

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

**Beurteilung der klinischen Übertragbarkeit der
Ergebnisse von Cobas e411 und IDS-iSYS zur
Quantifizierung der Schilddrüsenperoxidase-
Antikörper**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Paul Jakob Ruf
Aus Emmendingen

Mainz 2025

CC-BY-SA-4.0

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

Tag der Promotion: 26.09.2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Formelverzeichnis	X
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Makro- und Mikroanatomie der Schilddrüse	3
2.2 Physiologie der Schilddrüse	3
2.2.1 Thyreotroper Regelkreis	3
2.2.2 TRH und TSH	5
2.2.3 T3 und T4	7
2.2.3.1 Synthese und Freisetzung von T3 und T4	7
2.2.3.2 Physiologisches Verhalten von T3 und T4	8
2.2.3.3 Wirkung der Schilddrüsenhormone T3 und T4	10
2.3 TPO und TPO-Antikörper	10
2.3.1 TPO	10
2.3.2 TPO als Autoantigen	11
2.3.3 Break in Tolerance	12
2.3.4 TPO- Antikörper	13
2.4 Funktionszustände der Schilddrüse	16
2.5 Autoimmunthyreopathien	17
2.5.1 Hashimoto Thyreoiditis	18
2.5.2 Morbus Basedow – Graves Disease	20
2.5.3 Weitere Autoimmunthyreopathien	22
2.6 TPO-Ak als diagnostischer Marker – Analytische Aspekte	23
2.6.1 Harmonisierung der Assays	24
2.6.2 Aktualität des internationalen Referenz-Standards MRC 66/387	25

2.6.3	Definition einer einheitlichen Cut-Off Konzentration	25
2.6.4	Autoantigen-Aufreinigung.....	26
2.6.5	Weitere Faktoren, die zur Harmonisierung der TPO-Ak Assay beitragen	27
3	Material und Methoden	28
3.1	Studiendesign	28
3.1.1	Zusammenstellung des Patientenkollektivs	28
3.2	Material	29
3.2.1	Arbeitsmaterial	29
3.2.2	Populationsbeschreibung.....	30
3.3	Messmethoden	33
3.3.1	Cobas e411	33
3.3.1.1	Assay-Ablauf	34
3.3.1.2	Assay Interferenzen.....	34
3.3.2	IDS – iSYS	35
3.3.2.1	Assay-Ablauf	36
3.3.2.2	Assay Interferenzen.....	36
3.3.3	Immolute 2000.....	37
3.3.3.1	Assay – Ablauf.....	38
3.3.3.2	Assay – Interferenzen.....	38
3.4	Statistische Methoden	39
3.4.1	Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Messwerte	39
3.4.2	Lage-, Streu- und Formmaße.....	39
3.4.3	Test auf Normalverteilung	40
3.4.4	Verteilung der Differenzen der Messergebnisse	40
3.4.5	Vorzeichentest bei verbundenen Stichproben	41
3.4.6	Einfache lineare Regression	41
3.4.7	„Linie der Gleichheit“ in einem Streudiagramm.....	41

3.4.8	Zusammenhangsanalyse	42
3.4.9	Variationskoeffizient	42
3.4.10	Konkordanz- Korrelationskoeffizient nach Lin	44
3.4.11	Bland Altman Plot	46
3.4.12	Sensitivität und Spezifität.....	48
3.4.13	Receiver Operating Characteristic- Analyse (ROC).....	49
4	Ergebnisse.....	50
4.1	Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Messwerte	50
4.1.1	Histogramme.....	50
4.1.2	Boxplots	52
4.2	Lage-, Streu- und Formmaße	53
4.3	Test auf Normalverteilung.....	54
4.4	Verteilung der Differenzen	55
4.5	Vorzeichentest bei verbundenen Stichproben	56
4.6	Einfache lineare Regression mit Winkelhalbierender im Streudiagramm.....	56
4.7	Zusammenhangsanalyse.....	58
4.8	Variationskoeffizient.....	58
4.9	Konkordanz- Korrelationskoeffizient nach Lin	59
4.10	Bland Altman Plot.....	60
4.10.1	Bland Altman Plot unter Berücksichtigung der vorgegebenen Cut-offs	61
4.11	Sensitivität und Spezifität	64
4.12	Zusammenfassung der Vergleiche mit Immulite 2000	65
4.12.1	Häufigkeitsverteilung Immulite 2000.....	65
4.12.2	Streudiagramm IDS iSYS - Immulite 2000.....	67
4.12.3	Spearman Korrelation.....	69
4.12.4	Variationskoeffizient IDS-iSYS – Immulite 2000.....	70

