00	960,50	272,00 – 497,00

Der Mittelwert der Seren im Kollektiv CLT für TPO-AK lag bei KRYPTOR 2,75mal höher (3152,68 U/ml) als bei VarELISA (1145,23 U/ml). Des Weiteren zeigte KRYPTOR eine höhere Abweichung der Einzelwerte von ihrem Mittelwert (Standardabweichung: 9056,089) als VarELISA (Standardabweichung: 3070,637). Dementsprechend war auch der Standardfehler bei KRYPTOR größer (635,613) als bei VarELISA (215,516).

Das 95%-Konfidenzintervall bei KRYPTOR reichte von 1899,40 bis 4405,97 [U/ml]; bei VarELISA lag dieses Intervall bei 720,28 bis 1570,18 [U/ml].

Dem Mittelwert entsprechend lag auch der Median bei KRYPTOR höher (1009,00 U/ml) als bei VarELISA (314,00 U/ml). Der Interquartilabstand, also der Abstand zwischen dem 25%- und 75%-Quartil, betrug bei KRYPTOR 2189,40 U/ml und bei VarELISA 960,50 U/ml.

Zudem reichte das 95%-Konfidenzintervall des Median bei KRYPTOR von 734,70 bis 1258,00 [U/ml], währenddessen es bei VarELISA 272,00 bis 497,00 [U/ml] betrug.

TG-AK:

Abbildung 2: Box-Whsiker Plot: log(TG-Antikörper) KRYPTOR vs. VarELISA

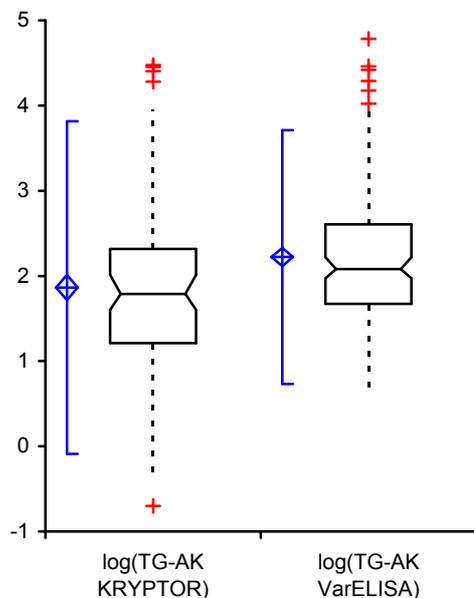


Tabelle 21: CLT, log(TG-Antikörper): Parametrische Lagemaße

	n	Mittelwert (U/ml)	Standard- abweichung	Standard- Fehler	95%- Konfidenz- intervall des Mittel- wertes
log(TG-AK KRYPTOR)	177	1,864	0,9965	0,0749	1,717 - 2,012
log(TG-AK VarELISA)	201	2,222	0,7603	0,0536	2,116 - 2,327

Tabelle 22: CLT, log(TG-Antikörper): nicht-parametrische Lagemaße

	Median (U/ml)	Interquartilabstand	95%- Konfidenzintervall des Median
log(TG-AK KRYPTOR)	1,787	1,105	1,601 - 2,012
log(TG-AK VarELISA)	2,079	0,934	1,973 - 2,217

Wiederum werden auch bei TG-Antikörper die nicht-transformierten Werte zusätzlich dargestellt:

Tabelle 23: CLT, TG-Antikörper: nicht-parametrische Lagemaße

	n	Mittelwert (U/ml)	Standard- Abweichung	Standard- Fehler	95%-Konfidenz- intervall des Mittel- wertes
TG-AK KRYPTOR	204	954,14	3778,738	264,565	432,49 – 1475,79
TG-AK VarELISA	203	1279,62	5381,469	377,705	534,87 – 2024,37

Tabelle 24: CLT, TG-Antikörper: Parametrische Lagemaße

	Median (U/ml)	Interquartilabstand	95%-Konfidenzintervall des Median
TG-AK KRYPTOR	40,80	171,05	27,90 – 65,60
TG-AK VarELISA	118,00	354,50	93,00 – 156,00

Im Gegensatz zu den Werten für TPO-AK lag der bei TG-AK gemessene Mittelwert bei KRYPTOR tiefer (954,14 U/ml) als bei VarELISA (1279,62 U/ml); im Durchschnitt maß somit VarELISA bei TG-AK (im Gegensatz zur TPO-AK Messung) 1,34mal höhere Werte als KRYPTOR. Die Streuung der einzelnen Messwerte war bei

KRYPTOR geringer als bei VarELISA, denn Standardabweichung (3778,738) und Standardfehler (264,565) waren bei KRYPTOR kleiner als bei VarELISA (Standardabweichung: 5381,469; Standardfehler: 377,705).

Das 95%-Konfidenzintervall betrug 432,49 bis 1475,79 [U/ml] bei KRYPTOR und 534,87 bis 2024,37 [U/ml] bei VarELISA.

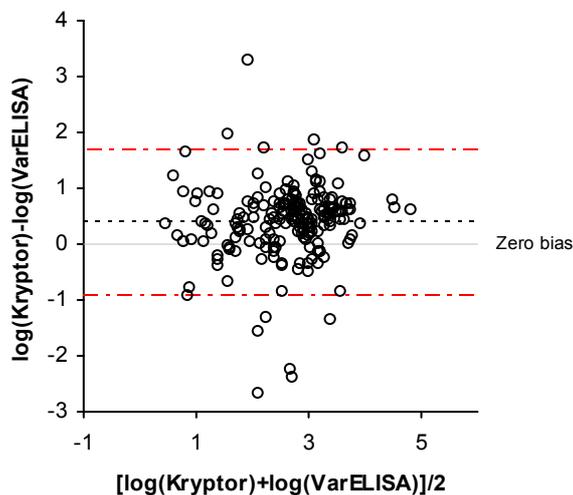
Entsprechend dem Mittelwert war auch der Median bei KRYPTOR niedriger (40,80 U/ml) als bei VarELISA (118,00 U/ml). Der Interquartilabstand betrug bei KRYPTOR 171,05 U/ml und bei VarELISA 354,50 U/ml

Des Weiteren reichte das 95%-Konfidenzintervall des Median bei KRYPTOR von 27,90 bis 65,60 [U/ml], währenddessen es bei VarELISA 93,00 bis 156,00 [U/ml] betrug.

3.3. Bland-Altman Auswertung

TPO-AK bei CLT:

Abbildung 3: Bland-Altman Plot, log(TPO-AK)



- Bias: 0,385
 - 95%-Konfidenzintervall: 0,290 bis 0,480
- 95%-Konfidenzbereich/limits of agreement: -0,939 bis 1,708

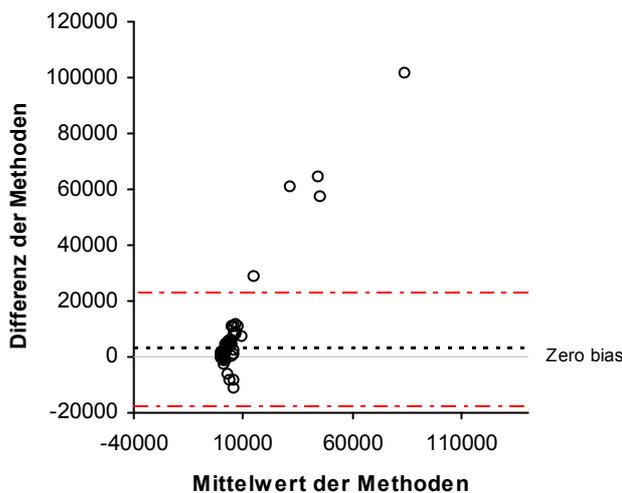
Der Bias von 0,385 bedeutet, dass KRYPTOR im Mittel $10^{0,385} = 2,43$ mal höhere Konzentrationen bei TPO-AK maß als VarELISA.

Das 95%-Konfidenzintervall des Bias reicht von 0,290 bis 0,480; dies entspricht einem „wahren“ Bereich von $10^{0,290}$ bis $10^{0,480} = 1,950$ bis 3,020.

Der 95%-Konfidenzbereich, in dem 95% der Differenzen ($\log x_1 - \log y_1$) zu erwarten sind beträgt -0,939 bis 1,708, was einem „wahren“ Bereich von $10^{-0,939}$ bis $10^{1,708}$ entspricht, d.h. von 0,115 bis 51,051. x bezieht sich auf den Assay KRYPTOR und y auf VarELISA.

Zur besseren Veranschaulichung der Werte sei hier zusätzlich die Abbildung der untransformierten Werte dargestellt:

Abbildung 4: Bland-Altman Plot, TPO-AK (Werte nicht-transformiert)



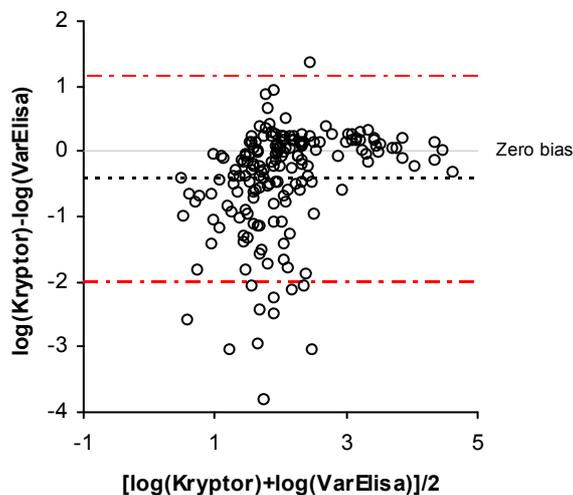
- Bias: 2670,51
 - 95-Konfidenzintervall: 1208,42 bis 4132,60
- 95%-Konfidenzbereich/limits of agreement: -18036,26 bis 23377,28

Der angegebene Bias bedeutet, dass die von KRYPTOR gemessenen Werte im Mittel um 2670,51 U/ml höher lagen als bei VarELISA.

