

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

**Der Einfluss heterophiler Antikörper auf die Thyreoglobulinbestimmung bei
Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Katharina Wäschle
aus Freudenstadt
Würzburg, April 2010**

Referent: Prof. Dr. med. Chr. Reiners

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. M. Fassnacht-Capeller

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2010

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....
1 EINFÜHRUNG.....	1
1.1 ALLGEMEINES ZU SCHILDDRÜSENKARZINOMEN.....	1
1.2 SCHILDDRÜSENFUNKTION.....	2
1.2.1 Überblick.....	2
1.2.2 Schilddrüsenhormonsynthese.....	2
1.2.3 Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis.....	4
1.3 THYROGLOBULIN (Tg).....	6
1.3.1 Stellenwert des Thyreoglobulins als Tumormarker und Indikationen zur Thyreoglobulinbestimmung.....	6
1.3.2 Methodik der Thyreoglobulinbestimmung.....	7
1.3.3 Schwierigkeiten bei der Thyreoglobulinbestimmung.....	8
1.3.4 Wiederfindungsversuch.....	10
1.4 HETEROPHILE ANTIKÖRPER IM LABOR.....	11
1.5 FRAGESTELLUNG.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 VERSUCHSAUFBAU.....	14
2.2 ZUSAMMENSETZUNG DER UNTERSUCHUNGSGRUPPEN.....	14
2.2.1 Patientenkollektiv.....	14
2.2.2 Kontrollkollektiv.....	15
2.3 VERWENDETES MATERIAL.....	16
2.3.1 Testbeschreibung des Tg-plus.....	16
2.3.2 Testbeschreibung des anti-Tgn.....	17
2.3.3 Heterophilic blocking tubes- Scantibodies.....	18
2.3.4 Gamma Counter.....	19
3 ERGEBNISSE.....	20
3.1 ALLGEMEINES.....	20
3.2 ERGEBNISSE DER PROBEN.....	20
3.2.1 Ergebnisse der Tg-Bestimmung.....	20
3.2.2 Ergebnisse in der Wiederfindung.....	21
3.2.3 Ergebnisse bei der Thyreoglobulin-Antikörper Bestimmung.....	23
3.3 ERGEBNISSE IN DER KONTROLLGRUPPE.....	23
3.3.1 Ergebnisse der Thyreoglobulin-Messung in den Kontrollgruppen.....	24
3.3.2 Ergebnisse der Wiederfindung in den Kontrollgruppen.....	24
3.3.3 Ergebnisse der Tg-Antikörper-Messung in den Kontrollgruppen.....	26
4 DISKUSSION.....	27
5 FAZIT.....	33
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	34
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	35
DANKWORT.....
LEBENS LAUF.....

Abkürzungsverzeichnis

EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FIA	Fluoreszenzimmunoassay
HA	Heterophile Antikörper
HAB	heterophile antibody
IE	internationale Einheiten
IFMA	immunofluorometrisches Assay
ILMA	immunoluminunometrisches Assay
IRMA	immunoradiometrisches Assay
IU	Internationale Einheiten (international units)
kE	kilo Einheiten
LIA	Lumineszenzimmunoassay
RIA	Radioimmunoassay
T3	Triiodothyronin
T4	Thyroxin
TBG	thyroxinbindendes Globulin
Tg	Thyreoglobulin
Tg-AK	Thyreoglobulin-Antikörper
TRH	Thyreoliberin
TSH	Thyreotropin
WF	Wiederfindungsprobe

1 Einführung

1.1 Allgemeines zu Schilddrüsenkarzinomen

Schilddrüsenkarzinome zählen zwar zu den häufigsten endokrinen Neoplasien, insgesamt betrachtet nehmen sie mit weniger als 1% aller Tumorerkrankungen allerdings einen quantitativ eher geringen Stellenwert ein (Reiners 2003). Die Einteilung der Schilddrüsenkarzinome erfolgt nach histologischen Gesichtspunkten. Die große Masse, nämlich ca. 80% aller Schilddrüsenkarzinome, geht direkt aus den Thyreozyten hervor, und bildet die Gruppe der sog. differenzierten Karzinome. Zu dieser Entität gehören die papillären und follikulären Tumoren. Sie sind diejenigen Karzinome mit der besten Prognose und den besten therapeutischen Interventionsmöglichkeiten. Eine weitere Tumorform ist das medulläre Schilddrüsenkarzinom, welches aus den parafollikulären, calcitoninproduzierenden C-Zellen entsteht und zu den Tumoren neuroektodermalen Ursprungs gehört. In Abgrenzung dazu gibt es die sog. undifferenzierten oder anaplastischen Karzinome. Sie stellen den aggressivsten Tumortyp dar. Die Häufigkeitsverteilung der Schilddrüsenkarzinome beim Menschen zeigt sich wie folgt:

Tabelle 1.1: Häufigkeitsverteilung der Schilddrüsenkarzinome und die 5-Jahres-Überlebensrate (Schlumberger et Pacini 2006):

Tumortyp	Anteil	5-Jahres-Überlebens-Rate
Papilläre Karzinome	50-60%	>95%
Follikuläre Karzinome	20-30%	>90%
C-Zell- Karzinome	5-10%	>70%
Anaplastische Karzinome	5-10%	<5%

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vornehmlich mit den differenzierten Karzinomen, da diese als einzige mittels des Tumormarkers Thyreoglobulin erfasst und nachuntersucht werden können.

1.2 Schilddrüsenfunktion

1.2.1 Überblick

Die Schilddrüse ist ein lebenswichtiges endokrines Organ und nimmt eine zentrale Rolle in der Regulierung nahezu aller Stoffwechselprozesse ein. Das Schilddrüsengewebe besteht mikroskopisch aus Follikeln und setzt sich aus zwei Zelltypen zusammen: den Thyreozyten und den C-Zellen. Die Thyreozyten bilden das Follikelepithel und sind an der Schilddrüsenhormonsynthese beteiligt. Die C-Zellen liegen parafollikulär und sezernieren Kalzitinin. Damit spielen sie eine Rolle im Kalziumhaushalt.

Die Hauptaufgabe der Thyreozyten besteht in der komplexen Produktion der Hormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4). Thyreoglobulin dient dabei als Matrix für die Hormonproduktion. Schließlich werden die fertig synthetisierten Hormone am Thyreoglobulin als Trägermolekül gebunden und im Follikellumen gespeichert. Durch Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone nimmt die Schilddrüse Einfluss auf den Energiehaushalt des Menschen, sowie auf die Entwicklung und Reifung des Nervensystems, des Stütz- und Bewegungsapparates. So bewirkt ein Hormonüberschuss z.B. einen gesteigerten Grundumsatz und eine gesteigerte Wärmeproduktion, führt zu zentraler und nervöser Übererregbarkeit, hemmt die Proteinbiosynthese und fördert gleichzeitig den Eiweißkatabolismus sowie den gesamten Kohlenhydratstoffwechsel. Wird der gesteigerten Hormonsekretion nicht entgegengewirkt, zehrt sich der Körper vollständig aus. Umgekehrt führt ein längerfristig unbehandelter Schilddrüsenhormonmangel zum hypothyreoten Koma und zum Tod (Hampel 2002).

Der Schilddrüsenhormonhaushalt bedarf also einer höchst sensiblen und fein abgestimmten Regulation. Dies wird physiologischerweise durch den Hypothalamus-Hypophysen-Regelkreis gewährleistet.

1.2.2 Schilddrüsenhormonsynthese

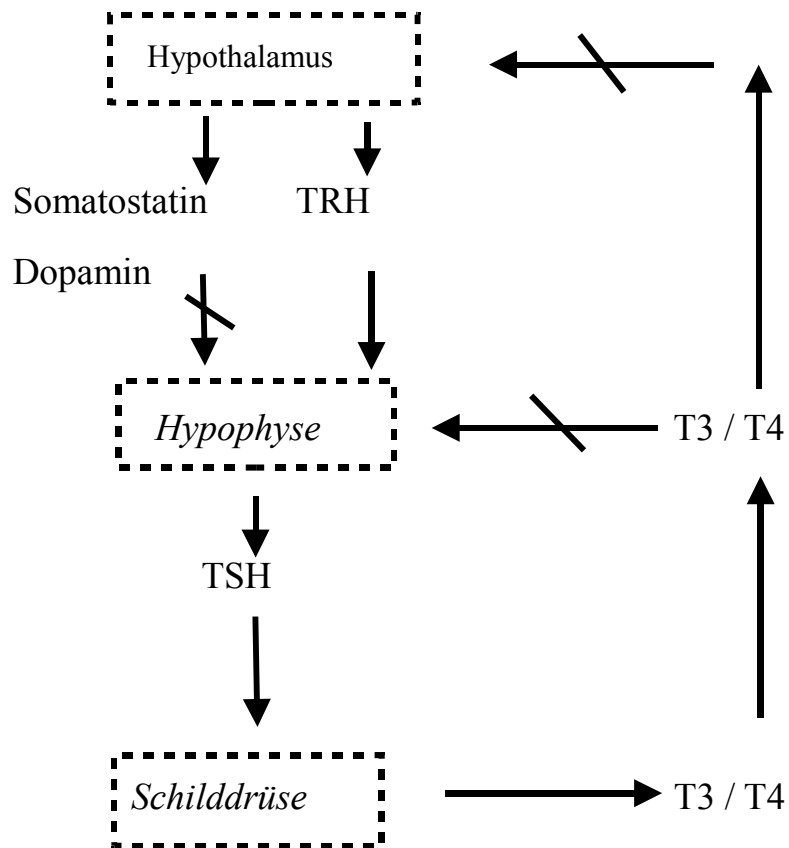
Wie bereits erwähnt gibt es zwei Schilddrüsenhormone: Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4). Die gesunde Schilddrüse produziert täglich ca. 80-100µg T4 und 5-10µg

T3. Die Biosynthese der Schilddrüsenhormone, die eine ausreichende Jodzufuhr voraussetzt, erfolgt in mehreren Schritten: Erstens der Aufnahme der Jodid-Ionen aus der Blutbahn in die Epithelzellen (Thyreozyten) und zweitens dem Transport aus den Thyreozyten in das Follikellumen. Neben dem Jod ist die Aminosäure Tyrosin ein zentraler Baustein in der Hormonproduktion. Als weiterer Schritt ist die Biosynthese des Thyreoglobulins als Trägermolekül in den Thyreozyten und nachfolgend dessen Sekretion ins Follikellumen erforderlich. Nur so, in gebundener Form, können die lipophilen und damit primär nicht speicherbaren Hormone konserviert und für den Bedarf bereitgestellt werden.