4.12.5	Konkordanz- Korrelations- Koeffizient nach Lin IDS-iSYS – Immulite 2000	70
4.12.6	Bland Altman Plot - IDS-iSYS – Immulite 2000	71
4.12.7	Bland Altman Plot unter Berücksichtigung der vorgegebenen Cut-Offs, IDS-iSYS und Immulite 2000	72
4.12.8	Sensitivität und Spezifität.....	73
4.12.9	ROC Analyse IDS-iSYS – Immulite 2000	75
5	Diskussion	76
5.1	Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse.....	76
5.1.1	Cobas e411 – IDS-iSYS.....	76
5.1.2	IDS-iSYS – Immulite 2000	77
5.1.3	Gemeinsamkeiten und Differenzen der Vergleiche.....	78
5.2	Einordnung der Ergebnisse anhand aktueller Literatur	79
5.2.1	Technische Aspekte.....	79
5.2.2	Quantitative Aspekte	81
5.2.3	Qualitative Aspekte	82
5.3	Limitationen der Studie	84
5.4	Fazit.....	86
6	Zusammenfassung	88
7	Literaturverzeichnis.....	90
8	Danksagung.....	101
9	Tabellarischer Lebenslauf.....	102

Abkürzungsverzeichnis

SD	Schilddrüse
SDH	Schilddrüsenhormone
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
AITD	autoimmune Schilddrüsenerkrankungen
HT	Hashimoto Thyreoiditis, Hashimoto Thyreoiditis
GD	Graves Disease, Graves Disease
TRAK	TSH-Rezeptor Antikörper
Tg-Ak	Thyreoglobulin-Antikörper
TPO-Ak	Thyreoperoxidase- Antikörper
TPO	Thyreoperoxidase, Thyreoperoxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Tg	Thyreoglobulin
MIT	Monoiodthyreoglobulin
DIT	Diiiodthyreoglobulin
ADCC	Antikörper abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität
IDS	Immunodiagnostic Systems
SDHR	Schilddrüsenhormonrezeptor
TRH	Thyreotropin releasing hormone
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
NPV	nucleus paraventricularis
PRH	Prolaktin releasing Hormon
Ca ²⁺	Kalzium
IP ₃	Inositol-3 Phosphat
DAG	Diacylglycerin
LH	Luteinisierende Hormon
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
CG	Choriongonadotropin
TSHR	TSH-Rezeptor
cAMP	cyclische Adenosinmonophosphat
NIS	Natrium-Iodid Symporter
Na ⁺ /K ⁺ Pumpe	Natrium/Kalium Pumpe
DUOX1	duale Oxidase 1
DUOX2	duale Oxidase 2
DEHAL1	Iodthyrosindehalogenase 1
MCT8	Monocarboxylase Transporter 8
TBG	Thyroxin bindendes Globulin
TBPA	Thyroxin bindendes Präalbumin
SA	Serum Albumin
ft3	freies T3
ft4	freies T4
Lat1	L-Type aminoacid transporter 1
Dio	Deiodinase
MPO	Myeloperoxidase
IDR A	immunodominante Region A
IDR B	immunodominante Region B
Fab	antikörperspezifische Fragment