Im 95%-Konfidenzbereich von -18036,26 bis 23377,28 liegen 95% der zu erwartenden Differenzen. Der negative Wert der unteren Grenze spricht dafür, dass die Daten nicht normalverteilt sind. Vielmehr weisen sie einen größenabhängigen Fehler auf, weshalb auch die Darstellung der logarithmisierten Daten erfolgte.

TG-AK bei CLT:

Abbildung 5: Bland-Altman Plot, log(TG-AK)



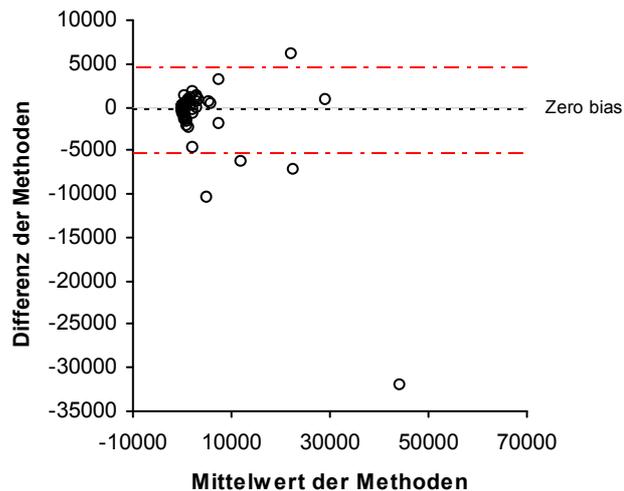
- Bias: -0,426
 - 95%-Konfidenzintervall: -0,547 bis -0,305
- 95%-Konfidenzbereich/limits of agreement: -2,017 bis 1,165

Der Bias von -0,426 bedeutet, dass die Konzentrationen bei KRYPTOR im Mittel $10^{-0,426} = 0,37 = 37\%$ der Konzentrationen von VarELISA betragen. Das 95%-Konfidenzintervall des Bias reicht von -0,547 bis -0,305; dies entspricht einem „wahren“ Bereich von $10^{-0,547}$ bis $10^{-0,305} = 0,284$ bis 0,495.

Der 95%-Konfidenzbereich, in dem 95% der Differenzen ($\log x_1 - \log y_1$) zu erwarten sind beträgt -2,017 bis 1,165, was einem „wahren“ Bereich von $10^{-2,017}$ bis $10^{1,165}$ entspricht, d.h. von 0,010 bis 14,622.

Auch hier sollen zur Veranschaulichung die nicht-transformierten Werte sowie deren Abbildung dargestellt werden:

Abbildung 6: Bland-Altman Plot, TG-AK (Werte nicht-transformiert)



- Bias: -325,07
 - 95%-Konfidenzintervall: -679,42 bis 29,27
- 95%-Konfidenzbereich/limits of agreement: -5343,45 bis 4693,30

Der angegebene Bias bedeutet, dass die von KRYPTOR gemessenen Werte im Mittel um 325,07 U/ml niedriger lagen als bei VarELISA.

Im 95%-Konfidenzbereich von -5343,45 bis 4693,30 liegen 95% der zu erwartenden Differenzen.

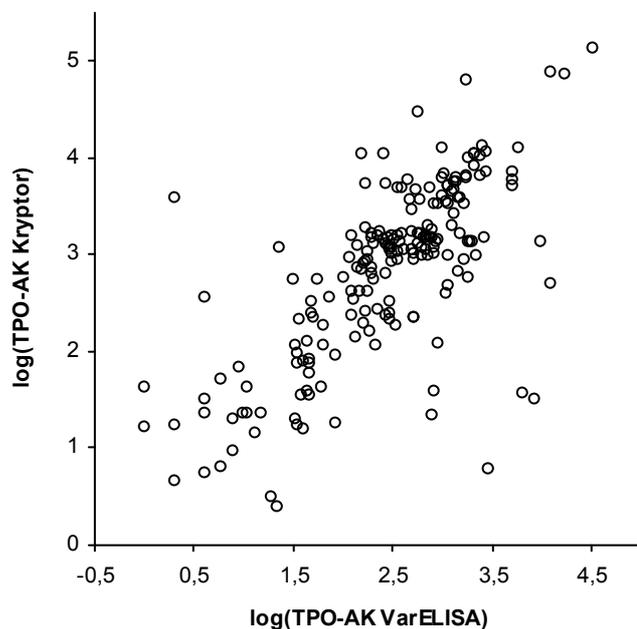
3.4. Korrelationsanalyse (Korrelationskoeffizient nach Spearman)

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman ist ein Maß für die Stärke eines monotonen Zusammenhangs. Der Grad des Zusammenhangs wird anhand des Korrelationskoeffizienten ausgedrückt (r_s). In diesem Fall werden die Messwerte für TPO- und TG-AK aus beiden Messverfahren als Wertepaare gegenübergestellt.

TPO-AK bei CLT:

- Spearman Korrelationskoeffizient (r_s): 0,68
- 95%-Konfidenzintervall: 0,60 - 0,75
- p (2-seitig) < 0.0001

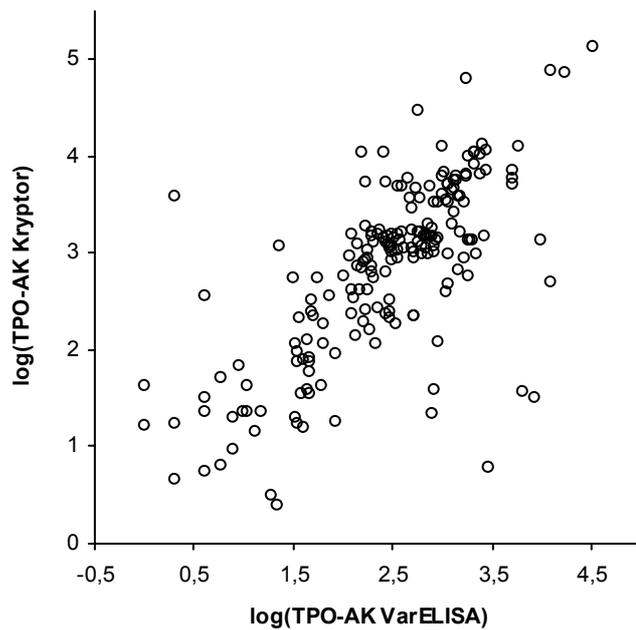
Abbildung 7: Spearman Rangkorrelation, $\log(\text{TPO-AK})$



TG-AK bei CLT:

- Spearman Korrelationskoeffizient (r_s): 0,49
- 95%-Konfidenzintervall: 0,37 - 0,59
- p (2-seitig) <0.0001

Abbildung 8: Spearman Rangkorrelation, $\log(\text{TG-AK})$



Der Korrelationskoeffizient bei der TPO-AK Messung beträgt 0,68 und das 95%-Konfidenzintervall dessen reicht von 0,60 bis 0,75. Dagegen liegt der Korrelationskoeffizient (0,49) und dessen Konfidenzintervall (0,37-0,59) bei der TG-AK Messung niedriger. Somit zeigt sich ein besserer Zusammenhang der Messwerte bei der TPO-AK Messung als bei der TG-AK Messung.

3.5. Kappa Test zur Beurteilung der Übereinstimmung

Der Kappa-Koeffizient nach Cohen wird verwendet, um abzuschätzen, inwieweit zwei Beobachtungen bezüglich ihrer subjektiven Urteile übereinstimmen. In diesem Fall stellen die zwei Beobachtung die zwei verschiedenen Messverfahren eines einzelnen Serums dar. Nach Angaben der Hersteller werden zwei verschiedenen „Cut-Off Werte“ angegeben, d.h. Werte, bei deren Überschreitung das Serum als positiv für das Auftreten von antithyreoidalen Antikörpern zu bewerten ist. Elias-VarELISA, PHARMACIA Diagnostics gibt für diesen Wert 100 U/ml an, BRAHMS KRYPTOR hat den Wert auf 60 U/ml festgelegt. Der Kappa-Koeffizient ergibt sich aus: $\kappa = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$, wobei p_o der relativen Häufigkeit aller übereinstimmenden Urteile und p_e dem Anteil der rein zufällig erwartenden Übereinstimmungen entspricht.

Tabelle 25: Kappa-Statistik für TPO-AK (n = 205)

TPO-AK ELISA	TPO-AK KRYPTOR		Total
	Negativ	Positiv	
Negativ	34	22	56
Positiv	5	144	149
Total	39	166	205
Kappa statistic	0,63		

Bei der Bestimmung der TPO-Antikörper wurden 13,2% der Seren von beiden Verfahren als diskordant beurteilt. 86,8% der Seren wurden als konkordant bewertet; dabei ist der Anteil der rein zufällig zu erwartenden Übereinstimmungen 64,1%. Der Kappa-Koeffizient von 0,63 bezeichnet demzufolge eine gute Übereinstimmung.

Tabelle 26: Kappa-Statistik für TG-AK (n = 205)

TG-AK ELISA	TG-AK KRYPTOR		Total
	Negativ	Positiv	
Negativ	72	27	99
Positiv	44	62	106
Total	116	89	205
Kappa statistic	0,31		

Bei der Bestimmung der TG-Antikörper wurden 34,6% der Patientenseren von beiden Messverfahren als nicht übereinstimmend (diskordant) beurteilt. 65,4% der Seren wurden als übereinstimmend (konkordant) bewertet; dabei beträgt der Anteil der rein zufällig zu erwartenden Übereinstimmungen 49,7%. Der Kappa-Koeffizient von 0,31 ist als Maß für eine schwache Übereinstimmung zu bewerten.