Das durch die Nahrung dem menschlichen Organismus zugeführte Jod wird in Form von Jodid-Ionen in die Follikelepithelzellen aufgenommen. Treibende Kraft sind hierbei ATPase abhängige Natrium-Jodid-Symporter, die einen aktiven Transport gegen das vorherrschende Konzentrationsgefälle ermöglichen. Da die Natrium-Jodid-Symporter, welche sich z.B. auch in Speichel-oder Brustdrüsenzellen befinden, vor allem an den Thyreozyten vorhanden sind, kann das vorhandene Jod dort in den Zellstoffwechsel eingreifen (Rodriguez 2002). In den Thyreozyten wird das Jodid dann unter dem Einfluß von Peroxidase zu elementarem Jod oxidiert (Jodination), um daraufhin im Follikellumen in das Tyrosingerüst eingebaut werden zu können (Jodisation). Als nächster Schritt geschieht nun im Kolloid des Follikellumens die enzymatische Synthese zu den Haupthormonen Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) (Hampel 2002). Im Thyreoglobulin gespeichert können die Hormone nun je nach Bedarf an die Blutbahn abgegeben werden. Durch Pinozytose wird das Kolloid dazu wieder von den Epithelzellen aufgenommen. In den Thyreozyten wird das Thyreoglobulin abgebaut, so dass die Hormone T3 und T4 in freier Form ins Blutgefäß diffundieren können (Schmidt 1999). Im Blut erfolgt die Hormonbindung dann hauptsächlich an dem spezifisch thyroxinbindendem Globulin (TBG), aber auch an Albumin und Präalbumin (Renz-Polster 2006). Lediglich der freie, nicht proteingebundene Anteil des Hormons ist biologisch aktiv und unterliegt der Rückkopplungsregulation. Für die Praxis ist daher insbesondere die Bestimmung der so genannten freien Hormone sinnvoll (Horn 2002).

1.2.3 Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis

Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone T3 und T4 geschehen nicht willkürlich sondern unterliegen dem hypothalamisch-hypophysären Regelkreis (s. Abb. 1.2.3). Der Hypothalamus, als zentrales Steuerungsorgan, erhält über die T3-Blutkonzentration Impulse, um eventuell regulativ in den Hormonstatus der Schilddrüse einzugreifen. Bei niedrigem T4-Spiegel sendet er durch das Tripeptid Thyreoliberin (TRH) Signale an die Hypophyse. Die Hypophyse ihrerseits reagiert mit der Ausschüttung des im Hypophysenvorderlappens gebildeten Thyreotropins. Dieses Thyreotropin (TSH) bewirkt an der Schilddrüse durch zwei Mechanismen eine Steigerung der Hormonsekretion: Zum einen durch vermehrte Freisetzung der Hormone aus dem Kolloid und zum anderen durch vermehrte Aufnahme von Jodid-Ionen. Eine Nebenwirkung des stimulierenden Einflusses des TSH ist die Größenzunahme der Schilddrüse, klinisch manifest als Struma. Diese wird durch den wachstumstimulierenden Effekt auf die Thyreozyten hervorgerufen (Horn 2002).



- TSH = thyroid stimulating hormone
 TRH = thyrotropin releasing hormone
 T3 = Triiodthyronin
 T4 = Thyroxin
 → = Stimuliert
 →/ = Inhibiert

Abb. 1.2.3: Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis

1.3 Thyreoglobulin (Tg)

Tg ist ein schilddrüsenpezifisches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 660.000 Dalton (Spencer 1995). Es wird ausschließlich von Thyreozyten im normal differenzierten Schilddrüsengewebe oder von Gewebe differenzierter Schilddrüsenkarzinome gebildet und findet seine physiologische Funktion wie oben beschrieben in der Synthese und Speicherung der Schilddrüsenhormone (Reiners 1983). Als extrazelluläre Speicherform von T3 und T4 ist es Hauptbestandteil des intrafollikulären Kolloids (Horn 1999).

1.3.1 Stellenwert des Thyreoglobulins als Tumormarker und Indikationen zur Thyreoglobulinbestimmung

Seit der Entwicklung hochspezifischer Nachweismethoden, insbesondere radioimmunologischer Assays in den 60er Jahren, ist es möglich humanes Tg im Serum von Gesunden zu bestimmen. Beim Schilddrüsengesunden liegt der Referenzbereich in Deutschland dabei bei ca. 0 bis 50 ng/ml (Görges 2008).

Erhöhte Werte finden sich bei regressiven Veränderungen, Zellnekrosen und auch beim metastasierten differenzierten Schilddrüsenkarzinom. Bei den meisten benignen Schilddrüsenerkrankungen lassen sich ebenfalls erhöhte Serum-Tg-Spiegel finden, ohne dass dadurch Rückschlüsse auf die Art der Erkrankung möglich wären (Reiners 1983). Das Ausmaß erhöhter Tg-Spiegel korreliert nicht mit der Art der Schilddrüsenerkrankung. Somit ist Tg nicht zum Tumorscreening verwendbar sondern findet seine wesentliche Bedeutung in der Nachsorge bei Patienten mit papillären oder follikulären Schilddrüsenkarzinomen (Görges 2003). Nach erfolgreicher totaler Thyreoidektomie und Entfernung des gesamten Restgewebes durch eine Radioiodtherapie darf sich bei diesen Patienten kein Tg im Blut mehr nachweisen lassen (Ruiz-Garcia 1991). Zeigen sich in der Verlaufskontrolle dennoch positive Messwerte, ist dies als Hinweis auf ein Persistieren des Tumors, auf ein Rezidiv oder auf das Vorliegen von Metastasen zu deuten (Schicha 2007). Weitere Indikationen für die Thyreoglobulinbestimmung sind laut der aktuellen Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin die konnatale Hypothyreose sowie die Hyperthyreosis factitia

(Dietlein 2003).

1.3.2 Methodik der Thyreoglobulinbestimmung

Für die Thyreoglobulinbestimmung stehen prinzipiell zwei Nachweisverfahren zur Auswahl. Als Standardmethoden sind dabei der Immunoradiometrische Assay (IRMA) oder der Immunochemolumineszenz Assay (ICMA) zu wählen (Dietlein 2003; Zöphel 2003).

Reaktionsprinzip der Immunoassays

Bei den Immunoassays wird zwischen dem kompetitiven Assay und dem nicht-kompetitiven Assay unterschieden. Beiden gemein ist die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Dabei ist das Bindungsreagenz ein spezifischer Antikörper, der mit dem nachzuweisenden Analyt, in der Funktion eines Antigens einen reversiblen Immunkomplex ein:



Die Antikörper gewährleisten über die spezifische Bindung mit dem Antigen (z.B. Thyreoglobulin) die Quantifizierung des Analyten. Um die eingegangenen Bindungen messen zu können, muss entweder das Antigen oder der Antikörper mit einer Markierung versehen werden. Je nach Markierung und nachfolgender Messung werden die kompetitiven Assays in Radio-, Enzym-, Fluoreszenz- oder Lumineszenzimmunoassay (RIA, EIA, FIA, LIA) unterschieden. Bei den nicht-kompetitiven Assays unterteilt man in IRMA, ELISA, IFMA oder ILMA (Kuwert 2007).

Prinzip der Analytbestimmung beim kompetitiven Assay

Der kompetitive Assay stellt das klassische Nachweisverfahren dar: Dem zu untersuchendem Serum wird eine definierte Menge markierten Antigens (Tracer) zugesetzt. Dabei sollte der Tracer möglichst dem Analyten entsprechen. Nachfolgend wird ein spezifischer Antikörper in geringerer Konzentration beigegeben. Nun konkurrieren markiertes und unmarkiertes Antigen (Analyt) in gleichem Maße um die Antikörperbindungsstelle. Damit verhält sich die anschließende gemessene

Antikörperbindung des Tracers invers zur Konzentration des Analyts. Nach Trennung des antikörpergebundenen vom freien markierten Antigen wird der gebundene Anteil bestimmt. Die Signalaktivität verhält sich umgekehrt proportional.

Prinzip der Analytbestimmung beim nicht-kompetitiven Assay

Dieses Verfahren wird auch Sandwich-Assay genannt. Hier bindet ein markierter und ein unmarkierter Antikörper an unterschiedliche Epitope des Antigens, wobei der nicht markierte zumeist an einer Festphase (Reagenzglas) gebunden ist. Im Gegensatz zum kompetitiven Assay liegt hierbei ein Antikörperüberschuß vor. Dies hat zur Folge, dass jedes Antigenmolekül eine Bindung mit einem Festphasenantikörper und einem freien, radioaktiv markierten Antikörper eingeht. Dabei entsteht der sog. Sandwich-Immunkomplex. Je höher die Analytkonzentration im Serum desto größer die Standardkurve. Mit diesem Verfahren können damit auch sehr geringe Mengen Analytkonzentrationen bestimmt werden.