L-T4	<i>Levo-Thyroxin</i>
PAS	<i>Polyglanduläres autoimmunes Syndrom</i>
IRMA	<i>Immunoradiometrisches Assay</i>
IEMA	<i>Immunoenzymometrisches Assay</i>
ILMA	<i>Immunoluminometrisches Assay</i>
LoD	<i>Detektionslimit</i>
URL	<i>upper reference limit</i>
NACB	<i>National Academy of Clinical Biochemistry</i>
IMBEI	<i>Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik</i>
CV	<i>Variationskoeffizient</i>
CCC	<i>Konkordanz- Korrelationskoeffizient</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
LoA	<i>Limits of agreement</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Thyreotroper Regelkreis. Grafik Eigenkreation	4
Abbildung 2. Kopfzeile der Arbeitstabelle.	29
Abbildung 3: Histogramm der Altersverteilung der Gesamtstichprobe.	31
Abbildung 4: Boxplot zur Darstellung der Krankheitsdauer in Jahren.....	31
Abbildung 5: Boxplots zum Alter der Proben innerhalb der Kollektive.....	32
Abbildung 6: Cobas e411 von Roche Diagnostics. (183).....	33
Abbildung 7: IDS-iSYS. (186).....	35
Abbildung 8. Immulite 2000 - Siemens Healthcare Diagnostics Products. (188).....	37
Abbildung 9: Balkendiagramm - Häufigkeitsverteilung der TPO-Ak Messwerte von Cobas e411 in IU/ml.....	51
Abbildung 10: Balkendiagramm- Häufigkeitsverteilung der TPO-Ak Messwerte von IDS-iSYS in IU/ml.....	52
Abbildung 11: Boxplots der TPO.Ak Messwerte in IU/ml von Cobas e411 und IDS-iSYS.	53
Abbildung 12: Verteilung der Differenzen (IDS-iSYS - Cobas e411) in IU/ml.	55
Abbildung 13: Streudiagramm IDS-iSYS auf Cobas e411 mit linearer Regressionsgrade und Winkelhalbierender.	57
Abbildung 14: Streudiagramm In IDSr auf In Cobas e411 mit linearer Regressionsgrade und Winkelhalbierender.	57
Abbildung 15: Balkendiagramm zur Verteilung der individuellen CVs zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS.	59
Abbildung 16: Bland Altman Plot. Daten zur Basis e log- transformiert. Cobas e411, IDS- iSYS.	60
Abbildung 17: Bland Altman Plot mit rücktransformierter, mittlerer Differenz und Übereinstimmungsgrenzen.	61
Abbildung 18: Bland Altman Plot. Daten zur Basis e transformiert. Anpassung der Messwerte an die Cut-offs der Methoden. Cobas e411 du IDS-iSYS.....	62
Abbildung 19: Konventionelles Bland Altman Plot unter Anpassung der Messwerte an die Cut-offs der Methoden mit rücktransformierten LoA und Gerade der mittleren Differenzen.	63
Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung der TPO-Ak Messwerte von Immulite 2000. Daten aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann.	65

Abbildung 21: Boxplots zu den TPO-Ak Messwerten in IU/ml von Immulite 200 und IDS-iSYS. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann.	66
Abbildung 22: Streudiagramm IDS-iSYS auf Immulite 2000 mit linearer Regressionsgrade und Winkelhalbierender. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.	68
Abbildung 23: Streudiagramm In IDSr auf In Immulite 2000 mit linearer Regressionsgrade und Winkelhalbierender. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann	69
Abbildung 24: Konventionelles Bland Altman Plot mit rücktransformierten LoA und Gerade der mittleren Differenzen. IDS-iSYS – Immulite 2000. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.	71
Abbildung 25: Konventionelles Bland Altman Plot unter Anpassung der Messwerte an die Cut-offs der Methoden mit rücktransformierten LoA und Gerade der mittleren Differenzen. IDS-iSYS – Immulite*0,42. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.	72
Abbildung 26: ROC-Kurven, IDS-iSYS rot, Immulite 2000 schwarz. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Symptome der Hyper- bzw. Hypothyreose. Quellen: (7) (69) (138) (139) (140).....	17
Tabelle 2: Geschlechterverteilung.....	30
Tabelle 3: Interpretation des CCC.....	45
Tabelle 4: Alternative Interpretation des CCC nach McBride et. al.....	45
Tabelle 5: Deskriptive Statistik der TPO-Ak Messwerte in IU/ml von Cobas e411 und IDS-iSYS.....	54
Tabelle 6: Tests auf Normalverteilung der TPO-Ak Messwerte von Cobas e411 und IDS-iSYS.....	54
Tabelle 8: 4 Felder Tafel, Cobas e411 – IDS-iSYS.....	64
Tabelle 9: Lage- und Streumaße der Messwerte von IDS-iSYS und Immulite 2000 in IU/ml. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann..	67
Tabelle 10: Spearman Korrelationskoeffizient, Immulite 2000 – IDS-iSYS.....	69
Tabelle 12: 4 Felder Tafel, Immulite 2000 Cut Off 35IU/ml – IDS-iSYS Cut Off 15IU/ml. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann.	73
Tabelle 13: 6 Felder Tafel: Cobas e411, IDS-iSYS, Immulite 2000. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.	73
Tabelle 14: Klinischer Methodenvergleich. 1=absolute Übereinstimmung, 2=Sensitivität, 3=Spezifität. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.	74
Tabelle 15: AUC der ROC- Kurven von IDS-iSYS und Immulite 2000, AUC: Fläche unter der Kurve. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann.	75
Tabelle 16: ROC-Analyse der AUC von IDS- iSYS und Immulite 2000. AUC: Fläche unter der Kurve. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann.	75