3.6. ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristics)

Zur Beurteilung der diagnostischen Treffsicherheit sowie der Gütekriterien Sensitivität und Spezifität der diagnostischen Testung wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Um das Ergebnis „positives“ versus „negatives“ Testergebnis zu liefern, muss ein Schwellenwert festgelegt sein. Dieser beträgt beim System KRYPTOR 60 U/ml; d.h. Werte ≤ 60 U/ml werden als negativ, höhere Werte als positiv bewertet. Es werden die Rate richtig positiver Befunde (=Sensitivität) gegen die Rate falsch negativer Befunde (= 1-Spezifität) aufgetragen. Je weiter links der Diagonalen die ROC-Kurve verläuft, desto besser kann die Methode zwischen „erkrankten“ und „nicht-erkrankten“ Personen unterscheiden (86-88). In den dazugehörigen Tabellen wurde zu dem Cut-Off-Wert bzw. zu den Werten, die dem vom Hersteller angegebenen Schwellenwert am nächsten lagen die Sensitivitäten und Spezifitäten sowie Anzahl richtig positiver (RP), richtig negativer (RN), falsch positiver (FP) und falsch negativer (FN) Befunde angegeben. In der Analyse wurden die Daten beider Kollektive verwendet, das Normalkollektiv sowie das Kollektiv CLT.

TPO-AK:

Tabelle 27: ROC-Analyse, TPO-AK

ROC-Kurve	Fläche	Standardabweichung	P	95%-KI der Fläche
TPO-AK KRYPTOR	0,929	0,0145	<0.0001	0,900 bis 0,957

Abbildung 9: ROC-Kurve für TPO-AK auf der Messplattform KRYPTOR

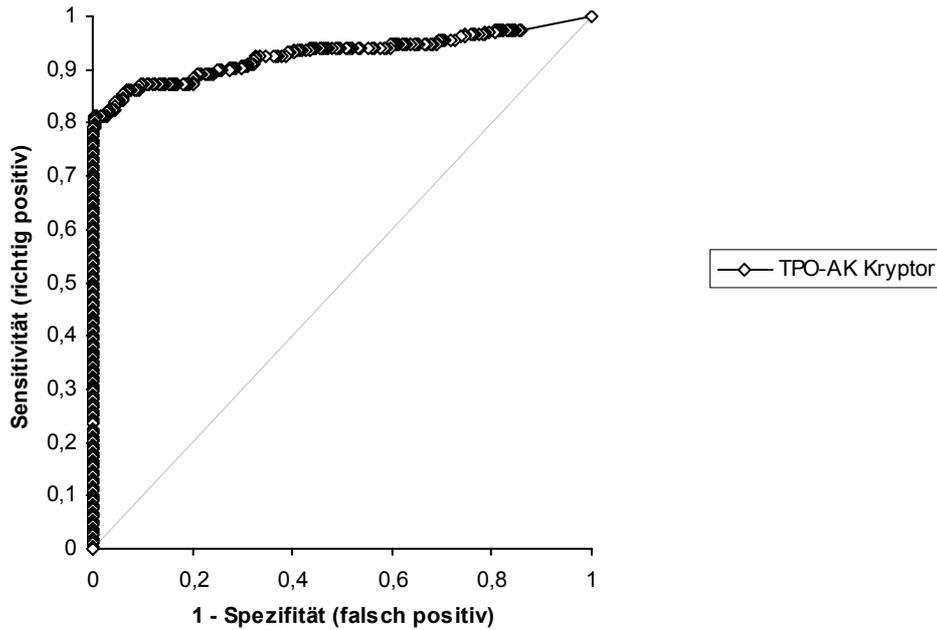


Tabelle 28: ROC-Analyse (TPO-AK): Spezifität, Sensitivität für verschiedene Cut-Off Werte

TPO-AK KRYPTOR	Sensitivität	Spezifität	RP	RN	FP	FN
43,8	82,4%	96,1%	168	197	8	36
45,2	82,4%	96,6%	168	198	7	36
50,5	81,9%	96,6%	167	198	7	37
57,4	81,9%	97,1%	167	199	6	37
58,8	81,4%	97,1%	166	199	6	38
59,9	81,4%	97,6%	166	200	5	38
61,4	81,4%	98,0%	166	201	4	38
61,7	81,4%	98,5%	166	202	3	38
62,8	81,4%	99,0%	166	203	2	38
67,2	81,4%	99,5%	166	204	1	38
68,5	80,9%	99,5%	165	204	1	39
74,2	80,4%	99,5%	164	204	1	40
76,5	79,9%	99,5%	163	204	1	41
77,5	79,4%	99,5%	162	204	1	42

TG-AK:

Tabelle 29: ROC-Analyse, TG-AK

ROC-Kurve	Fläche	Standardabweichung	p	95%-KI der Fläche
TG-AK KRYPTOR	0,805	0,0219	<0.0001	0,762 bis 0,848

Abbildung 10: ROC-Kurve für TG-AK auf der Messplattform KRYPTOR

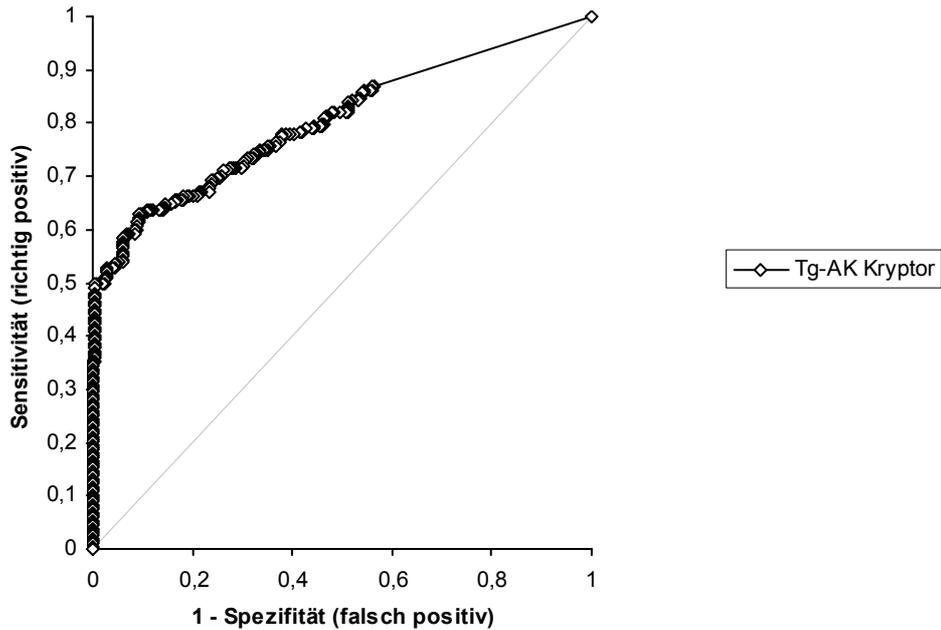


Tabelle 30: ROC-Analyse (TG-AK): Spezifität, Sensitivität für verschiedene Cut-Off Werte

TG-AK KRYPTOR	Sensitivität	Spezifität	RP	RN	FP	FN
39,9	50,0%	97,6%	102	200	5	102
40,0	50,0%	98,0%	102	201	4	102
40,1	50,0%	99,0%	102	203	2	102
40,7	50,0%	99,5%	102	204	1	102
41,7	49,0%	99,5%	100	204	1	104
44,6	48,0%	99,5%	98	204	1	106
45,2	47,5%	99,5%	97	204	1	107
47,2	47,1%	99,5%	96	204	1	108
48,5	46,6%	99,5%	95	204	1	109
49,1	46,1%	99,5%	94	204	1	110
49,2	45,6%	99,5%	93	204	1	111
49,8	45,1%	99,5%	92	204	1	112
52,4	44,6%	99,5%	91	204	1	113
55,4	44,1%	99,5%	90	204	1	114
59,8	43,6%	99,5%	89	204	1	115
61,3	43,1%	99,5%	88	204	1	116
65,6	42,6%	99,5%	87	204	1	117
70,6	42,2%	99,5%	86	204	1	118

Die ROC-Analyse bei TPO-AK zeigte mit einer Fläche (=Area under Curve) von 0,929 eine bessere diagnostische Trennschärfe als diejenige bei TG-AK (Area under Curve = 0,805). Somit konnte der Assay KRYPTOR bei der Messung von TPO-AK gegenüber von TG-AK besser zwischen „erkrankten“ und „nicht-erkrankten“ Personen unterscheiden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Diagnose „erkrankt“ versus „nicht-erkrankt“ unter anderem mittels des in der Routinepraxis eingesetzten Assays VarELISA erfolgte.

Bei TPO-AK zeigte sich bei dem dem vom Hersteller angegebenen Schwellenwert am nächsten liegenden Wert von 59,9 U/ml (in der Tabelle grau markiert) sowohl eine hohe Sensitivität (81,4%) als auch Spezifität (97,6%). Dahingegen lag bei TG-AK die Sensitivität beim der dem Cut-Off Wert nahe liegenden Konzentration von 59,8 U/ml lediglich bei 43,6%, die Spezifität betrug jedoch 99,5%.