1.3.3 Schwierigkeiten bei der Thyreoglobulinbestimmung

Trotz erheblicher technischer Weiterentwicklung der verfügbaren Assays gibt es nach wie vor Faktoren die methodische Probleme bei der Tg-Bestimmung aufwerfen (Rendl 2005):

1. Durch fehlende Standardisierung der Assays ist eine unmittelbare Vergleichbarkeit der gemessenen Werte nicht möglich.
2. Beim Auftreten eines sog. Highdose-Hook-Effekt werden trotz hoher Tg-Konzentrationen inadäquat niedrige Tg-Werte gemessen.
3. Durch Persistieren von Autoantikörpern gegen das Thyreoglobulin kann es zu Interferenzen und damit zu einem verfälschten Messergebnis kommen.

Standardisierung

Trotz internationaler Tg-Referenzpreparationen (CRM-457) kommt es bei Messungen derselben Seren mit unterschiedlichen Messmethoden z.T. zu erheblich abweichenden Werten (Spencer 2006; Schlumberger 2007). Erklärungen hierfür finden sich zum einem darin, dass die Hersteller unterschiedliche Antikörper als Festphasensubstrat verwenden und damit an unterschiedlichen Epitopen angreifen. Zum anderen kann es zu sog. Matrixeffekten kommen, die sich v.a. beim Verdünnen von Standards und Patientenseren manifestieren können. Folglich muss in der Verlaufskontrolle bei Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen im Rahmen der Nachsorge stets derselbe Assay verwendet werden. Nur dann ist eine Vergleichbarkeit der Werte gewährleistet (Pacini 2006; Cooper 2006).

Highdose-Hook-Effekt

Der Highdose-Hook-Effekt beschreibt das Phänomen eines falsch-niedrigen gemessenen Tg-Wertes durch inadäquat niedrige Detektionssignale. Dieser Effekt kann auftreten, wenn bei exorbitant hohen Tg-Konzentrationen (z.B. bei einem metastasierten Schilddrüsenkarzinom) die Bindungskapazität der Fangantikörper überschritten ist und für den markierten Antikörper keine freien Bindungsstellen mehr zur Verfügung stehen. Eine deutlich eingeschränkte Wiederfindung (<70%) oder sogar negative Wiederfindungswerte können als Hinweis auf ein solches Phänomen interpretiert werden. Um trotz Hook-Effektes eine Aussage treffen zu können, muss die Probe in einem zweiten Verdünnungsschritt nochmals gemessen werden. Bei den meisten Zwei-Schritt-Assays, inklusive dem in diese Studie verwendeten Assay, tritt dieses Problem allerdings nicht mehr auf (Morgenthaler 2002).

Tg-Autoantikörper-Wechselwirkung

Wie die Arbeitsgruppe um *Spencer et al.* bereits 1996 herausfinden konnte, finden sich bei Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom doppelt so häufig Tg-Antikörper im Serum wie in der Allgemeinbevölkerung. Da Thyreoglobulin-Antikörper

(Tg-AK) heterophiler Natur sind, entziehen sie sich sowohl dem Wiederfindungstest (s.u.) als auch einer verlässlichen Antikörpertiter-Bestimmung. Somit ist eine verwertbare Aussage über mögliche Interferenzen nicht möglich. Fakt ist, dass heterophile Antikörper zu einer gestörten Signaldetektion und damit zu einem falsch hohen oder falsch niedrigen Thyreoglobulinwert führen. Damit ist bei Patienten mit positiven Tg-Antikörpern oder gestörter Wiederfindung eine Tg-gestützte Nachsorge nicht suffizient (Spencer 1996).

1.3.4 Wiederfindungsversuch

Um methodische Verfälschungen wie die oben beschriebene Antikörper-Interferenz aufzudecken, sollte jeder Tg-Wert grundsätzlich mittels eines sog. Wiederfindungstests nachuntersucht werden (Reiners 1983). Dazu werden neben der Originalprobe in einer Parallelbestimmung 100µl des zu untersuchenden Serums zusätzlich einer definierten Menge des Puffers mit der Wiederfindeprobe R (bekannte Tg-Menge) versetzt und im selben Assay mitbestimmt. Wenn sich keine Antikörper gegen Tg im Serum befinden beträgt der Wiederfindungswert in etwa 100%. Unter Berücksichtigung von Pipettierungenauigkeiten gelten in der Laborpraxis Wiederfindungswerte zwischen 70-130% als korrekt. Werte unter 70% oder über 130% sprechen für eine gestörte Wiederfindung und nehmen dem ermittelten Tg-Wert in der Originalprobe seine Validität. Aufgrund z.T. erheblicher methodischer Einwände, wie von *Spencer et al.* beschrieben, ist der Wiederfindungstest allerdings nicht generell akzeptiert.

1.4 Heterophile Antikörper im Labor

Unter heterophilen Antikörpern (HA) versteht man Antikörper der IgM Klasse die in ihrer Spezifität schlecht zu definieren sind. Sie zeigen eine breite Reaktivität, die sich z.B. gegen erythrozytäre Antigene verschiedenster Spezies richtet (Kaplan 1999). Dabei ist ihre Affinität in der Regel gering. Heterophile Antikörper können bei Immunoassays zu verfälschenden Ergebnissen führen. In der Regel sind diese Antikörper monospezifisch und richten sich gegen tierische Antigene. Sie werden gehäuft bei Personen gefunden die mit Tieren umgehen. Die Häufigkeit der HA kann sich in Patientenproben auf bis zu 40% belaufen und resultiert zumeist auf der Nahrungsaufnahme von Milch und Fleisch. Bei den Sandwich-Immunoassays können die HA durch Brückenbildung zwischen dem Fangantikörper und dem zweiten, markierten Antikörper zu falsch hohen Messergebnissen führen. Ebenso kann es auch zu falsch negativen Resultaten kommen, wenn die HA an den Fangantikörper oder an den zweiten, markierten Antikörper binden und diese somit blockieren (Lothar 2005).

Um diese Interferenz zu verhindern, werden in den Immunreagenzien der two-site assays nicht-immune γ -Globulin-haltige Seren als Blocking-Reagenz hinzugegeben, um die Antikörper zu binden.

Das nachfolgende Schema veranschaulicht einen herkömmlichen sandwich immunoassay (s. Kapitel 1.3.2), bei dem die Konzentration des Analysats ausschlaggebend für das positive Testergebnis ist:

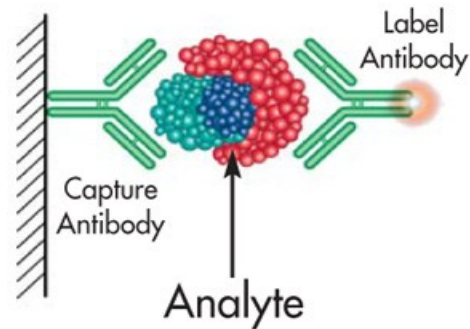


Abb. 1.4.1: Schema eines Antigen-Antikörper-Komplexes

(Quelle: Scantibodies inc., Website)

Dieses Schema zeigt, wie interferierende Antikörper in einem sandwich immunoassay zu einem falsch hohen Testergebnis führen können:

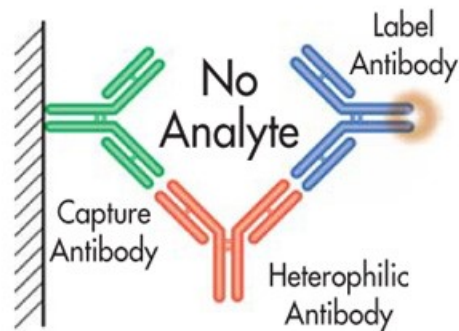


Abb. 1.4.2: Schema einer Interferenz durch heterophile Antikörper

(Quelle: Scantibodies inc., Website)

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit beschäftige ich mich mit dem Einfluss heterophiler Antikörper auf die Bestimmung von Thyreoglobulin in der Nachsorge beim Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom. Wie bereits beschrieben kann es durch das Vorhandensein dieser Antikörper zu verfälschten Ergebnissen bei den Messungen des Thyreoglobulinwerts kommen und damit Anlass zu falschen Interpretationen hinsichtlich der vorausgegangenen Therapie sein. Da in der Literatur unterschiedliche Daten über einen HA-Einfluss in der Tg-Messung vorliegen, haben wir in unserer Studie untersucht, inwieweit bei Patienten mit einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom ein Einfluss durch heterophile Antikörper in der Tg-Bestimmung zu beobachten ist.

Als Nebenaspekt haben wir einen Vergleich zwischen unserer Studiengruppe und der Kontrollgruppe mit anderen Schilddrüsenerkrankungen sowie Allergikern angestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Um einen möglichen Einfluss von heterophilen Antikörpern auf die Thyreoglobulinbestimmung nachzuweisen, haben wir 201 Blutseren von Patienten mit einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom auf deren Thyreoglobulingehalt hin untersucht. Außerdem stellten wir Vergleichsmessungen mit einer heterogenen Kontrollgruppe an, um unser Ergebnis eventuell untermauern zu können. In einer Parallelbestimmung wurden mittels eines Antikörpersuchtests die vorhandenen Antikörper gegen Thyreoglobulin ermittelt. Damit kann sichergestellt werden, dass es sich bei den übrigen interferierenden Antikörpern um Fremdanantikörper, also heterophile Antikörper, handelt. Um feststellen zu können ob der verwendete Test für diese Antikörper störanfällig ist, und ob damit die Tg-Werte verfälscht werden, wurden die Blutproben in einer weiteren Messung in sogenannten blocking tubes (Scantibodies) vorbehandelt. Ziel unserer Messungen war es, einen Vergleich der ermittelten Werte anzustellen, unterschiedliche Messergebnisse zu erkennen und auf den möglichen Einfluss heterophiler Antikörper zu prüfen. Auffällige, also über das 2,77-fache der Standardabweichung hinausgehende Ergebnisse, haben wir in einem zweiten Probendurchlauf nochmals nachgemessen um damit eventuelle Pipettier- und/oder Messungenauigkeiten ausschließen zu können.

2.2 Zusammensetzung der Untersuchungsgruppen

Insgesamt wurden 253 Seren untersucht. Davon stammten 201 Seren von Patienten mit einem papillären oder follikulären Schilddrüsenkarzinom. Die restlichen 52 Seren stellten eine heterogene Vergleichsgruppe dar.