Formelverzeichnis

Formel 1: Gleichung für die Winkelhalbierende in einem Streudiagramm. (194).....	41
Formel 2: Variationskoeffizient. (189)	42
Formel 3: Formel zur Errechnung des CV bei zum Mittelwert proportionalen Differenzen. (197)	43
Formel 4: 95% KI für den CV. (198).....	43
Formel 5: Schätzung des Konkordanz Korrelationskoeffizient nach Lin. (201) (204)	44
Formel 6: Berechnung der Übereinstimmungsgrenzen. (193) (194).....	46
Formel 7: Berechnung der 95% KI der Übereinstimmungsgrenzen des Bland Altman Plots. (193).....	46
Formel 8: Rücktransformation der Übereinstimmungsgrenzen und des Mittelwertes. Vgl. (200).....	47
Formel 9: Sensitivität. (209)	48
Formel 10: Spezifität. (209).....	48

1 Einleitung

Die Schilddrüse (SD) spielt als größte rein endokrine Drüse des Menschen eine wichtige Rolle im Hormonhaushalt. Unter anderem sind die Schilddrüsenhormone (SDH), Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4), für den Energiestoffwechsel, sowie die körperliche und mentale Entwicklung von großer Bedeutung. (1) (2) (3)

Störungen der Schilddrüsenfunktion sind neben Iodmangel häufig autoimmunen Ursprungs, wobei eine Prävalenz der autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (AITD) von 5% angenommen wird. Damit ist die SD das am häufigsten von autoimmunen Erkrankungen betroffene Organ des Menschen. Die Hauptvertreter der AITDs sind die Hashimoto Thyreoiditis (HT) und der Morbus Basedow (englisch: Graves Disease) (GD). (4) (5) (6)

Im Rahmen dieser Erkrankungen kommt es zur Infiltration der Schilddrüse mit autoreaktiven T- und B- Zellen, die zum einen über zellvermittelte Zytotoxizität aber auch über die Markierung von Antigenen durch Autoantikörper zu Störungen der Schilddrüsenfunktion führen. (7) (8) Dabei kommen TSH-Rezeptor Antikörper (TRAK) hauptsächlich bei Morbus Basedow vor, während Thyreoglobulin-Antikörper (Tg-Ak) und Thyreoperoxidase-Antikörper (TPO-Ak) sowohl bei Basedow als auch bei HT vorhanden sein können. (4) (9)

TPO-Ak lassen sich bei über 90% der HT-Patienten und bei 75% der Basedow-Patienten nachweisen. Sie richten sich gegen die Thyreoperoxidase (TPO), ein entscheidendes Enzym im Syntheseprozess der SDH. (10) Die TPO katalysiert mithilfe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) die Bindung des Iodids an Thyreoglobulin (Tg) wodurch Monoiodthyreoglobulin (MIT) und Diiodthyreoglobulin (DIT) entsteht. Im nächsten Syntheseschritt katalysiert die TPO die Übertragung von einer oder zwei Iodgruppen auf ein DIT, wodurch T3 oder T4 entsteht. (11) (12)

In ihrer Funktion als Antikörper, können TPO-Ak die TPO inhibieren, wodurch weniger SDH produziert werden. (13) Sie können aber auch eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) induzieren, indem sie T-Killerzellen aktivieren, (13) oder durch die Bindung von Complementfaktoren zu einer Complement-vermittelten Zytotoxizität führen. (14)

Aufgrund ihres häufigen Vorkommens in erhöhten Konzentrationen bei AITD ist die Messung der TPO-Ak ein integraler Bestandteil deren Diagnostik und

Verlaufskontrolle. (15) (16) Schon seit über 60 Jahren werden TPO-Ak mit sich ständig verbessernden Methoden bestimmt. (17) Aufgrund fehlender Standardisierung und mangelnder Harmonisierung der Methoden zur Bestimmung der TPO-Ak weisen diese auch heute noch eine hohe analytische Variabilität auf, was ihren diagnostischen Gebrauch erschwert. (15) (18) (19) (20)

Zum einen aus ökonomischen, aber vor allem aus Gründen der Patientensicherheit wäre eine Verbesserung der Harmonisierung von äußerster Wichtigkeit. (19)

Weltweit forschen mehrere Arbeitsgruppen an Messmethoden zur TPO- Ak, um die Unterschiede der auf dem Markt befindlichen Assays zu quantifizieren, Ursachen für diese zu finden und Vorschläge anzubringen durch welche Maßnahmen sich die Variabilität der Assayergebnisse verringern ließe. (15) (18) (20) (21) (22)