Die aus der Auswertung hervorgehenden optimalen Cut-Off Werte (in der Tabelle kursiv und „fett“ markiert) betragen 67,2 U/ml für TPO-AK und 40,7 U/ml bei TG-AK. Damit ergibt sich für TPO-AK eine geringfügige Abweichung von 7,2 U/ml zwischen optimalem und vom Hersteller angegebenen Schwellenwert von 60 U/ml, wohingegen die Abweichung für TG-AK weitaus größer ausfällt (19,3 U/ml).

3.7. Kappa Test Auswertung anhand unter 3.6. neu ermittelter Cut-Off Werte

Mittels ROC-Analyse konnten neue Cut-Off Werte ermittelt werden, welche eine bessere Sensitivität und Spezifität als der vom Hersteller angegebene Cut-Off Wert erreichten.

Daher soll anhand dieser Cut-Off Werte nochmals der Kappa-Koeffizient nach Cohen ermittelt werden.

Tabelle 31: Kappa-Statistik für TPO-AK (n = 205), Berechnung mittels neuer (anhand ROC-Analyse ermittelter) Cut-Off Werte

TPO-AK ELISA	TPO-AK KRYPTOR		Total
	Negativ	Positiv	
Negativ	34	22	56
Positiv	5	144	149
Total	39	166	205
Kappa statistic	0,63		

Durch die Verwendung des neu ermittelten Cut-Off Wertes von 67,2 U/ml hat sich durch die Kappa Test Auswertung keine Änderung der Übereinstimmung ergeben, respektive liegt der Kappa-Koeffizient unverändert bei 0,63.

Der durch die ROC-Analyse hervorgegangene neue Cut-Off Wert von 40,7 U/ml soll dementsprechend für eine erneute Berechnung des Kappa-Koeffizienten bei TG-AK herangezogen werden.

Tabelle 32: Kappa-Statistik für TG-AK (n = 205), Berechnung mittels neuer (anhand ROC-Analyse ermittelter) Cut-Off Werte

TG-AK ELISA	TG-AK KRYPTOR		Total
	Negativ	Positiv	
Negativ	64	35	99
Positiv	39	67	106
Total	103	102	205
Kappa statistic	0,28		

Der Kappa-Koeffizient bezeichnet mit einem Ergebnis von 0,28 eine schwache Übereinstimmung und liegt 3% niedriger als der Kappa-Koeffizient (0,31), welcher anhand des Cut-Off Wertes des Herstellers berechnet wurde.

Zusammenfassend konnte im Kappa Test durch die Verwendung der neu ermittelten Cut-Off Werte keine (bei TPO-AK) oder nur eine minime Änderung (bei TG-AK) der Übereinstimmung festgestellt werden.

4. Diskussion

Die diagnostische Aussagekraft der Antikörperbestimmung bei der CLT wird durch technische Schwierigkeiten limitiert (72). Im Vergleich zwischen einem manuellen und einem vollautomatisierten Testverfahren wurde die Übereinstimmung der intraindividuellen Ergebnisse kritisch evaluiert. Die Problematik ist jedoch zu relativieren, da die Antikörper-Messung bei CLT weder generell zur Therapiekontrolle empfohlen wird, noch als einziger Parameter zur Diagnosestellung genutzt wird (89). Die Diagnosestellung ergibt sich vielmehr aus dem Zusammenspiel von Klinik, Sonographie-Befund, Hormonparametern und der Antikörperbestimmung. Außerdem muss angemerkt werden, dass die Antikörperbestimmung im Rahmen der Diagnosestellung im hier untersuchten Kollektiv im Vorfeld mittels VarELISA erfolgte; dieses manuell durchgeführte Messverfahren wird in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg derzeit als Standardmethode eingesetzt. Die in der VarELISA Messung als CLT eingestuften Patientenseren wurden erneut mit dem Messsystem KRYPTOR analysiert. Diese Limitation muss bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die Behandlung von Patienten mit CLT richtet sich nicht nach der Ursache der Erkrankung (Autoimmunität), sondern nach der potentiellen klinischen Konsequenz, nämlich der Dysfunktion der Schilddrüse, im Sinne einer hypothyreoten Stoffwechsellage (72). Änderungen in der Konzentration der Antikörper deuten oftmals auf eine Veränderung der Krankheitsaktivität hin. Vor diesem Hintergrund ergeben sich die allgemeinen Schwierigkeiten der Antikörpermessung, so auch Unterschiede hinsichtlich **Spezifität und Sensitivität** der verschiedenen diagnostischen Tests. Verschiedene Studien belegten diese Problematik in Abhängigkeit von den verwendeten Testmethoden.

In den letzten Jahren zeigten mehrere Veröffentlichungen, dass zur Antigen-Antikörper-Bindung eine spezielle dreidimensionale Struktur der antigenen Epitope, an die die Antikörper binden, erforderlich ist (72). Die Ergebnisse der Tests hängen somit kritisch von der molekularen Struktur der verwendeten Antigene ab; kleine Veränderungen in der Struktur der Epitope könnten so zur verstärkten oder verminderten Antigen-Antikörper-Bindung führen. Die unterschiedliche Formation der Epitope und deren Einfluss auf die AK-Messung wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass bei Patienten

mit CLT TGPO-Antikörper ermittelt werden konnten, die simultan TG und TPO binden konnten (90). Die verschiedenen Assays unterscheiden sich in nicht geringem Maße in der Detektion der jeweiligen Epitope. Im VarELISA wird als antigene Festphase rekombinante humane TPO und humanes TG verwendet; das Testsystem KRYPTOR verwendet sowohl humane TPO als auch humanes TG. Eine fehlende Detektion eines Epitops führt somit zu Unterschieden in der Spezifität und zu Verfälschungen der AK-Messung einer Population und damit zur Generierung unterschiedlicher Referenzintervalle, auch wenn die Methoden gegen dieselbe internationale Referenzpräparation standardisiert sind. Die Problematik, dass zu messende Antigene mit anderen Autoantigenen kontaminiert sein können, sollte bei der Interpretation der Assay-Unterschiede nicht außer Acht gelassen werden. Unterschiede in der Sensitivität der AK-Testung können sich auch aus der Methodik, die für die Signalerkennung genutzt wird, ergeben. VarELISA nutzt dazu die Farbentwicklung eines Chromogens, KRYPTOR beruht auf der Erfassung von Fluoreszenzsignalen verschiedener Wellenlängen. Eine fehlende Erkennung der Epitope könnte letztendlich eine verringerte Sensitivität bewirken aufgrund einer Unterschätzung tatsächlich vorhandener zirkulierender Autoantikörper (72).

Die **Standardisierung** der Testsysteme bei der Messung der SD-Antikörper wirft weitere Schwierigkeiten auf. Internationale Referenzpräparationen mit dem Code 65/93 für TG-AK, 66/378 für TPO-AK sind bei der Nationalen Behörde für Biologische Standards und Kontrollen in London verfügbar. Diese Präparationen wurden allerdings vor 35 Jahren aus einem Serumpool von Patienten mit AIT hergestellt und gefriergetrocknet. Gefriergetrocknete AK neigen jedoch über lange Zeit hinweg zu einer Degradierung. Diese Tatsache sollte bei der Interpretation von Testsystemen zusätzlich betrachtet werden, da sie zu einer Verfälschung in der Bindungsaktivität dieser Referenzpräparationen mit unklarer klinischer Relevanz geführt haben könnte. Aufgrund mangelnden Vorhandenseins dieser Präparationen werden sie nur als Primärstandards für die Kalibration der Assays verwendet. Kommerzielle Kits verwenden Sekundärstandards, die für jede Methode unterschiedlich sind.

Bei der Beurteilung der **TPO-AK Messung** muss beachtet werden, dass verschiedene Isoformen der TPO beschrieben werden, was auf das unterschiedliche Splicen der TPO Ribonukleinsäure (RNS) zurückzuführen ist. TPO Moleküle können sich zudem in ihrer dreidimensionalen Struktur und dem Ausmaß ihrer Glykosylierung unterscheiden. Die

Unterschiede in der Variabilität der verschiedenen Messmethoden beruhen auch auf der Präparation der TPO der verschiedenen Assay Kits. Die native TPO, die aus menschlichem Schilddrüsengewebe extrahiert wird, kann als Präparation der nativen Membran oder als gereinigtes Gewebe verwendet werden. Die Spezifität der Assays kann sich zudem aufgrund einer Kontaminierung durch andere Schilddrüsenantigene unterscheiden; oftmals ist hier vor allem das Vorhandensein von TG von Bedeutung. Die Anwendung von rekombinant hergestellter TPO eliminiert zwar das Risiko der Kontamination, löst aber nicht das Problem der Variabilität der TPO-Struktur (72), da diese von der angewandten Technik, die TPO zu isolieren, abhängt. Bei VarELISA wird mit rekombinanter humaner TPO, bei KRYPTOR mit nativer, humaner TPO gearbeitet. Auch wenn die momentan angewandten TPO Assays gegen dieselbe Referenzpräparation standardisiert sind, verringert dieser Primärstandard dennoch nicht die Abweichungen zwischen den Methoden. Diese Tatsache verdeutlicht die Variabilität der festgesetzten Sensitivitätsgrenzen, Cut-Off-Werte und Referenzintervalle der verschiedenen Hersteller. So gibt VarELISA als Cut-Off Wert 100 U/ml an, bei KRYPTOR beträgt dieser 60 U/ml. Die analytische Sensitivität (=untere Nachweisgrenze) für TPO-AK liegt bei VarELISA bei 1 U/ml und bei KRYPTOR bei 10 U/ml.