2.2.1 Patientenkollektiv

In die Untersuchungsreihe wurden insgesamt 201 Patienten unselektiert, beiderlei Geschlechts, mit den Diagnosen eines papillären oder eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms eingeschlossen. Alle Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der

Messungen in der Klinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg in regelmäßiger Nachsorge nach erfolgter Thyreoidektomie.

Das Patientenkollektiv zählte 64 Männer und 137 Frauen. Bei den 153 Patienten mit einem papillären Schilddrüsenkarzinom handelte es sich um 45 Männer und 108 Frauen. Unter den 47 Patienten mit einem follikulären Schilddrüsenkarzinom waren 19 männlich und 28 weiblich.

Tabelle 2.2.1: Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Patienten	Follikuläres Karzinom	Papilläres Karzinom	unbekannt	Gesamt	Alter im Ø in Jahren
weiblich	28	108	1	137	52
männlich	19	45	0	64	46
Gesamt	47	153	1	201	48

2.2.2 Kontrollkollektiv

Die Kontrollgruppe setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2.2.2: Zusammensetzung der Kontrollgruppe

Kontrollgruppen	Anzahl der Patientenproben	männlich	weiblich	Alter im Ø in Jahren
Patientenproben mit einer Hashimotothyreoiditis	10	0	10	52
Patientenproben mit einer Tg-AK Erhöhung	10	1	9	37
Patientenproben mit einer Euthyreose	10	2	8	Nicht verfügbar
Patientenproben von Allergikern	3	3	0	29
Patientenproben mit einer schlechten Wiederfindung mit oder ohne Tg-AK	19	5	14	44
Gesamt	52	11	41	43

2.3 Verwendetes Material

2.3.1 Testbeschreibung des Tg-plus

Für die quantitative Bestimmung des humanen Thyreoglobulins verwendeten wir einen in der klinischen Praxis gebräuchlichen Test der Firma B.R.A.H.M.S: den Tg-plus Test. Dieser Test gehört zu den immunoradiometrischen Zweischnitt-Assays, bei denen zwei antigenspezifische Antikörper im Überschuss eingesetzt werden und das Antigen (Thyreoglobin) an jeweils verschiedenen Determinanten erkennen (s.o.). Im Test enthalten ist eine Pufferlösung, welche heterophile Antikörper adsorbiert, und eine mögliche Interferenz mit dem zu untersuchenden Agens minimieren soll. In einem ersten Inkubationsschritt bindet das Antigen an dem auf der Innenseite fixierten Antikörper. Durch anschließendes zweimaliges Waschen werden Serumbestandteile und überschüssige Antigene herausgewaschen. Im zweiten Inkubationsschritt entsteht nun der bereits oben beschriebene Sandwicheffekt, wobei der radioaktive Tracer mit dem gebundenen Antigen einen Komplex eingeht und an der Röhrchenwand haftet. Der Überschuss des Tracers wird durch dreimaliges Waschen entfernt. Anschließend wird die Radioaktivität der Probenröhrchen gemessen, die der Tg-Konzentration der jeweiligen Proben direkt proportional ist.

Tabelle 2.3.1: Inkubationsschema Tg-plus

1	Nummerieren der Teströhrchen		S1-S6	K1;K2	D	P1...Pn	WF	
2	Pipettieren	Standards S1-S6	µl	100	-	-	-	-
		Kontrollen K1; K2	µl	-	100	-	-	-
		Tg-freies Serum G	µl	-	-	100	-	-
		Patientenproben 1....n	µl	-	-	-	100	100
3	Pipettieren	Puffer D	µl	200	200	-	200	-
		Wiederfindungsprobe WF	µl	-	-	200	-	200
4	Inkubieren	Auf einem Vibrationsmischer kurz schütteln, um eine gute Durchmischung sicherzustellen. 18+/- h ohne Schütteln bei Raumtemperatur (17-27°C) inkubieren.						
5	Pipettieren	Waschlösung	ml	2	2	2	2	2
6	Dekantieren	Dekantieren und auf Zellstoff abtropfen lassen. Die Schritte 5 und 6 noch einmal wiederholen.						
7	Pipettieren	Tracer A	µl	200	200	200	200	200
8	Inkubieren	2 h ± 30 min unter Schütteln (170-300 UpM) bei Raumtemperatur (17-27°C) inkubieren.						
9	Pipettieren	Waschlösung	ml	2	2	2	2	2
10	Dekantieren	Dekantieren und auf Zellstoff abtropfen lassen. Die Schritte 9 und 10 noch zweimal wiederholen und die Röhrchen anschließend mindestens 10 min über Kopf auf Zellstoff abtropfen lassen.						
11	Messen der Radioaktivität	Empfohlene Messzeit: 1 Minute						

2.3.2 Testbeschreibung des anti-Tg_n

Zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern gegen Thyreoglobulin wurde von uns der anti-Tg_n Test der Firma B.R.A.H.M.S eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen kompetitiven Radioimmunoassay, bei dem humane polyklonale anti-Tg-Autoantikörper als Festphasenantikörper verwendet werden. Diese entsprechen den zu bestimmenden Autoantikörpern der Patientenseren. Nach Hinzugabe des Tracers, mit Jod-125 markiertes Thyreoglobulin, konkurrieren nun die Autoantikörper aus der Probe mit den immobilisierten Antikörpern an der Röhrchenwand um die gleichen Epitope. Die entstandenen Probenautoantikörper-Tracer-Komplexe werden, da sie nicht an die Röhrchen binden, durch einen Waschvorgang herausgewaschen. Nach zweimaligem Waschen wird dann die Radioaktivität der Röhrchen gemessen. Sie ist im Gegensatz zum oben geschilderten Tg-plus Test umgekehrt proportional zur anti-Tg-Konzentration der jeweiligen Probe. Auch bei diesem Test wird anhand der mitgelieferten Standards

(Lösungen mit einem definierten Maß an Autoantikörpern) ein Radioaktivitäts-Konzentrations-Profil erstellt, auch Standardkurve genannt. Über die gemessene Radioaktivität der Patientenseren wird deren jeweilige anti-Tg-Konzentration ermittelt. Beide Tests enthalten Bestandteile die den Einfluss heterophiler Antikörper minimieren sollen, und deren genaue Zusammensetzung dem jeweiligen Firmengeheimnis unterliegt (siehe dazu auch Kapitel 2.3.3).

Tabelle 2.3.2: Inkubationsschema des anti-Tg_n

1	Nummerieren der Teströhrchen		T	0	1-5	6 etc.	
2	Pipettieren	Nullstandard	μl	-	20	-	-
		Standards	μl	-	-	20	-
		Patientenproben	μl	-	-	-	20
3	Pipettieren	Tracer	μl	200	200	200	200
4	Inkubieren	2 h ± 30 min bei 170-300 U/min bei RT (17-27°C) schütteln.					
5	Pipettieren Dekantieren	Waschlösung	ml	-	2	2	2
6	Waschschritt wiederholen	und die Röhrchen anschließend mind. 10 min über Kopf abtropfen lassen.					
7	Messen der Radioaktivität	Empfohlene Messzeit: 1 Minute					

2.3.3 Heterophilic blocking tubes- Scantibodies

Um den störenden Einfluss der Fremdantikörper auszuschalten, die bei über 25% der Patienten mit einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom nachweisbar sind und unter deren Einfluss es zu falsch hohen aber auch zu falsch niedrigen Testergebnissen kommen kann, ist es wichtig diese durch die sogenannten blocking tubes zu eliminieren. Bei den blocking tubes handelt es sich um spezielle Reagenzien, die eine bestimmte Menge an Antikörper-bindendem Substrat enthalten und so die im Testserum vorhandenen Antikörper binden und inaktivieren. Die genaue Zusammensetzung dieser Substrate unterliegt einem jeweiligen Betriebsgeheimnis und ist somit nicht bekannt. Wie verwendeteten in unserem Versuch blocking tubes der Firma Scantibodies.

2.3.4 Gamma Counter

Als radiologisches Messinstrument verwendeten wir den Wizard Gamma-Counter der Firma Perkin Elmer. Bei dem Gamma Counter handelt es sich um einen in der Forschung und im klinischen Alltag gebräuchlichen Szintillations-Detektor zur Messung von Gammastrahlung. Dabei können bis zu zehn Probenröhrchen auf einmal gemessen werden. Vor jeder Messung wird durch einen Null-Probe-Lauf sichergestellt, dass alle zehn Kristalle im Innern des Counters voll funktionsstüchtig und die zehn leeren Röhrchen den gleichen Kalibrierungswert erreichen.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeines

Bei allen 201 Patientenseren war genug Material vorhanden, um sowohl die Tg-Messungen als auch die Antikörper-Messungen inklusive der Wiederfindungsproben erfolgreich durchzuführen und dabei ein interpretierbares Ergebnis zu erlangen.

3.2 Ergebnisse der Proben

3.2.1 Ergebnisse der Tg-Bestimmung

Bei der Tg-Bestimmung zeigten 199 Proben keine Abweichung zwischen der ersten und der zweiten Messung. Sechs Proben zeigten in der Thyreoglobulinbestimmung auffällige Werte nach der ersten Messung. So variierten die Tg-Werte in diesen Proben vor und nach dem Blocking zwischen 2,22 und 8,19 ng/ml. Im Mittel ergibt dies einen Wert von 5,18 ng/ml Abweichung. Nach der wiederholten Messung, sinkt dieser Mittelwert auf 2,26 ng/ml und liegt damit im Rahmen der normalen Messungengenauigkeit (2,77-fache Standardabweichung). Siehe hierzu Abbildung und Tabelle 3.2.1

Abb. 3.2.1: Verhältnis der Thyreoglobulin Messwerte vor und nach Blocking.