Ziel dieser statistischen Arbeit war es, die Differenzen der Messergebnisse zweier zuvor noch nicht miteinander verglichenen Assays, dem Anti- TPO Assay von Roche Diagnostics GmbH und dem Anti-TPO Assay von Immunodiagnostic Systems (IDS), zu quantifizieren und mögliche Ursachen für diese zu finden. Ebenso wurden die qualitativen Ergebnisse der Assays auf Ihre klinische Übereinstimmung hin untersucht. Zusätzlich wurden die Ergebnisse des Anti-TPO-Antikörper Assays von Immulite 2000, von Siemens Healthineers analysiert und mit dem Fokus auf ihrer qualitativen Ausprägung mit in den Vergleich einbezogen. Die im Rahmen der TPO-Ak Messung von Immulite 2000 gewonnenen Daten sind der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann zugehörig, wurden der Vollständigkeit halber aber in diese Arbeit integriert. Diese Dissertation befindet sich momentan in der Schaffensphase.

Zu diesem Zweck wurden 250 Seren aus der Serenbank des molekulargenetischen Labors der 1. Med. Klinik der Universitätsmedizin Mainz in Zusammenarbeit mit dem Zentrallabor der Universitätsklinik Mainz und einem auswärtigen Labor sowohl mit dem Assay von Roche Diagnostics, dem von Siemens Healthineers als auch mit dem von IDS-iSYS gemessen. Das Patientenkollektiv setzte sich aus jeweils 100 Patienten mit HT und Basedow, als auch 50 schilddrüsengesunden Patienten zusammen. Die auf diesem Weg erhaltenen Messergebnisse wurden daraufhin statistisch ausgewertet.

2 Literaturdiskussion

2.1 Makro- und Mikroanatomie der Schilddrüse

Die Schilddrüse ist eine in den Hals, ventral des Schildknorpels, eingebettete endokrine Drüse. Sie besteht aus den lateralen Schilddrüsenlappen, welche in über 90% der Fälle (23) über einen sogenannten Isthmus miteinander verbunden sind. Der Processus pyramidalis, welcher ein Relikt der embryonalen Entwicklung der Schilddrüse darstellt (1) ist in ca. 50% der Fälle (23) als eine schmale Erweiterung der Schilddrüse nach cranial vorhanden. Das Volumen der Schilddrüse beträgt bei Frauen zwischen 10-15ml und bei Männern zwischen 12-18ml. (24) Damit ist die Schilddrüse das größte, rein endokrine Organ des Menschen. (1)

Auf mikroanatomischer Ebene besteht die Schilddrüse aus Follikeln, ihren funktionellen Einheiten, welche hauptsächlich mit Kolloid gefüllt sind. Die Follikel sind umgeben von einer Schicht aus Follikelzellen, welche an ihrer apikalen Membran die Bestandteile des Kolloids sezernieren. (1) (25) (26) Dieses Kolloid besteht hauptsächlich aus dem Glykoprotein Thyreoglobulin, woraus im Follikellumen die SDH T3 und T4 produziert werden. (1)

Auch die Aktivität der Follikel lässt sich histologisch beurteilen, da aktivierte Follikelzellen eher eine kubische Form, inaktive eher eine flache Form annehmen. (1) (25)

Neben den Follikeln liegen im spatium interfolliculare die C- Zellen, welche als Calcitonin sezernierende Zellen eine Rolle im Calcium Haushalt spielen sowie ein dichtes Netz an Kapillaren, um die stetige Versorgung der Follikelzellen mit frischem Blut zu gewährleisten. (1) (25)

2.2 Physiologie der Schilddrüse

2.2.1 Thyreotroper Regelkreis

Die SDH T3 und T4 sind unter anderem essenziell für die normale geistige und körperliche Entwicklung, das Wachstum und den Energiestoffwechsel. (2) (3) (26) (27) Um ihre Serumkonzentration stabil zu halten, unterliegt ihre Sekretion einem negativen Feedbackmechanismus auf Transkriptionsebene. (28) Dabei kommt es zu einer

Liganden-abhängigen Repression durch einen Komplex aus T3 und SDH- Rezeptoren an den Promotoren der TRH und TSH- Gene. (28)

Die klassische Schleife der negativen Rückkopplung (auch: Astwood- Hostkins loop) (29) findet an thyreotropen Zellen der Adenohypophyse statt wobei bei hohen SDH- Spiegeln die Produktion des Thyroidea stimulierenden Hormons (TSH) reduziert wird wodurch wiederum weniger T3 und T4 gebildet werden.(28)