Bei der Frage, ab welcher AK-Menge ein Patient als „krank“ einzustufen ist, müssen Prävalenzen und die Bedeutung des Referenzintervalls berücksichtigt werden. Die Abschätzung der **Prävalenz der TPO-AK** hängt von der Spezifität und Sensitivität der angewandten Methode ab. So konnten in einer Studie aus dem Jahr 2002, die ungefähr 17000 Individuen ohne manifeste SD-Erkrankung untersuchte, bei 12% der Untersuchten erhöhte TPO-AK Spiegel gemessen werden. Untersucht wurde die Seren mit einem kompetitiven Immunoassay (91). Unklar bleibt jedoch, ob niedrige AK-Titer bei schilddrüsengesunden Individuen als physiologisch zu betrachten sind, Prodromi für die Entwicklung einer AIT darstellen oder ein Spezifitätsproblem der Assays sind. Die Referenzintervalle für TPO-AK Assays sind oft sehr unterschiedlich. Assays, die eine niedrige Detektionsgrenze verwenden, zeigen typischerweise nicht messbare TPO-AK Level bei sehr genau ausgewählten Normalkollektiven an. Diese Assays gehen davon aus, dass die Präsenz von TPO-AK als pathologisch einzustufen ist. Im Kontrast dazu, führen Assays mit einer höheren Detektionsgrenze ($>10\text{mU/l}$) einen „physiologischen Referenzbereich“ oder auch „Graubereich“ an, d.h. Werte unterhalb dieser Grenze

werden als nicht-pathologisch bewertet. Da diese Assays keine höhere Sensitivität hinsichtlich der AK-Detektion besitzen, könnte dieser „physiologische Referenzbereich“ eine Art unspezifisches „Messrauschen“ der Assays darstellen und somit keinen pathologischen Befund repräsentieren (72). Ob nun Individuen mit niedrigem TPO- oder TG-AK Level als „normal“ eingestuft werden sollten, bleibt bis heute schwierig zu beantworten. Hier sind Langzeitstudien mit der Frage abzuwarten, ob solche Patienten ein erhöhtes Risiko haben, eine Schilddrüsendiffunktion zu entwickeln. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Normalkollektiv zeigte bei VarELISA einen 95%-Referenzbereich von 0,0 bis 27,9 U/ml; KRYPTOR zeigte einen 95%-Referenzbereich von 0,0 bis 61,2 U/ml.

Der Nutzen der TPO-AK Messung liegt nach wie vor darin, dass die TPO-AK Testung der sensitivste Test ist, eine AIT zu detektieren (92).

Bei der Interpretation der **TG-AK** müssen verschiedene Faktoren betrachtet werden, so auch die Beschaffenheit des Proteins Thyreoglobulin selbst. TG ist ein sehr heterogenes Protein, was auf Unterschieden posttranslationaler Modifikationen wie Glykosylierung, Iodierung, Sulfatierung u.a. beruht. Während der Schilddrüsenhormonsynthese und –freisetzung wird TG polymerisiert und biologisch abgebaut. Die immunologische Struktur von TG ist sehr komplex und es ergeben sich Unterschiede in den Präparationen von TG, die sowohl vom Reinigungsprozess als auch vom verwendeten menschlichen Schilddrüsengewebe abhängig sind. Dies ist ein Grund für die oft geringe Standardisierbarkeit von TG-AK Assays (72).

Wie beim TPO-AK Assay sind Prävalenz und Cut-Off Werte für TG-AK abhängig von der Sensitivität und Spezifität der angewandten Methode. Die NHANES III Studie berichtete von einer Prävalenz von ca. 10% der allgemeinen Bevölkerung für TG-AK; die Messung erfolgte mittels kompetitivem Immunoassay (91). Die klinische Signifikanz niedriger TG-AK Level bleibt wie auch bei TPO-AK unklar. Man kann davon ausgehen, dass niedrige Antikörperkonzentrationen das Vorhandensein „natürlicher“ Antikörper bei gesunden Individuen oder eine Antikörperantwort nach Schilddrüsenoperationen oder Radioiodtherapie repräsentieren könnten (72). Andererseits könnten niedrige Antikörperlevel auch für eine zugrunde liegende klinisch noch nicht apparente AIT sprechen (93). Wie bei der TPO-AK Messung sind auch bei den verschiedenen TG-AK Assays unterschiedliche Schwellenwerte beschrieben. So geben manche Methoden an, dass „normale“ Patienten Werte unter dem Detektionslevel

haben sollten, andere Methoden geben ein „physiologischen Referenzbereich“ an, so auch die in der vorliegenden Arbeit miteinander verglichenen Methoden. Dass die Schwellenwerte auch bei der TG-AK Messung für beide Verfahren unterschiedlich sind (VarELISA: 100 U/ml; KRYPTOR: 60 U/ml) sollte bei der Interpretation der Ergebnisse für die TG-AK Messung berücksichtigt werden.

Was die Präzision des zu untersuchenden Assays KRYPTOR angeht, so zeigten sich durchwegs gute Wiederholgenauigkeiten in der Intraassay-Testung beider AK, wobei die Variationskoeffizienten bei TPO-AK Werte zwischen 1,2-18,1% betragen; demgegenüber standen VK-Werte von 2,0-8,0% bei TG-AK.

In der Interassay-Messung fielen die jeweiligen Werte vor allem bei den niedrigen AK-Konzentrationen deutlich schlechter aus; so betrug der VK bei der TPO-AK Messung von 60 U/ml 85,9%. Bei TG-AK zeigte sich die niedrigste Präzision bei der Messung des niedrigsten Wertes von 30 U/ml (VK 42,4%). Die schlechtere „Wiederholgenauigkeit“ in der Interassay-Messung gegenüber der Intraassay-Werten spiegelt die Variationen von Faktoren wieder, die von „Tag zu Tag“ auftreten; diese Faktoren sind z.B. Zeit, Kalibrierung, Untersucher sowie das Messsystem selbst. Insgesamt zeigte sich eine bessere Messgenauigkeit in der TG-AK Messung auf der Plattform KRYPTOR.

Zur Verteilung der Antikörper im Normalkollektiv lässt sich sagen, dass das Messsystem KRYPTOR bei TPO-AK im Mittel 1,8fach höhere Werte maß als VarELISA; bei TG-AK war das Verhältnis jedoch umgekehrt: VarELISA zeigte im Mittel 1,9fach höhere Konzentrationen als KRYPTOR.

Diese Beziehung setzte sich bei der Messung der Patientenserum im Kollektiv CLT fort: KRYPTOR maß bei TPO-AK im Mittel 2,75mal höhere Werte als VarELISA. Bei der TG-AK Messung lag der Mittelwert hingegen bei VarELISA 1,34mal höher als bei KRYPTOR. Bei der Interpretation dieser Verhältnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Mittelwerte deutlich von einzelnen sehr hohen Werten („Ausreißer“) beeinflusst werden.

Der Bias im **Bland-Altman Plot** bei TPO-AK bedeutet, dass die von KRYPTOR gemessenen Werte im Mittel um 2670,51 U/ml höher lagen als bei VarELISA.

Im 95%-Konfidenzbereich von -18036,26 bis 23377,28 lagen 95% der zu erwartenden Differenzen.

Der Bias bei TG-AK im Vergleich KRYPTOR vs. VarELISA betrug -325,07. Somit lagen die von KRYPTOR gemessenen Werte im Mittel um 325,07 U/ml niedriger als bei VarELISA.

Im 95%-Konfidenzbereich von -5343,45 bis 4693,30 lagen 95% der zu erwartenden Differenzen.

Des Weiteren zeigte die Darstellung der Ergebnisse im Bland-Altman Plot, dass die Daten einen größenabhängigen Fehler aufwiesen. Daher wurden die Werte zur verbesserten Darstellung logarithmisiert und erneut aufgetragen. Die logarithmische Darstellung ermöglicht die Umwandlung absoluter in relative Fehler.

Der **Korrelationskoeffizient** nach Spearman betrug 0,68 bei der TPO-AK Messung und 0,49 bei TG-AK. Dies spricht für einen besseren kausalen Zusammenhang der Wertepaare bei TPO-AK gegenüber TG-AK. Da jedoch erst Werte größer 0,8 als hinreichend betrachtet werden, ist der Zusammenhang beider Methoden sowohl bei TPO- als auch bei TG-AK als unbefriedigend zu bewerten.

Des Weiteren beschreibt der **Kappa-Koeffizient** von 0,63 eine relativ gute Übereinstimmung bei der Bestimmung der TPO-Antikörper. 86,8% der Seren wurden als konkordant bewertet; dies liegt über dem Anteil der rein zufällig zu erwartenden Übereinstimmungen von 64,1%. Demgegenüber stehen 65,4% in ihrem subjektiven Urteil übereinstimmende Ergebnisse bei der TG-Antikörper Bestimmung. Der Kappa-Koeffizient nach Cohen von 0,31 zeigt hier eine schwache Übereinstimmung der Werte. Die **diagnostische Trennschärfe** ist bei TPO-AK höher (Area under Curve = 0,929) als bei TG-AK (Area under Curve = 0,805); somit konnte KRYPTOR bei der Bestimmung der TPO-AK besser zwischen „gesunden“ und „erkrankten“ Patienten unterscheiden als VarELISA. Bei der TPO-AK Bestimmung zeigten sich bei dem dem Cut-Off (vom Hersteller auf 60 U/ml festgelegt) am nächsten liegenden Wert (59,9 U/ml) sowohl eine hohe Sensitivität (81,4%) als auch Spezifität (97,6%). Bei der TG-AK Messung lag bei dem Cut-Off Wert von 59,8 U/ml bei hoher Spezifität (99,5%) die Sensitivität sehr niedrig (43,6%), d.h. viele Patienten wurden als falsch negativ eingestuft. Die aus der Auswertung hervorgehenden optimaleren Cut-Off Werte betragen 67,2 U/ml für TPO-AK und 40,7 U/ml für TG-AK, was einer Differenz von 7,2 U/ml zwischen vorgegebenem und optimalem Schwellenwert für TPO-AK bzw. 19,3 U/ml für TG-AK entspricht. Mittels neu ermitteltem Cut-Off Wert von 67,2 U/ml konnte bei TPO-AK eine Steigerung der Spezifität auf 99,5% erreicht werden bei gleich bleibender

Sensitivität von 81,4%. Bei TG-AK erbrachte der neu ermittelte Cut-Off Wert von 40,7 U/ml eine Steigerung der Sensitivität auf 50%; die Spezifität blieb unverändert bei 99,5%.