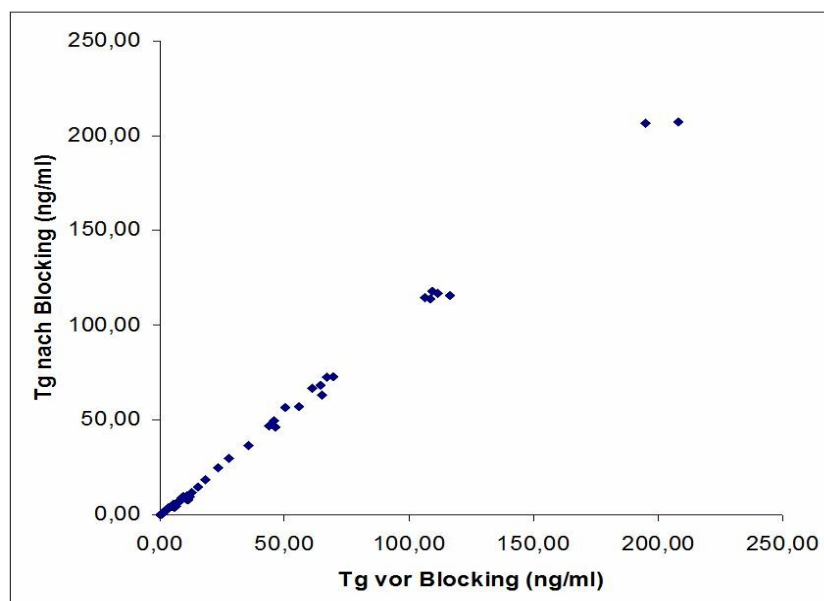


Tabelle 3.2.1: Übersicht über die TG-Werte:

Patientenprobe	Messung	Tg vor dem Blocking in ng/ml	Tg nach dem Blocking in ng/ml	Differenz in ng/ml	Absolute Differenz in %
Nr. 19	1	43,90	47,08	+3,18	7,24
	2	46,56	46,10	-0,46	0,99
Nr. 25	1	11,49	8,08	-3,41	29,68
	2	10,90	7,90	-3,00	27,52
Nr. 105	1	109,63	117,82	+8,19	7,47
	2	116,50	115,90	-0,60	0,52
Nr. 114	1	6,52	4,30	-2,22	34,05
	2	6,00	3,90	-2,10	35,00
Nr. 140	1	50,47	56,69	+6,22	12,32
	2	55,50	56,80	+1,30	2,34
Nr. 201	1	106,58	114,44	+7,86	7,37
	2	108,70	113,90	+5,20	4,78

Bei zwei Proben war auch bei der wiederholten Messung ein signifikanter Unterschied in der Tg-Messung nach dem Blocking zu beobachten.

Bei der Patientenprobe Nr. 25 beträgt der Tg-Wert vor dem Blocking 11,49 ng/ml, und nach dem Blocking 8,08 ng/ml. Der Ausgangswert ist damit um 3,41 ng/ml (29,3%) gefallen. In der wiederholten Messung fielen die Werte dann von 10,90 ng/ml vor dem Blocking auf 7,90 ng/ml nach dem Blocking, und zeigten damit erneut einen auffällig starken Abfall von 3 ng/ml (27,5%); somit bestätigte sich der auffällige erste Messwert.

In der zweiten Probe, Nr. 114, ist eine ähnliche Veränderung der Tg-Werte zu erkennen: Auch hier kam es in beiden Messdurchläufen nach dem Blocking zu einem signifikanten Abfall der Tg-Werte. Hier konnte in der ersten Messung ein Abfall von 2,22 ng/ml (34%) bei ursprünglichen 6,52 ng/ml auf 4,30 ng/ml beobachtet werden, und in der Messwiederholung ein Abfall um 2,10 ng/ml (35%) von ursprünglich 6,00 ng/ml auf 3,90 ng/ml.

3.2.2 Ergebnisse in der Wiederfindung

Die Ergebnisse in der Wiederfindung der 201 Patientenproben lagen, bis auf eine Ausnahme (Patient Nr. 151), im Referenzbereich mit 70-130% der Ausgangswerte. Im

Durchschnitt lag die Wiederfindung bei 102,97% und reichte von 56% bis 108%.

Bei der Wiederfindung wurden zehn Patientenserum nochmals nachgemessen. In der ersten Messung wurde eine Abweichung von durchschnittlich 8,09% ermittelt, in der wiederholten Messung relativierte sich dieser Mittelwert auf 3,27%. Lediglich bei einem Serum blieb ein Unterschied größer als das 2,77-fache der Standardabweichung in der Wiederholungsmessung bestehen. Bei einem weiteren Blutserum (Patient Nr. 122) veränderten sich die Vorzeichen, so dass bei der ersten Messung noch ein Abfall des Tg-Wertes von 101,0% auf 92,6% zu erkennen war, in der wiederholten Messung dann jedoch ein Anstieg von 93,7% auf 100,7% auffällig wurde; schlussendlich sind diese Messungen im Schnitt jedoch als unauffällig zu werten.

Abb. 3.2.2: Wiederfindung vor und nach dem Blocking

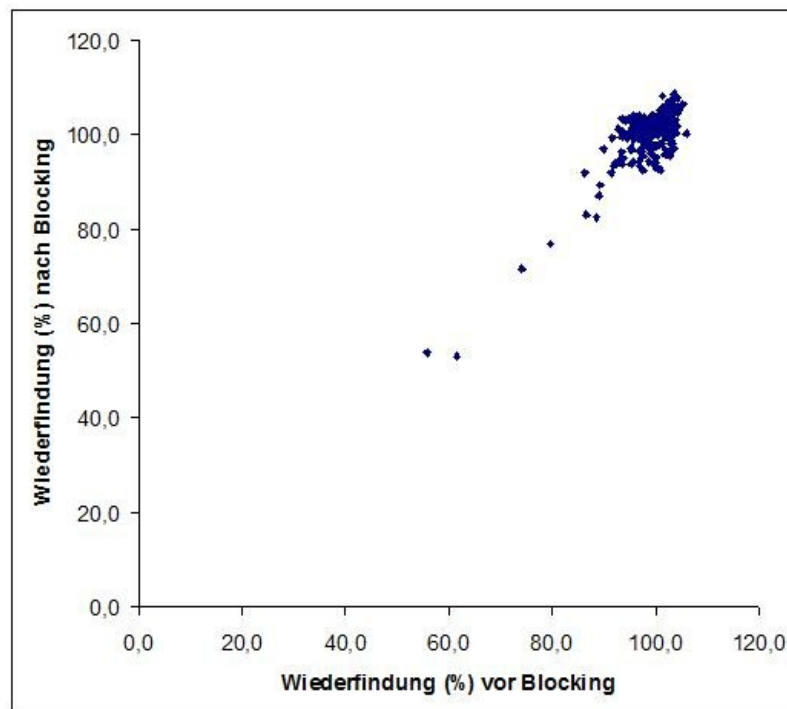


Tabelle 3.2.2: Übersicht über die Wiederfindungswerte

Patientenprobe	Messung	WF vor dem Blocking in %	WF nach dem Blocking in %	Differenz in %	Absolute Differenz in %
Nr. 45	1	94,0	103,1	+9,1	9,7
	2	102,6	101,4	-1,2	1,2
Nr. 76	1	92,9	101,2	+8,3	8,9
	2	99,8	102,2	+2,4	2,4
Nr. 85	1	93,4	100,7	+7,3	7,8
	2	98,3	101,7	+3,4	3,5
Nr. 109	1	96,9	104,0	+7,1	7,3
	2	100,6	101,3	+0,7	0,7
Nr. 122	1	101,0	92,6	-8,4	8,3
	2	93,7	100,7	+7,0	7,5
Nr. 151	1	61,4	53,1	-8,3	13,5
	2	55,8	54,0	+1,8	3,3
Nr. 182	1	96,6	103,7	+7,1	7,3
	2	99,2	96,1	-3,1	3,1
Nr. 193	1	95,8	104,1	+8,3	8,7
	2	99,1	99,8	-0,7	0,7
Nr. 195	1	93,6	103,5	-9,9	10,6
	2	91,5	99,4	+7,9	8,6
Nr. 199	1	101,3	108,4	-7,1	7,0
	2	96,9	101,4	+4,5	4,6

3.2.3 Ergebnisse bei der Thyreoglobulin-Antikörper Bestimmung

Eine nennenswerte Steigerung nach dem Blocking der gemessenen Autoantikörper gegen Thyreoglobulin konnte in einer Probe (Patient Nr.112) festgehalten werden. Hier kam es nach dem Blocking auf einen Tg-AK-Anstieg von ursprünglich 164,79 IE/l auf 182,54 IE/l. Auch hier wurde diese Beobachtung noch einmal durch eine erneute Messung kontrolliert, und konnte in diesem Ausmaß nicht bestätigt werden. So wurde als Ausgangswert 166,16 IE/l gemessen und war nach dem Blocking mit 167,56 IE/l innerhalb der 2,77- fachen Standardabweichung des Ausgangswerts gelegen.

3.3 Ergebnisse in der Kontrollgruppe

Auch in der heterogenen Kontrollgruppe war in allen 52 Proben genügend Material für die Messungen vorhanden und ließen damit interpretierbare Ergebnisse zu.

3.3.1 Ergebnisse der Thyreoglobulin-Messung in den Kontrollgruppen

Bei der Thyreoglobulinbestimmung in den Kontrollgruppen gab es keinerlei auffällige Werte. Alle gemessenen Werte lagen innerhalb des 2,77fachen der Standardabweichung.

3.3.2 Ergebnisse der Wiederfindung in den Kontrollgruppen

In der Hashimoto Kontrollgruppe zeigte sich bei vier der insgesamt 10 Seren eine erhöhte Wiederfindung nach dem Blocking. Durchschnittlich stieg die Wiederfindungsrate dabei um 8,1%. Nach der wiederholten Messung kam es in einer Probe zu einem Abfall der Wiederfindung um 3,1%. Bei den anderen drei Wiederholungsmessungen zeigte sich nach dem Blocking ein minimaler Anstieg in der Wiederfindung um 3,3%. Somit konnte eine signifikante Änderung des Messergebnisses nicht bestätigt werden.