Eine weitere Schleife der negativen Rückkopplung wird auch als „long feedback control“ oder „Fekete-Lechan loop“ bezeichnet. (29) Dabei binden bei hohen Serumkonzentrationen der SDH diese im Hypothalamus an Schilddrüsenhormonrezeptoren (SDHR) und hemmen die Freisetzung von Thyreotropin releasing hormone (TRH). (30)

Neben oben genannten Feedback Mechanismen besteht noch ein sogenannter „ultra-short feedback loop“ bei dem TSH autokrin und parakrin die thyreotropen Zellen der Adenohypophyse selbst hemmt. (29)

Insgesamt kommt der Rückkopplung über die TSH- Konzentration die Hauptrolle in der Regulation der thyreotropen Hormonachse zu. (31)

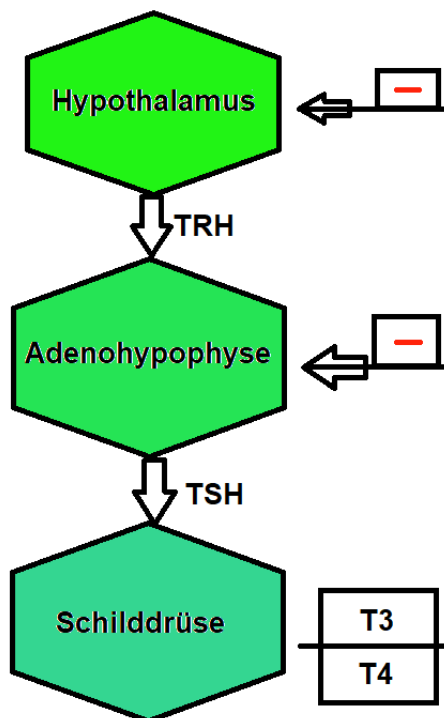


Abbildung 1: Thyreotroper Regelkreis. Grafik Eigenkreation

Sind die SDHR der Regulationsinstanzen allerdings unbesetzt, fällt nicht nur die Hemmung weg und die Produktion von TRH und TSH wird standardmäßig wiederaufgenommen, sondern es kommt zu einer Liganden- unabhängigen Aktivierung, wodurch vermehrt TRH und TSH produziert und sezerniert werden. (28)

2.2.2 TRH und TSH

TRH wird hauptsächlich im nucleus paraventricularis (NPV) des Hypothalamus synthetisiert und spielt neben seiner Funktion als Neurotransmitter eine zentrale Rolle in der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen- Schilddrüsen- Achse. (32) (33) (34) Es wurde 1969 als erstes hypothalamisches Neuropeptid entdeckt. (35)

Das fertige TRH besteht aus nur 3 Aminosäuren, welche posttranslational aus einem größeren Vorläuferprotein isoliert und modifiziert wurden. (33) (36) Das Gen für TRH liegt auf Chromosom 6 und umfasst 3 Exone. (34)

TRH stimuliert in zirkadianer Rhythmik (37) die Synthese und Freisetzung von TSH aus thyreotropen- und Prolaktin aus mammotropen Neuronen der Adenohypophyse. Damit erfüllt es neben seiner Funktion als thyreotropin releasing Hormon auch eine Funktion als Prolaktin releasing Hormon (PRH). (33) (34) (38) Dopamin hat dagegen eine hemmende Wirkung auf die Synthese von TSH. (39)

Das synthetisierte TRH wird intrazellulär in sekretorischen Granulae gelagert, womit es vor dem Abbau durch die Prolin- Endopeptidase und die Pyroglutamyl Peptidase I geschützt ist. Diese Vesikel werden Kalzium (Ca^{2+}) abhängig exozytiert wodurch TRH über die eminentia mediana in den hypophysären Venenplexus gelangt. (40) (41)

An den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse angekommen, bindet TRH an den TRH-Rezeptor-1. Dieser G- Protein gekoppelte Rezeptor führt über eine Aktivierung der Phospholipase C zur Bildung von Inositol – 3 Phosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) was wiederum zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration führt. Ca^{2+} selbst aktiviert die Proteinkinase C, welche über den für die Hypophyse charakteristischen Transkriptionsfaktor Pit1 zur Synthese und Freisetzung von TSH führt. (33) (34) (36) (42)

TSH, als eines der Glycoprotein hormone, besitzt über seinen Rezeptor an den Thyreozyten eine zentrale Rolle in der Regulation der Serumspiegel der SDH sowie der Entwicklung und dem Wachstum der Schilddrüse selbst. (34) (40) (43) (44)