Da durch die Verwendung der neu ermittelten Cut-Off Werte im Kappa-Test bei TPO-AK die Anzahl positiver und negativer Laborbefunde unverändert blieb, zeigte sich auch keine Änderung des Kappa-Koeffizienten. Eine Erhöhung des Cut-Off Wertes von 60 U/ml auf 67,2 U/ml zeigte im Kappa-Test somit keine Auswirkung und brachte auch keinen neuen Aspekt für die Interpretation der Ergebnisse hervor. Bei TG-AK zeigte sich eine minime Verschlechterung des Kappa-Koeffizienten von 0,31 auf 0,28 unter Einberechnung des neu ermittelten Cut-Off Wertes von 40,7 U/ml. Auch diese Änderung kann bei der Interpretation der Ergebnisse vernachlässigt werden. Obwohl der neu ermittelte Cut-Off Wert bei TG-AK eine bessere Sensitivität bei unveränderter Spezifität erreichte, ist diese Verbesserung bei einem nun sogar geringeren Kappa-Koeffizienten nicht zu sehen. Es wird somit deutlich, dass die einzelnen statistischen Auswertungen alleine für sich stehen und in der Interpretation der Ergebnisse nur bedingt miteinander verglichen werden können.

Die Betrachtung der Wertepaare für beide Analyseverfahren wirft sich nun die Frage nach dem „wahren Wert“ auf. Die Antwort hierauf kann nicht klar getroffen werden, da es in der Autoantikörpermessung der Schilddrüse keinen international akzeptierten Goldstandard gibt.

Betrachtet man die absoluten Konzentrationen an TPO- und TG-AK muss berücksichtigt werden, dass die Werte im Verlauf der Erkrankung oft variabel sind. Somit können Änderungen in der Konzentration der Antikörper oftmals auf eine Veränderung der Krankheitsaktivität hinweisen (72). Dies bedeutet jedoch nicht, dass die AK-Messung im Verlauf der Erkrankung an Bedeutung zunimmt; sie ist aufgrund fehlender klinischer Konsequenz vielmehr oft nicht wegweisend und daher verzichtbar.

An der Höhe der Autoantikörpertiter kann somit nicht das „Ausmaß“ der Erkrankung abgemessen werden. Vor diesem Hintergrund müssen die „Ausreißer“ der AK-Messung betrachtet werden, denn der absolute Wert einer als pathologisch eingestuften AK-Konzentration hat weder prognostische, therapeutische noch klinische Konsequenzen.

Trotz dieser Tatsache wird die Messung der SD-AK in Zukunft eine zunehmende Rolle spielen. Kahaly et al. verdeutlichten diese Tatsache in einer Studie, in der ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von Iod und dem Auftreten von

Autoantikörpern nachgewiesen wurde (94). Demnach findet man eine höhere Prävalenz an autoimmuner Thyreoiditis in Gebieten, die gut mit Iod versorgt sind als in Iodmangelgebieten (95;96). So wiesen epidemiologische Studien eine signifikante Zunahme lymphozytärer Infiltration unter Iodprophylaxe nach (97). Trotz dieser Tatsache muss wiederholt verdeutlicht werden, dass bei ausschließlich erhöhten SD-AK die Indikation für eine Therapie nicht zwingend gegeben ist, da die Diagnosestellung vielmehr auf dem Zusammentreffen mehrerer Parameter beruht.

Das Studiendesign der vorliegenden Arbeit zeigt gewisse Limitationen. Die unter anderem mittels der VarELISA Messung als CLT eingestuften Patientenseren wurden ein weiteres Mal mit dem Messsystem KRYPTOR analysiert. Somit besteht zwischen der Messung der Patientenseren eine gewisse Abhängigkeit, wobei bedacht werden muss, dass die AK-Messung nur ein Parameter innerhalb der Diagnosestellung CLT darstellt.

Was das Handling der Assays angeht, so bietet der KRYPTOR Assay vor allem bei der Messung von großen Serien aufgrund von Zeitersparnis einen klaren Vorteil. Von Nachteil ist jedoch die aufwändige Pflege des Automaten. Bei der Messung kleiner Serumreihen sind die beiden Assays hinsichtlich des Zeitaufwandes ungefähr gleichzusetzen. Insgesamt ist der KRYPTOR Assay jedoch das technisch einfachere zu handhabende Analysesystem.

5. Zusammenfassung

In dieser Studie wurden zwei Immunoassays zur Bestimmung von TG- und TPO-Antikörpern hinsichtlich diagnostischer Trennschärfe sowie klinischer Relevanz in der Diagnostik der chronischen lymphozytären Thyreoiditis-Hashimoto (CLT) untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden zwei Patientengruppen erfasst: ein Kollektiv mit der Diagnose CLT (n=203) und das sogenannte Normalkollektiv, das 205 Probanden umfasste. Die diagnostischen Kriterien zur Diagnosestellung CLT ergaben sich aus dem Zusammenspiel von klinischem Befund, Ultraschalluntersuchung und Antikörpertiter.

Verglichen wurden der an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg für die Routinediagnostik eingesetzte manuelle VarELISA TG und TPO Antibodies Assay, PHARMACIA Diagnostics mit dem automatisierten BRAHMS anti-TGn bzw. anti-TPOn KRYPTOR Assay.

Die Bestimmung der Ergebnisse bei TPO-AK zeigte, dass die von KRYPTOR gemessenen Werte im Mittel um 2670,51 U/ml höher lagen als bei VarELISA. Bei TG-AK wurden die Konzentrationen auf der Plattform KRYPTOR allerdings um 325,07 U/ml niedriger gemessen als bei VarELISA; es zeigte sich bei TG-AK somit ein umgekehrtes Verhältnis.

Des Weiteren wurde eine relativ gute Übereinstimmung zwischen beiden Assays (Kappa-Koeffizient nach Cohen = 0,63) bei der Bestimmung der TPO-Antikörper festgestellt; 86,8% der Seren wurden als konkordant bewertet. Demgegenüber stehen 65,4% in ihrem subjektiven Urteil übereinstimmende Ergebnisse bei der TG-Antikörper Bestimmung, was für eine schwache Übereinstimmung der TG-AK-Werte spricht (Kappa-Koeffizient nach Cohen = 0,31).

Zudem ist die diagnostische Trennschärfe bei TPO-AK höher (Area under Curve = 0,929) als bei TG-AK (Area under Curve = 0,805); somit unterscheidet KRYPTOR bei der Bestimmung der TPO-AK besser zwischen „gesunden“ und „erkrankten“ Patienten als VarELISA. Bei der Messung der TPO-AK auf der Plattform KRYPTOR zeigte sich bei dem dem Cut-Off (vom Hersteller auf 60 U/ml festgelegt) am nächsten liegenden Wert (59,9 U/ml) sowohl eine hohe Sensitivität (81,4%) als auch Spezifität (97,6%). Bei der TG-AK Messung lag bei dem Cut-Off Wert von 59,8 U/ml bei hoher Spezifität (99,5%) die Sensitivität sehr niedrig (43,6%), d.h. viele Patienten wurden als falsch

negativ eingestuft. Aus der Auswertung geht ein optimaler Schwellenwert von 67,2 U/ml für TPO-AK und 40,7 U/ml für TG-AK hervor, wobei der vom Hersteller angegebene Cut-Off Wert für beide AK 60 U/ml beträgt. Mittels neu ermitteltem Cut-Off Wert (67,2 U/ml) konnte bei TPO-AK eine Steigerung der Spezifität auf 99,5% bei unveränderter Sensitivität erreicht werden. Dementsprechend erbrachte der Cut-Off Wert von 40,7 U/ml eine Steigerung der Sensitivität auf 50% bei gleich bleibender Spezifität bei TG-AK.

Die Bestimmung des Antikörperprofils in den beiden Testsystemen zeigte somit, insbesondere bei TG-AK, häufig diskrepante Ergebnisse. Dies belegt erneut die bekannte Problematik bei der Labordiagnostik der CLT. Ursächlich sind Affinitätsunterschiede und unterschiedliche Kalibrierungen der verwendeten Tests sowie das Fehlen einer Standardisierung zu diskutieren. Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse die Notwendigkeit einer Definition eines institutionellen Cut-Offs.