Abb. 3.2.3: Tg-Antikörper vor und nach dem Blocking

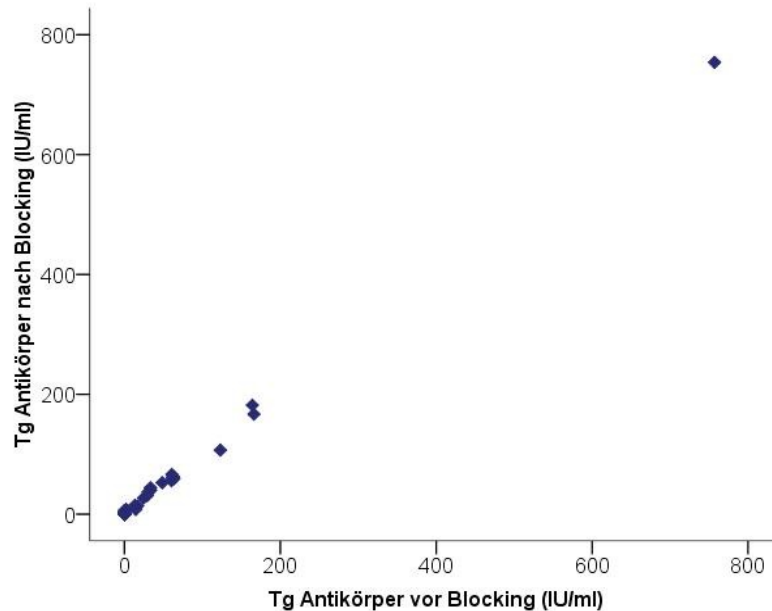


Tabelle 3.3.2: Übersicht über die Wiederfindung in der Hashimoto-Kontrollgruppe

Patienten- probe	Messung	Diagnose	WF vor dem Blocking in %	WF nach dem Blocking in %	Differenz in %	Absolute Differenz in %
Nr. 301	1	Hashimoto- Thyreoiditis	84,8	93,1	+8,3	9,8
	2		87,8	84,7	-3,1	3,5
Nr. 302	1	Hashimoto- Thyreoiditis	94,3	101,1	+6,8	7,2
	2		97,3	98,5	+1,2	1,2
Nr. 303	1	Hashimoto- Thyreoiditis	87,7	94,9	+7,2	8,2
	2		95,7	99,9	+4,2	4,4
Nr. 310	1	Hashimoto- Thyreoiditis	85,7	105,6	+9,9	11,6
	2		99,2	103,8	+4,6	46,4

Innerhalb der anderen vier Kontrollgruppen zeigte sich in der Gruppe der Euthyreoten ein Wiederfindungswert, der noch einmal wiederholt wurde.

In der Allergiker-Gruppe fand sich ebenfalls ein Wert, der in einer zweiten Messung nochmals geprüft wurde. Ausserdem wurden in der Kontrollgruppe der Patienten mit einer schlechten Wiederfindung im Verlauf zwei Patientenseren nochmals nachbestimmt. In keiner dieser Kontrollen konnte ein Einfluss von heterophilen Antikörper bestätigt werden.

Tabelle 3.3.3: Übersicht über die übrigen Kontrollgruppen in der Wiederfindung

Patienten- probe	Messung	Diagnose	WF vor dem Blocking in %	WF nach dem Blocking in %	Differenz in %	Absolute Differenz in %
Nr. 410	1	Euthyreose	99,0	106,0	+7,0	7,1
	2		97,9	97,0	-0,9	0,9
Nr. 452	1	Allergiker	93,7	103,1	+9,4	10,0
	2		96,0	94,9	-1,1	1,1
Nr. 512	1	Patient mit schlechter WF	82,0	71,9	-10,1	12,3
	2		73,4	74,7	+1,3	1,8
Nr. 516	1	Patient mit schlechter WF	74,3	83,7	+9,4	12,7
	2		79,0	85,7	+6,7	8,5

3.3.3 Ergebnisse der Tg-Antikörper-Messung in den Kontrollgruppen

In den Kontrollgruppen wurden insgesamt nur zwei Proben aufgrund eines signifikanten Abfalls der Tg-Antikörper-Werte wiederholt gemessen.

Tabelle 3.3.3: Übersicht über die Kontrollgruppen bei den Tg-AK-Werten

Patientenprobe	Messung	Diagnose	Tg-AK vor dem Blocking in ng/ml	Tg-AK nach dem Blocking in ng/ml	Differenz in ng/ml	Absolute Differenz in %
Nr. 404	1	Euthyreose	409,76	280,60	-129,16	31,53
	2		374,57	374,67	+0,67	0,18
Nr. 512	1	Patient mit schlechter WF	134,87	41,85	-93,02	68,97
	2		122,68	36,71	-85,97	76,30

4 Diskussion

Zu unserer ursprünglichen Fragestellung, inwieweit heterophile Antikörper Einfluss auf die Thyreoglobulinmessung haben, kann Folgendes festgehalten werden: Bei unserer Untersuchung der insgesamt 201 Seren von Patienten mit einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom konnte bei nur zwei Proben (0,99%) ein signifikanter Messunterschied in der Tg-Bestimmung vor und nach dem Blocking festgestellt werden. Beide Male kam es nach dem Blocking zu einem signifikanten, jedoch klinisch nicht relevanten, Abfall der Thyreoglobulinwerte.

Eine zweite Fragestellung dieser Studie war, ob das Patientenkollektiv mit einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom im Vergleich zu den insgesamt 70 Proben einer heterogenen Kontrollgruppe in der Tg-Bestimmung in höherem Maße störanfällig für den Einfluss heterophiler Antikörper ist oder nicht. Hier ist zu sagen, dass tatsächlich beide auffälligen Seren von Patienten mit der Diagnose eines therapierten differenzierten Schilddrüsenkarzinoms stammten. Einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit einem Schilddrüsenkarzinom und der Kontrollgruppe ohne ein Karzinom ließ sich in unserer Studie zwar nicht ermitteln; allerdings ist aufgrund des lediglich in niedriger Fallzahl auftretenden Einflusses eine abschließende Beurteilung auch nur eingeschränkt möglich.

Bemerkenswert sind hierbei Erkenntnisse anderer Studien, die zum Teil konträre Ergebnisse lieferten. Zu beachten ist dabei allerdings die unterschiedliche Herangehensweise und Methodik der jeweiligen Forschungsgruppen, die einen unkritischen Vergleich reiner Zahlenwerte verbieten.

Über die tatsächliche Häufigkeit von Interferenzen aufgrund von heterophilen Antikörpern gibt es in der vorherrschenden Literatur keine Übereinstimmung. So reichen die genannten Werte von weniger als 1% bis zu 80% (Kricka 1999). Ein Grund hierfür sind mit Sicherheit unterschiedliche Messmethoden sowie die verschiedenen Assays in den einzelnen Labors. So ist es zum Beispiel von entscheidender Bedeutung ob in den Assays bereits standardmäßig ein Blocking durchgeführt wurde oder nicht. Hier ist auch wichtig zu unterscheiden welche Art von Blocking durchgeführt wurde,

denn nicht jedes Blocking ist für jeden Immunoassay gleichermaßen geeignet. Eine simple Methode stellt das auch in unserer Studie verwendete Blocking mit den kommerziell erhältlichen Blocking Tubes dar. Eine alternative Technik dazu ist die Vorbehandlung mit Polyethylen Glycol (PEG), um interferierende Immunglobuline zu binden (Ellis et al. 2005).

Darüber hinaus können auch das Alter und das Geschlecht des Patienten, ein möglicherweise bestehender Nikotinabusus sowie Autoimmunerkrankungen und sonstige Nebendiagnosen Interferenzen durch heterophile Antikörper begünstigen (Bjerner 2002). Wichtig ist außerdem zu beachten, dass HAB-Interferenzen in den jeweiligen Nachweisverfahren bei unterschiedlichen Antigenen sehr divergent auftreten können.

In einer aktuellen Studie hierzu von *Preissner et al.* wurden die Nachweisverfahren unterschiedlicher Antigene bewertet. Dabei reichte die Spannbreite der HAB-Interferenz von 0,2% bei einem Verfahren zum Nachweis von Alfa-Fetoprotein bis zu 3,7% bei einem Nachweisverfahren für Kalzitonin (Preissner 2005).

Eine ebenfalls 2008 veröffentlichte Studie von *Toorenenbergen et al.* zeigt HA-Interferenzen bei einem Nachweisverfahren für Tryptase. Toorenenbergen legte in seiner Untersuchung dar, dass bei 5 von 30 Seren (17%) nach einer Inkubation mit einem Blocking-Reagenz die Tryptase-Spiegel auf die Hälfte reduziert werden konnten (Toorenenbergen 2008).

Bjerner et al. berichteten bei 4% ihrer Seren von Interferenzen in einem Zwei-Schritt-Assay für Carcinoembryonales Antigen (CEA), bei dem bovine Antikörper verwendet wurden. Nach der Zugabe von 15 mg/l wärme-behandelten Maus-Antikörpern (MAK 33) konnte die Interferenz auf 0,86% gesenkt werden. Nach der Zugabe von 50 mg/l MAK 33 sogar auf 0,06% (Bjerner 2002).

Pernet et al. beschrieben 2008 einen Fall von HA-Interferenz in der Troponin-Messung, die zu falsch-hohen Werten führte (Pernet 2008). Auch *Lam et al.* beziehen sich in ihrer Evaluation des Architect STAT Troponin-Assays auf die Troponin-Messung und konnten eine Störanfälligkeit des Tests gegenüber HA feststellen (Lam 2006).