Es besteht aus einer alpha und einer beta Untereinheit welche nicht kovalent gebunden sind, wobei nur die beta Untereinheit für TSH spezifisch ist. Alle Glycoprotein hormone, zu denen neben TSH auch das Luteinisierendes Hormon (LH), das Follikel stimulierendes Hormon (FSH) und das Choriongonadotropin (CG) zählen, besitzen dieselbe alpha Untereinheit. Diese alpha Kette wird auf Chromosom 6 kodiert und umfasst 4 Exone, wohingegen die TSH spezifische beta Kette auf Chromosom 1 kodiert wird und 3 Exone umfasst. (34) (39)

Der TSH-Rezeptor (TSHR) gehört zur Familie der G-protein gekoppelten Rezeptoren und ist mit einer Exodomäne von 45.2kDa, welche allein etwa die Hälfte seines Gesamtgewichts ausmacht, ein sehr großes Exemplar dieser Rezeptorfamilie. (45) Die geschätzte Zahl der TSHR pro Thyreozyt beträgt 1000. (31)

Der TSHR ist, im Gegensatz zu anderen Glycoprotein hormone-Rezeptoren konstitutionell aktiv. Allerdings können Mutationen im Rezeptorgen zu einer Erhöhung seiner Grundaktivität führen und durch Bindung von TSH kann er vollständig aktiviert werden. (44)

Der intrazelluläre Signalweg des TSHR führt hauptsächlich über das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) (44) (46) aber auch über IP3 und DAG. (44) cAMP stimuliert die Aufnahme von Iodid, die Freisetzung der SDH und das Wachstum der SD wohingegen IP3 und DAG die Hormonproduktion erhöhen. (40) (47)

2.2.3 T3 und T4

2.2.3.1 Synthese und Freisetzung von T3 und T4

Die Synthese der SDH ist eng mit dem histologischen Aufbau der Schilddrüse selbst verbunden. (2.1) (26)

Iodid als essenzielles Element der SDH, wird im Gastrointestinaltrakt aufgenommen, über das Blut im Körper verteilt und in den Follikelzellen konzentriert. (26) (47) Über den Na⁺/I⁻ Symporter (NIS), der sich in der basolateralen Zellmembran der Follikelzellen befindet, sind sie in der Lage, Iodid um den Faktor 20-40 aus dem Plasma zu konzentrieren.(2) (47) (48) Die Funktion des NIS beruht auf der Natrium/Kalium Pumpe (Na⁺/K⁺ Pumpe), welche ebenfalls in der basolateralen Membran der Thyreozyten lokalisiert ist. Sie erzeugt ein nach intrazellulär gerichtetes Natrium Gefälle welches der NIS als sekundär aktiver Transporter nutzt, um zwei Natrium- sowie ein Iodid Atom in die Zelle aufzunehmen. (26) (47) Die Expression des NIS ist hauptsächlich TSH abhängig, (26) (47) jedoch spielt die intrazelluläre Iodid Konzentration ebenfalls eine Rolle. (48) (49) Bei über ein bis zwei Tage anhaltenden, hohen, intrazellulären Iodid Konzentrationen sinkt die SDH-Synthese, was auch als Wolff-Chaikoff Effekt bekannt ist. (49) (50)

Durch die aktive, intrazelluläre Konzentration von Iodid, ausgehend von der basolateralen Zellmembran, findet der Transport an der apikalen Zellmembran ins Follikellumen passiv über Transportmoleküle statt. (51) Dieser Prozess ist auch als Iodid Efflux bekannt. (26) Die Transporter Pendrin (52) (53), Chlorid channel 5 (54) und Anoctamin-1 (55) spielen dabei eine entscheidende Rolle. Durch die intrafollikuläre Organifikation des Iodids wird dieser Gradient aufrechterhalten, womit Iodid apikal weiterhin passiv aus den Follikelzellen ausströmen kann. (51)

Die Organifikation des Iodids findet am Übergang zwischen der apikalen Zellmembran und des Follikellumens statt.(51) (56) Dabei spielt das Glykoprotein Tg, welches in den Thyreozyten selbst synthetisiert und an der apikalen Zellmembran ins Follikellumen exozytiert wird, eine entscheidende Rolle.(26) (1) Tg liegt in homodimerisierter Form vor, das heißt, dass es aus zwei identischen Untereinheiten besteht welche beide mehrere Thyrosin-Reste aufweisen, an die Iodid im Verlauf der Synthese der SDH kovalent gebunden wird. (12) (26) (57)

Diese Reaktion wird von der TPO, die unter anderem innerhalb der apikalen Plasmamembran zu finden ist, katalysiert. (56) (58) Sie nutzt das von der dualen