6. Literaturverzeichnis

1. Yamada R, Yamamoto K. Recent findings on genes associated with inflammatory disease. *Mutat.Res.* 2005;573(1-2):136-51.
2. Sheu SY, Schmid KW. Inflammatory diseases of the thyroid gland. Epidemiology, symptoms and morphology. *Pathologie* 2003;24(5):339-47.
3. Fountoulakis S, Tsatsoulis A. On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a unifying hypothesis. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 2004;60(4):397-409.
4. Costa A, Torchio B, Zoppetti G, Feyless E. What is meant today by Hashimoto's thyroiditis? *J.Endocrinol.Invest* 1989;12(5):355-6.
5. Hashimoto H. Zur Kenntnis der lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse (Struma lymphomatosa). *Langenbecks Arch.Chir.* 1912;97:219-48.
6. Campbell PN, Doniach D, Hudson RV, Roitt IM. Auto-antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre). *Lancet* 1956;271(6947):820-1.
7. Belyavin G, Trotter WR. Investigations of thyroid antigens reacting with Hashimoto sera; evidence for an antigen other than thyroglobulin. *Lancet* 1959;1(7074):648-52.
8. Roitt IM, Ling NR, Doniach D, Couchman KG. The cytoplasmic auto-antigen of the human thyroid. I. immunological and biochemical characteristics. *Immunology* 1964;158:375-93.
9. Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M, Carayon P, Lissitzky S. Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett.* 1985;190(1):147-52.
10. Weetman AP. Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *Eur.J.Endocrinol.* 2003;148(1):1-9.
11. Barbesino G, Chiovato L. The genetics of Hashimoto's disease. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 2000;29(2):357-74.
12. Weetman AP. Autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity* 2004;37(4):337-40.
13. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F et al. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 1977;7(6):481-93.
14. Sawin CT, Castelli WP, Hershman JM, McNamara P, Bacharach P. The aging thyroid. Thyroid deficiency in the Framingham Study. *Arch.Intern.Med.* 1985;145(8):1386-8.

15. Gordin A, Maatela J, Miettinen A, Helenius T, Lamberg BA. Serum thyrotrophin and circulating thyroglobulin and thyroid microsomal antibodies in a Finnish population. *Acta Endocrinol.(Copenh)* 1979;90(1):33-42.
16. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1997;84(3):223-43.
17. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F et al. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 1995;43(1):55-68.
18. Huber G, Staub JJ, Meier C, Mitrache C, Guglielmetti M, Huber P et al. Prospective study of the spontaneous course of subclinical hypothyroidism: prognostic value of thyrotropin, thyroid reserve, and thyroid antibodies. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2002;87(7):3221-6.
19. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch.Intern.Med.* 2000;160(4):526-34.
20. Okayasu I, Hatakeyama S, Tanaka Y, Sakurai T, Hoshi K, Lewis PD. Is focal chronic autoimmune thyroiditis an age-related disease? Differences in incidence and severity between Japanese and British. *J.Pathol.* 1991;163(3):257-64.
21. Kurashima C, Hirokawa K. Focal lymphocytic infiltration in thyroids of elderly people. Histopathological and immunohistochemical studies. *Surv.Synth.Pathol.Res.* 1985;4(5-6):457-66.
22. Bastenie PA, Bonnyns M, Neve P, Vanhaelst L, Chailly M. Clinical and pathological significance of asymptomatic atrophic thyroiditis. A condition of latent hypothyroidism. *Lancet* 1967;1(7496):915-8.
23. Tomer Y. Genetic dissection of familial autoimmune thyroid diseases using whole genome screening. *Autoimmun.Rev.* 2002;1(4):198-204.
24. Ban Y, Tomer Y. The contribution of immune regulatory and thyroid specific genes to the etiology of Graves' and Hashimoto's diseases. *Autoimmunity* 2003;36(6-7):367-79.
25. Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronek Z, Jacob CO et al. A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity. *Science* 1988;240(4855):1003-9.
26. Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R et al. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1997;82(1):143-6.
27. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of

- CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J.Immunol.* 2000;165(11):6606-11.
28. Tomer Y, Greenberg D. The thyroglobulin gene as the first thyroid-specific susceptibility gene for autoimmune thyroid disease. *Trends Mol.Med.* 2004;10(7):306-8.
 29. Diamond MT, Joffe B. Monozygotic twins with chronic lymphocytic thyroiditis. (Hashimoto's disease). *JAMA* 1966;198(2):182-3.
 30. Foley TP, Jr., Schubert WK, Marnell RT, McAdams AJ. Chronic lymphocytic thyroiditis and juvenile myxedema in uniovular twins. *J.Pediatr.* 1968;72(2):201-7.
 31. Hall R, Stanbury JB. Familial studies of autoimmune thyroiditis. *Clin.Exp.Immunol.* 1967;2:Suppl-25.
 32. Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. II. The power of affected relative pairs. *Am.J.Hum.Genet.* 1990;46(2):229-41.
 33. Brix TH, Kyvik KO, Hegedus L. What is the evidence of genetic factors in the etiology of Graves' disease? A brief review. *Thyroid* 1998;8(8):727-34.
 34. Brix TH, Kyvik KO, Hegedus L. A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2000;85(2):536-9.
 35. Phillips DI, Osmond C, Baird J, Huckle A, Rees-Smith B. Is birthweight associated with thyroid autoimmunity? A study in twins. *Thyroid* 2002;12(5):377-80.
 36. Phillips DI, Prentice L, McLachlan SM, Upadhyaya M, Lunt PW, Rees SB. Autosomal dominant inheritance of the tendency of develop thyroid autoantibodies. *Exp.Clin.Endocrinol.* 1991;97(2-3):170-2.
 37. Matsuoka N, Eguchi K, Kawakami A, Tsuboi M, Nakamura H, Kimura H et al. Lack of B7-1/BB1 and B7-2/B70 expression on thyrocytes of patients with Graves' disease. Delivery of costimulatory signals from bystander professional antigen-presenting cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1996;81(11):4137-43.
 38. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80(5):707-18.
 39. Battifora M, Pesce G, Paolieri F, Fiorino N, Giordano C, Riccio AM et al. B7.1 costimulatory molecule is expressed on thyroid follicular cells in Hashimoto's thyroiditis, but not in Graves' disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1998;83(11):4130-9.

40. Salmaso C, Olive D, Pesce G, Bagnasco M. Costimulatory molecules and autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 2002;35(3):159-67.
41. Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL et al. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1993;366(6450):76-9.
42. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, Jr., Lombard LA et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993;262(5135):909-11.
43. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J.Exp.Med.* 1995;182(2):459-65.
44. Voorby HA, Kabel PJ, de Haan M, Jeucken PH, van der Gaag RD, de Baets MH et al. Dendritic cells and class II MHC expression on thyrocytes during the autoimmune thyroid disease of the BB rat. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1990;55(1):9-22.
45. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999;397(6716):263-6.
46. Guo J, Stolina M, Bready JV, Yin S, Horan T, Yoshinaga SK et al. Stimulatory effects of B7-related protein-1 on cellular and humoral immune responses in mice. *J.Immunol.* 2001;166(9):5578-84.
47. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J.Exp.Med.* 2000;192(7):1027-34.
48. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J.Immunol.* 2003;170(3):1257-66.
49. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol.Today* 1996;17(3):138-46.
50. Roura-Mir C, Catalfamo M, Sospedra M, Alcalde L, Pujol-Borrell R, Jaraquemada D. Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease. *Eur.J.Immunol.* 1997;27(12):3290-302.
51. Bretz JD, Arscott PL, Myc A, Baker JR, Jr. Inflammatory cytokine regulation of Fas-mediated apoptosis in thyroid follicular cells. *J.Biol.Chem.* 1999;274(36):25433-8.
52. Stassi G, Di Liberto D, Todaro M, Zeuner A, Ricci-Vitiani L, Stoppacciaro A et al. Control of target cell survival in thyroid autoimmunity by T helper cytokines via regulation of apoptotic proteins. *Nat.Immunol.* 2000;1(6):483-8.

53. Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Feldmann M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 1983;2(8359):1115-9.
54. Sospedra M, Obiols G, Babi LF, Tolosa E, Vargas F, Roura-Mir C et al. Hyperinducibility of HLA class II expression of thyroid follicular cells from Graves' disease. A primary defect? *J.Immunol.* 1995;154(8):4213-22.
55. Todd I, Pujol-Borrell R, Hammond LJ, Bottazzo GF, Feldmann M. Interferon-gamma induces HLA-DR expression by thyroid epithelium. *Clin.Exp.Immunol.* 1985;61(2):265-73.
56. Weetman AP, Freeman M, Borysiewicz LK, Makgoba MW. Functional analysis of intercellular adhesion molecule-1-expressing human thyroid cells. *Eur.J.Immunol.* 1990;20(2):271-5.
57. Kemp EH, Metcalfe RA, Smith KA, Woodroffe MN, Watson PF, Weetman AP. Detection and localization of chemokine gene expression in autoimmune thyroid disease. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 2003;59(2):207-13.
58. Andrikoula M, Tsatsoulis A. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur.J.Endocrinol.* 2001;144(6):561-8.
59. Arscott PL, Baker JR, Jr. Apoptosis and thyroiditis. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1998;87(3):207-17.
60. Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Mastorakos G, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA et al. Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1998;83(6):2199-203.
61. Kawakami A, Matsuoka N, Tsuboi M, Koji T, Urayama S, Sera N et al. CD4+ T cell-mediated cytotoxicity toward thyrocytes: the importance of Fas/Fas ligand interaction inducing apoptosis of thyrocytes and the inhibitory effect of thyroid-stimulating hormone. *Lab Invest* 2000;80(4):471-84.
62. Giordano C, Richiusa P, Bagnasco M, Pizzolanti G, Di Blasi F, Sbriglia MS et al. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis in both thyrocyte and lymphocyte cellular compartments correlates with opposite phenotypic manifestations of autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2001;11(3):233-44.
63. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G et al. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 1997;275(5302):960-3.
64. Hiromatsu Y, Hoshino T, Yagita H, Koga M, Sakisaka S, Honda J et al. Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1999;84(8):2896-902.