In einer 2003 veröffentlichten Studie von *Preissner et al.* zum Thema des Einflusses von heterophilen Antikörper auf die Thyreoglobulin-Bestimmung wurde bei 1106, nicht auf ihre Grunderkrankung selektierten, Seren wiederholt Tg-Messungen vor und nach einem Blocking durchgeführt. Dies ergab, dass bei 3% dieser Studiengruppe der Einfluss von heterophilen Antikörpern für signifikante Tg-Wert-Veränderungen verantwortlich gemacht werden konnte. In einer Subgruppe von 48 Patienten mit bekanntem differenziertem Schilddrüsenkarzinom stellte sich jedoch heraus, dass bei 6 von diesen 48 Patienten (13%) ein möglicher Einfluss von heterophilen Antikörpern detektiert wurde. Vor allem ergab diese Studie das Auftreten von falsch-positiven oder fälschlich erhöhten Thyreoglobulinwerten. Für den Vergleich mit unserer Studie ist es jedoch wichtig zu bemerken, dass *Preissner et al.* nur Proben mit Tg-Werten, die in der regulären Tg-Messung über 1µg/l lagen, in ihre Studie mit eingeschlossen haben. Aus diesem Einschlusskriterium ergibt sich schon, dass die Häufigkeit des Auftretens falsch-negativer Tg-Werte nicht beobachtet werden konnte (Preissner 2003).

Verburg F. beschreibt in seiner, der unsrigen ähnlich angelegten Studie, zur Tg-Messung in der Nachsorge beim Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom beispielsweise eine Interferenz durch heterophile Antikörper die zu niedrigeren oder sogar falsch negativen Ergebnissen in der Tg- oder Tg-Antikörper Messung geführt haben und zwar bei nahezu 40% seiner insgesamt 100 untersuchten Seren. Dieses Ergebnis wurde mit zwei unterschiedlich angewandten Messmethoden, zum einen dem in dieser Studie angewendeten TG-plus von der Firma B.R.A.H.M.S sowie dem Roche Modular Analytics, bestätigt. Beide Methoden beinhalteten ein standardmäßiges Blocking. Damit liegt das Ergebnis von *Verburg et al.* weit über den bis dahin in der Literatur beschriebenen Prozentsatz an Interferenzen, und auch im Gegensatz zu dem Ergebnis der vorliegenden Studie (Verburg 2007). Eine ausreichend zufriedenstellende Erklärung für diese Befunde konnte bislang noch nicht gefunden werden.

Persoon et al. fanden mit dem automatisierten Nichols-Assay bei nur einem von 127 Patienten eine HAB-Interferenz in der Tg-Messung (Persoon 2006). Damit steht dieses Ergebnis also im Einklang mit dem unsrigen. Allerdings verzichteten sie auf jegliches Blocking der Seren mit Antikörpern und begründeten den Einfluss durch heterophile

Antikörper mit der erhöhten Tg-Wiederfindung bei nicht nachweisbaren Tg-Antikörper.

Giovanella und Ghelfo beschrieben in einem 2007 veröffentlichten case report den Fall einer thyreoidektomierten Patientin mit metastasiertem papillärem Schilddrüsenkarzinom, bei der eine pathologisch niedrige Tg-Wiederfindung (58%) bei nicht nachweisbarem Thyreoglobulin und negativen Tg-Antikörpern (<60kE/l) in der Nachsorge wegweisend für den Verdacht auf interferierende heterophile Antikörper war. Dieser Verdacht ließ sich durch eine wiederholte Messung nach der Behandlung des Serums mit den auch von uns verwendeten HA-Blocking tubes bestätigen (*Giovanella 2007*). Damit ist dies als Beispiel für Interferenzen durch heterophile Antikörper zu betrachten, die falsch-negative Tg-Werte verantworten.

In einem weiteren case report von *Massart et al.* wird ein Beispiel für die Messung falsch-hoher Tg-Werte durch den Cisbio Assay sowie dem Access Assay geliefert. Auch in diesem Fall fielen die zuvor erhöhten Tg-Werte nach dem Blocking mit Scantibodies bei beiden Tests auf drastische Weise und lagen danach im unauffälligen Bereich. Demgegenüber gestellt waren Messungen mit zwei Assays der Firma B.R.A.H.M.S (Tg-plus Assay und Kryptor Tg Assay) die keinerlei Störanfälligkeiten für das Vorhandensein von heterophilen Antikörpern zeigten (*Massart 2008*).

In der Zusammenschau der Ergebnisse in der Literatur, erscheint im Vergleich zu Assays für andere Antigene die Häufigkeit der Interferenz von heterophilen Antikörper in Tg-Assays sehr unterschiedlich zu sein. Möglicherweise spielt hier eine unterschiedliche Anfälligkeit von verschiedenen Assays eine Rolle. Auffällig ist jedoch, dass sich in der Literatur eine Tendenz abzeichnet, dass aus bislang ungeklärten Gründen, Patienten mit einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom eine erheblich größere Sensibilität für HAB-Interferenzen in der Tg-Bestimmung aufweisen als die Allgemeinbevölkerung. Dafür sind vielerlei Erklärungen denkbar.

Preissner et al. vermuten eine höhere Bereitschaft von Schilddrüsenkarzinompatienten, heterophile Antikörper zu bilden (*Preissner 2005*). Herstellerfirmen weisen in den Gebrauchsanweisungen für ihre Assays beispielsweise darauf hin, dass Patienten die sich einer vorherigen Behandlung oder diagnostischen Tests mit monoklonalen Mäuse-Antikörpern unterzogen haben fehlerhafte Ergebnisse in diesen Assays hervorrufen

können. Auch wenn all die verwendeten Assays Zusätze enthalten um den Effekt von menschlichen Antikörpern gegen Mäuse zu minimieren, werden keine Zusätze erwähnt, die den Effekt von anderen heterophilen Antikörpern (z.B. gegen Ziegen oder Hasen) minimieren. Daher wurden die HAB-blocking tubes speziell dafür entwickelt, eine weitere Spannweite an interferierenden Antikörpern zu blockieren als bislang, und nicht nur die menschlichen Antikörper gegen Mausantigene zu erfassen.

Im Vergleich mit der gesamten Literatur zu diesem Thema kann jedoch festgehalten werden, dass unsere Ergebnisse eine eventuell höhere Häufigkeit des Auftretens von Interferenzen durch heterophile Antikörper bei Schilddrüsenkarzinompatienten nicht bestätigen konnten. Allerdings kann auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass Patienten mit einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom ein höheres Risiko für den Einfluss heterophiler Antikörper bergen als die Allgemeinbevölkerung. Denkbar ist, dass die recht niedrige Zahl der potentiellen Interferenzen durch heterophile Antikörper in dieser Studie mit einer bereits in diesem Assay standardisierten Blocking-Methode zusammenhängt. Eine zweite mögliche Erklärung ergibt sich daraus, dass die Ergebnisse aus recht unterschiedlichen Populationen stammen. So besteht unsere Studiengruppe hauptsächlich aus einem Patientenkollektiv das aus städtischen Gebieten und/oder Weinbaugebieten stammt, und gleichzeitig eine recht niedrige Exposition für unterschiedliche Tierarten aufweisen. Es ist denkbar, dass Populationen aus ländlicheren Gegenden mit einer höheren Dichte an viehhaltender Landwirtschaft eine höhere Inzidenz von heterophilen Antikörper zeigen.

Klinisch folgt aus den Ergebnissen dieser Studie, dass die Interferenz von heterophilen Antikörpern in der Thyreoglobulin-Messung mit dem B.R.A.H.M.S. Tg-Plus Assay bei unseren Schilddrüsenkarzinompatienten keine klinisch relevante Bedeutung hat. Jedoch kann, wie in den Case-Reports von *Giovanella und Ghelfo* und *Massart et al.* gezeigt wird, die Interferenz von heterophilen Antikörper in der Thyreoglobulinbestimmung sporadisch auftreten. Bei jedem Patienten, bei dem der gemessene Thyreoglobulin-Wert nicht zu dem klinischen Bild passt, sollte diese Möglichkeit in Betracht gezogen und ausgeschlossen werden. Außerdem ist es wichtig, daß Ärzte, Laborfachkräfte und die Herstellerfirmen der entsprechenden Assays in engem Austausch miteinander stehen,

und auffällige Werte in der Synoptik der klinischen Symptome, Laborbefunde und weiteren diagnostischen Maßnahmen betrachtet und interpretiert werden. Nur so können therapeutische Fehlinterventionen vermieden, oder die Notwendigkeit einer Intervention frühzeitig erkannt werden.

5 Fazit

Abschließend bleibt zu sagen, dass wir in unseren Messungen weitaus weniger auffällige Messergebnisse in der Tg-Messung ermittelten als wir zu Beginn unserer Studie angenommen hatten. Damit scheint der Tg-Test der Firma B.R.A.H.M.S wenig störanfällig für heterophile Antikörper zu sein. Nichtsdestotrotz bleibt Diskussionbedarf inwieweit diese Ergebnisse auf den Einfluss heterophiler Antikörper zurückzuführen sind.

Außerdem konnten wir keinen signifikanten Unterschied in der Tg-Messung zwischen der Studiengruppe mit Schilddrüsenkarzinompatienten und der Kontrollgruppe mit Patienten anderer Schilddrüsenerkrankungen sowie Allergikern herausfinden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie haben wir einen möglichen Einfluß von heterophilen Antikörpern auf die Thyreoglobulinbestimmung in der Nachsorge bei Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom untersucht. Dazu wurde bei 201 Patientenseren der Thyreoglobulinwert auf herkömmliche Weise mit dem Tg-Test der Firma B.R.A.H.M.S und in einer Parallelbestimmung nach Vorbehandlung mit heterophilen Antikörper blocking tubes der Firma Scantibodies bestimmt. Dieses Vorgehen ermöglichte es, einen direkten Vergleich zwischen beiden Messergebnissen anzustellen und auf diese Weise einen möglichen Einfluss heterophiler Antikörper aufzudecken. Darüber hinaus wurde dasselbe Vorgehen bei einer heterogenen Kontrollgruppe, bestehend aus 52 Seren von gesunden Personen, Allergikern, Patienten mit einem Morbus Hashimoto sowie Patienten mit bereits bekannt auffälligen Wiederfindungswerten, angewandt.