65. Arscott PL, Knapp J, Rymaszewski M, Bartron JL, Bretz JD, Thompson NW et al. Fas (APO-1, CD95)-mediated apoptosis in thyroid cells is regulated by a labile protein inhibitor. *Endocrinology* 1997;138(11):5019-27.
66. Mitsiades N, Poulaki V, Mastorakos G, Tseleni-Balafouta ST, Kotoula V, Koutras DA et al. Fas ligand expression in thyroid carcinomas: a potential mechanism of immune evasion. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1999;84(8):2924-32.
67. Andrikoula M, Vartholomatos G, Tsangaris GT, Bafa M, Tzortzatou-Stathopoulou F, Tsatsoulis A. Fas and Bcl-2 protein expression in thyrocytes of patients with nodular goiter. *Eur.J.Endocrinol.* 2001;145(4):403-7.
68. Wu Z, Podack ER, McKenzie JM, Olsen KJ, Zakarija M. Perforin expression by thyroid-infiltrating T cells in autoimmune thyroid disease. *Clin.Exp.Immunol.* 1994;98(3):470-7.
69. Talanian RV, Yang X, Turbov J, Seth P, Ghayur T, Casiano CA et al. Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J.Exp.Med.* 1997;186(8):1323-31.
70. Tandon N, Yan SL, Morgan BP, Weetman AP. Expression and function of multiple regulators of complement activation in autoimmune thyroid disease. *Immunology* 1994;81(4):643-7.
71. DeGroot LJ, Niepomniszcze H. Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. *Metabolism* 1977;26(6):665-718.
72. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, Demers LM, Feldt-Rasmussen U, Henry JF et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 2003;13(1):3-126.
73. Saravanan P, Dayan CM. Thyroid autoantibodies. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 2001;30(2):315-37, viii.
74. McLachlan SM, Rapoport B. Why measure thyroglobulin autoantibodies rather than thyroid peroxidase autoantibodies? *Thyroid* 2004;14(7):510-20.
75. McIntosh R, Watson P, Weetman A. Somatic hypermutation in autoimmune thyroid disease. *Immunol.Rev.* 1998;162:219-31.
76. Knudsen N, Jorgensen T, Rasmussen S, Christiansen E, Perrild H. The prevalence of thyroid dysfunction in a population with borderline iodine deficiency. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 1999;51(3):361-7.
77. Raber W, Gessl A, Nowotny P, Vierhapper H. Thyroid ultrasound versus antithyroid peroxidase antibody determination: a cohort study of four hundred fifty-one subjects. *Thyroid* 2002;12(8):725-31.

78. Nordyke RA, Gilbert FI, Jr., Miyamoto LA, Fleury KA. The superiority of antimicrosomal over antithyroglobulin antibodies for detecting Hashimoto's thyroiditis. *Arch.Intern.Med.* 1993;153(7):862-5.
79. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1(8476):307-10.
80. Bland JM, Altman DG. Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound Obstet.Gynecol.* 2003;22(1):85-93.
81. Petersen PH, Stockl D, Blaabjerg O, Pedersen B, Birkemose E, Thienpont L et al. Graphical interpretation of analytical data from comparison of a field method with reference method by use of difference plots. *Clin.Chem.* 1997;43(11):2039-46.
82. Mantha S, Roizen MF, Fleisher LA, Thisted R, Foss J. Comparing methods of clinical measurement: reporting standards for bland and altman analysis. *Anesth.Analg.* 2000;90(3):593-602.
83. Dewitte K, Fierens C, Stockl D, Thienpont LM. Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method-comparison studies: a critical investigation of its practice. *Clin.Chem.* 2002;48(5):799-801.
84. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat.Methods Med.Res.* 1999;8(2):135-60.
85. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982;143(1):29-36.
86. Beck JR, Shultz EK. The use of relative operating characteristic (ROC) curves in test performance evaluation. *Arch.Pathol.Lab Med.* 1986;110(1):13-20.
87. Muller SP, Reiners C. [Studies and recommendations on the design of ROC analyses in nuclear medicine]. *Nuklearmedizin* 1995;34(1):24-31.
88. Henderson AR. Assessing test accuracy and its clinical consequences: a primer for receiver operating characteristic curve analysis. *Ann.Clin.Biochem.* 1993;30 (Pt 6):521-39.
89. Feldt-Rasmussen U, Schleusener H, Carayon P. Meta-analysis evaluation of the impact of thyrotropin receptor antibodies on long term remission after medical therapy of Graves' disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1994;78(1):98-102.
90. Estienne V, Duthoit C, Costanzo VD, Lejeune PJ, Rotondi M, Kornfeld S et al. Multicenter study on TGPO autoantibody prevalence in various thyroid and non-thyroid diseases; relationships with thyroglobulin and thyroperoxidase autoantibody parameters. *Eur.J.Endocrinol.* 1999;141(6):563-9.
91. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States

- population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2002;87(2):489-99.
92. Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P, Barbesino G, Pinchera A. Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1990;71(3):661-9.
 93. Ericsson UB, Christensen SB, Thorell JI. A high prevalence of thyroglobulin autoantibodies in adults with and without thyroid disease as measured with a sensitive solid-phase immunosorbent radioassay. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1985;37(2):154-62.
 94. Kahaly GJ, Dienes HP, Beyer J, Hommel G. Iodide induces thyroid autoimmunity in patients with endemic goitre: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur.J.Endocrinol.* 1998;139(3):290-7.
 95. Dayan CM, Daniels GH. Chronic autoimmune thyroiditis. *N.Engl.J.Med.* 1996;335(2):99-107.
 96. Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr.Rev.* 1994;15(6):788-830.
 97. Weaver DK, Batsakis JG, Nishiyama RH. Relationship of iodine to "lymphocytic goiters". *Arch.Surg.* 1969;98(2):183-6.

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AIT	Autoimmunthyreoiditis
AK	Antikörper
al.	altere
APZ	antigenpräsentierende Zelle
AUC	Area under Curve
CLT	Chronisch lymphozytäre Thyreoiditis
CTLA-4	cytolytic T lymphocyte associated antigen-4
d.h.	das heißt
DZ	Dizygote Zwillinge
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FN	falsch negativ
FP	falsch positiv
ft3	freies Thyroxin
ft4	freies Triiodthyronin
HLA	human leucocyte antigen
HT	Hashimoto-Thyreoiditis
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule 1
ICOS	inducible co-stimulator
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
IRMA	immunoradiometrischer Assay
KR	Konkordanzrate
LFA-1	lymphocyte functional antigen 1
MB	Morbus Basedow
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
mU/l	Miliunits/Liter
MZ	Monozygote Zwillinge

µl	Mikroliter
n	Anzahl
nm	Nanometer
p	Wahrscheinlichkeit
PG	Pathogenese
pmol/l	Pikomol/Liter
RIA	Radioimmunoassay
RN	richtig negativ
RNS	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristik
RP	richtig positiv
RR	relative risk
SD	Schilddrüse
SNP	single nucleotide polymorphism
sog.	sogenannte(r)
TG	Thyreoglobulin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPO	Thyreoperoxidase = Thyroid Peroxidase
TRACE	Time Resolved Amplified Cryptate Emission
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
TZR	T-Zell-Rezeptor
u.a.	unter anderem
U/ml	Units/Milliliter
v.a.	vor allem
VarELISA	Variable Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
VK	Variationskoeffizient
vs.	versus

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Christoph Reiners für die Überlassung des Disserationsthemas, die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten in seinem Labor sowie für die Durchsichte der Manuskripte herzlich danken.

Des weiteren bedanke ich mich bei dem Betreuer der Arbeit, Herrn Prof. Dr. med. Markus Luster, für die vielfältige Unterstützung und die stete Ansprechbarkeit.

Besonderer Dank gilt weiterhin der medizinisch-technischen Assistentin Frau I. Grelle für ihre wertvolle labortechnische Arbeit und ihren engagierten persönlichen Einsatz.

Ausserdem möchte ich Herrn Dr. rer. nat. U. Mäder besonders danken, welcher mir bei statistischen Fragestellungen stets zur Seite stand.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katrin Wagner
Geburtsdatum: 15.03.1981
Geburtsort: Schweinfurt, Deutschland

Studium

zukünftig
(ab 11/2010) Assistenzärztin Innere Medizin, Kantonsspital St. Gallen

2/2010 – 9/2010 Assistenzärztin Psychiatrie, Psychiatrische Dienste Graubünden,
Klinik Waldhaus Chur

02/2008 – 1/2010 Assistenzärztin Innere Medizin
Regionalspital Grabs

10/2000 – 11/2007 Medizinische Fakultät Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Studium der Humanmedizin

11/2007 Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr

07/2006 – 08/2006 Chirurgie (Northland Health, Whangarei Hospital, Neuseeland)

10/2006 – 11/2006 Chirurgie (Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, Australien)

02/2007 – 05/2007 Innere Medizin (Spital Grabs, Schweiz)

05/2007 – 09/2007 Gynäkologie und Geburtshilfe (Leopoldina Krankenhaus,
Schweinfurt, Deutschland)

Famulaturen

02/2003 – 03/2003	Chirurgie (St. Johannis-Spital, Salzburg)
02/2004 – 03/2004	Gynäkologie und Geburtshilfe (St. Johannis-Spital, Salzburg)
07/2004 – 08/2004	Allgemeinmedizin (Allgemeinarztpraxis, Schweinfurt)
03/2005 – 04/2005	Nuklearmedizin (Julius-Maximilians-Universität, Würzburg)

Schulbildung

09/1991 – 05/2000	Mathematisch-naturwissenschaftliches und Neusprachliches Gymnasium in Schweinfurt
-------------------	--