Lediglich bei zwei Proben (1%) ergaben sich signifikant unterschiedliche (über das 2,77fache der Standardabweichung), klinisch jedoch irrelevante, Messergebnisse vor und nach dem Blocking. Bei den übrigen 199 Proben zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messungen. In den Kontrollseren zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede vor und nach dem Blocking. Somit ist ein Einfluss von heterophilen Antikörpern auf die Thyreoglobulinbestimmung bei Patienten mit einem differenziertem Schilddrüsenkarzinom unwahrscheinlich.

7 Literaturverzeichnis

Bjerner, J., Nustad, K., Norum L. F., Olsen, K. H., & Bormer, O. P. (2002). Immunometric Assay Interference: Incidence and Prevention. *Clinical Chemistry*, 48, 613–621.

Cooper, D. S., Doherty, D. M., Haugen, B. R., & et al. (2006). Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancers. *Thyroid*, 16, 109–142.

Dietlein, M., Dressler, J., Grünwald, G., & et al. (2003). Leitlinie zur Schilddrüsendiagnostik (Version 2). *Nuklearmedizin*, 42, 109–115.

Ellis, M., & Livesey, H. (2005). Techniques for Identifying Heterophilic Antibody Interference Are Assay Specific: Study of Seven Analytes on Two Automated Immunoassay Analyzers. *Clinical Chemistry*, 51, 639–641.

Giovanella, L., & Ghelfo, A. (2007). Undetectable Serum Thyroglobulin Due to Negative Interference of Heterophile Antibodies in Relapsing Thyroid Carcinoma. *Clinical Chemistry*, 53, 1871–1872.

Görges, R., & Bockisch, A. (2008). Der Schilddrüsenknoten und der Stellenwert der Tumormarkerbestimmung. *Der Nuklearmediziner*, 31, 228–236.

Görges, R., Brandt-Mainz, K., Freudenberg, L., Frilling, A., Grimm, W., & Bockisch, A. (2003). Kontinuierliche Sensitivitätssteigerung in der Schilddrüsenkarzinom-Nachsorge

im Verlauf dreier Thyreoglobulin-IMA-Generationen. *Nuklearmedizin*, 42, 157–166.

Hampel, R. (Ed.) (2002). *Diagnostik und Therapie von Schilddrüsenfunktionsstörungen* (2. Aufl.). Bremen: UNI-MED Verl.

Horn, F., & Krüger, K. (Eds.) (2002). *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Stuttgart: Thieme.

Horn, A., Vosberg, H., & Wagner, H. (Eds.) (1999). *Schilddrüse konkret: Diagnostik und Therapie der Schilddrüsenkrankheiten*. Stuttgart: Thieme.

Kaplan, I. V., & Levinson, S. S. (1999). When is a heterophilic antibody not a heterophilic antibody? When it is an antibody against a specific immunogen. *Clinical Chemistry*, 45, 616–618.

Kricka, L. (1999). Human Anti-Animal antibody Interferences in Immunological Assays. *Clinical Chemistry*, 45, 942–956.

Kuwert, T., Bockisch, A., & Ell, P. J. (Eds.) (2008). *Nuklearmedizin* (4., neu erstellte und erw. Aufl.). Stuttgart: Thieme.

Lam, Q., Black, M., Youdell, O., & et al. (2006). Performance Evaluation and Subsequent Clinical Experience with the Abbott Automated Architect STAT Troponin-I Assay. *Clinical Chemistry*, 52, 298–300.

Massert, C., Corcuff, J.-B., & Bordenave, L. (2008). False-positive results corrected by

the use of heterophilic antibody-blocking reagent in thyroglobulin immunoassays. *Clinica Chimica Acta*, 388, 211–213.

Pacini, F., Schlumberger, M., Dralle, H., & et al (2006). European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *European journal of endocrinology*, 154, 787–803.

Pernet, P., Benéteau-Burnat, B., Hermand, C., & Vaubourdolle, M. (2008). Point-of-care testing: false elevation of cardiac troponin assayed in the emergency departement. *American Journal of Emergency Medicine*, 26, 969.e1-969.e2.

Persoon, A., Links, T. P., Wilde, J., & et al. (2006). Thyroglobulin Testing with Quantitative Tg Antibody Measurement for Determining Interference in Serum Tg Assays in Differentiated Thyroid Carcinoma. *Clinical Chemistry*, 52, 1196–1199.

Preissner, C., Dodge, L. A., O’Kane, D. J., & et al. (2005). Prevalence of Heterophilic Antibody Interference in Eight Automated Tumor Marker Immunoassays. *Clinical Chemistry*, 51, 208–210.

Preissner, C., O’Kane, D. J., Singh, R. J., & et al. (2003). Phantoms in the Assay Tube: Heterophile Antibody Interferences in Serum Thyroglobulin Assays. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88, 3069–3074.

Reiners, C. (Ed.) (1983). *Serum-Thyroglobulin und Thyroglobulin-Antikörper: Ergebnisse beim Schilddrüsen-Karzinom u. a. Schilddrüsenerkrankungen*. Stuttgart: Thieme.

Reiners, C. (2003). *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Schilddrüsenkarzinoms*. Bremen: UNI-MED Verl.

Rendl, J. (2005). Thyreoglobulin im Serum: Prinzip, Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit moderner Assay. *Der Nuklearmediziner*, 28, 21–37.

Renz-Polster, H., & Aries, S.-P. (Eds.) (2006). *Basislehrbuch Innere Medizin* (3. Aufl., 1. Nachdr.). München: Elsevier Urban & Fischer.

Rodriguez, A. M., & et al. (2002). Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87, 3500–3503.

Ruiz-Garcia, J., Perron, B., Lacroix, L., & et al. (1991). Thyroglobulin level as a predictive factor of tumoral recurrence in differentiated thyroid cancer. *Journal of nuclear medicine*, 32, 395–398.

Schicha, H., Schober, O., & Dietlein, M. (Eds.) (2007). *Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung* (6., überarb. und aktualisierte Aufl.). Stuttgart: Schattauer.

Schlumberger, M., Hitzel, A., Toubert, M. E., & et al. (2007). Comparison of seven serum thyreoglobulin assays in the follow-up of papillary and follicular thyroid cancer patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92, 2487–2495.

Schlumberger, M., & Pacini, F. (2003). *Thyroid Tumors*: Edition Nucleon, pp. 147–164.

Schmidt, R. F., Thews, G., & Rein, H. (Eds.) (1987). *Physiologie des Menschen* (23., völlig neubearb. Aufl.). Berlin: Springer, S. 405-407.

Spencer, C. A., & Wang, C. C. (1995). Thyroglobulin measurement. Techniques, clinical benefits and pitfalls. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 24, 841–863.

Thomas, L. (Ed.) (2005). *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik* (6. Aufl.). Frankfurt/Main: TH-Books-Verl.-Ges., S.1933.

Toorenenbergen van, A. W., Hooijkaas, H., Klein Heerenbrink, G., & Dufour-van den Goorbergh, D. M. (2008). Heterophilic antibody interference in a tryptase immunoassay. *Clinical Biochemistry*, 41, 331–334.

Verburg, F. A. (Ed.) (2007). *Clinical studies of treatment and follow-up in differentiated thyroid carcinoma*: University Utrecht.

Verburg, F. A., Keizer, B., Klerk, J. M. H. de, & et al. (2009). Stellenwert der diagnostischen Radiotherapie und Thyreoglobulinbestimmung nach rhTSH-Gabe. *Nuklearmedizin*, 48, 26–29.

Zöphel, K., Wunderlich, G., & Rees Smith, B. (2003). Serum Thyreoglobulin Measurements with a high sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay: is there a clinical benefit in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid*, 13, 861–865.

Dankwort

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Chr. Reiners für die Überlassung und Betreuung meines Themas bedanken, sowie für die Übernahme des Referates.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Fassnacht-Capeller für die Übernahme des Korreferates.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an Herrn Dr. Erik Verburg richten, der mich zu jeder Zeit unterstützt hat und mir bei allen Arbeitsschritten eine große Hilfe war.

Wesentliche Voraussetzung für das Gelingen der Arbeit war die sorgsame und engagierte Durchführung der Laboruntersuchungen. Hier sei insbesondere Frau Inge Grelle gedankt, die mir geduldig die Grundlagen der labormedizinischen Arbeit nahegebracht, und sich stets meiner Fragen angenommen hat.

Im Besonderen, und nicht zuletzt, danke ich meiner Familie für ihre verständnisvolle Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Wäschle
Vorname	Katharina
Geburtsdatum	19.04.1981
Geburtsort	Freudenstadt

Schulbildung

1987 – 1991	Grundschule Calw-Heumaden
1991 – 1996	Hermann-Hesse-Gymnasium Calw
1996 – 2000	Johannes-Kepler-Gymnasium Weil der Stadt

Abschluss: Abitur im Juni 2000

Studium und Weiterbildung

04/2002 – 03/2003	Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
03/2003	1. Staatsexamen
04/2003 – 03/2007	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
03/2007 – 08/2007	Praxissemester
08/2007 – 07/2008	Praktisches Jahr am Missionsärztlichen Klinikum Würzburg und Universitätsklinikum Würzburg
11/2008	2. Staatsexamen
01/2009 – 06/2009	Promotion an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg, Würzburg, Direktor: Prof. Dr. med. Chr. Reiners
09/2009 – heute	Assistenzärztin der Klinik für Psychiatrie und Psychoso- matische Medizin, Vivantes Klinikum, Berlin-Hellersdorf

Würzburg, den 22.11.2010