Oxidase 1 und 2 (DUOX1) (DUOX2) synthetisierte H₂O₂ um Iodid an Thyrosin-Reste von Tg zu binden. (26) (59)

Dabei entsteht zunächst MIT. Je mehr Iodid an Tg gebunden wird, desto mehr wird, aus energetischen Gründen, die Bildung von DIT begünstigt, wodurch die Wahrscheinlichkeit für die SDH-Bildung verbessert wird. (12) (60)

Die Synthese von T₃ und T₄ findet ebenfalls an den Thyrosin-Resten eines Tg-Proteins statt. Dabei katalysiert TPO die Übertragung von einer oder zwei Iod-Gruppen eines MIT oder eines DIT auf ein DIT womit T₃ oder T₄ entsteht. (56) (61)

Das iodierter Tg wird innerhalb der Follikel gespeichert und bildet den Hauptbestandteil des Kolloids. (11) Diese Speicherung ist wichtig für die Stabilität des Serumspiegels der SDH, da so Zeiten der geringen Aufnahme oder des erhöhten Verbrauchs von Iod und SDH überstanden werden können. (1) (12) (51)

Bindet TSH nun basolateral an den TSHR wird die Endozytose via Pinozytose von Tg induziert. (1) (26) (62) Innerhalb der endozytierten Vesikel werden MIT, DIT, T₃ und T₄ enzymatisch von Tg abgespalten. Dabei gehen MIT und DIT jedoch nicht verloren, sondern werden von der Iodthyrosindehalogenase 1 (DEHAL1) recycelt. (11) (26) (63)

Die SDH werden über Transporter in der basolateralen Membran in den Körper freigesetzt und vom dichten Kapillarnetz der Schilddrüse in den Blutkreislauf aufgenommen (26) (51). Dabei spielt der Monocarboxylase Transporter 8 (MCT8), der SDH sowohl nach intrazellulär wie auch nach extrazellulär transportieren kann, eine wichtige Rolle. (2) (64)

Im Rahmen der Freisetzung der SDH beträgt der Anteil des Prohormons T₄ 80%, während T₃ als die aktive Form der SDH nur zu 20% direkt sezerniert wird. (2) (65)

2.2.3.2 Physiologisches Verhalten von T₃ und T₄

Im Blut liegen die SDH aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften hauptsächlich in gebundener Form vor. (66) Insgesamt sind dabei über 99% von sowohl T₃ als auch T₄ (66) (67) entweder an das Thyroxin bindende Globulin (TBG) (ca. 60%), das Thyroxin bindenden Präalbumin (TBPA) (ca. 30%) oder Serum Albumin (SA) (ca. 10%) reversibel gebunden. (68) Nur der kleine, frei im Plasma vorliegende Anteil der SDH kann auf Zellebene seine hormonelle Wirkung entfalten. (2) (67) Die SDH-

Bindungsproteine dienen als SDH-Reservoir (2), verringern den Iodverlust während des Abbaus der SDH und spielen vermutlich eine Rolle beim gezielten Transport derselben. (66)

Da durch genetische Varianten der SDH-Bindungsproteine deren Quantität sowohl erhöht als auch erniedrigt sein kann, während im Zielgewebe physiologische Konzentrationen von freiem T3 (fT3) und T4 (fT4) herrschen, hat es sich etabliert zur laborchemischen Bestimmung des Funktionsstatus der Schilddrüse neben TSH das fT3 und fT4 zu messen. (67) (69) (70)

Um in die Zielzelle zu gelangen sind die SDH allerdings auf Transporter angewiesen. (2) (71) Dazu zählt unter anderem der L-Type aminoacid transporter 1 (Lat1) (72), welcher für die SDH-Aufnahme in Neurone, Astrozyten und eventuell weitere Zelltypen verantwortlich ist (2) und der MCT8-Transporter, welcher in der Leber, der Nieren dem Gehirn und vielen weiteren Organen exprimiert wird.(2) (73)

Um in den Zielgeweben eine konstante und an den Bedarf angepasste Konzentration von SDH zu gewährleisten, können durch membranständige Deiodinasen (Dio) SDH sowohl aktiviert als auch inaktiviert werden.(74) (75) (76) Es existieren mehrere Varianten dieses selenocystein-enthaltenden Enzyms, denen gemein ist, dass sie eine Iod-Gruppe von SDH abspalten können.(75) (77) Dio1 und Dio2 aktivieren T4 zu T3, indem sie die Iodgruppe am äußeren Ring (5') entfernen, (74) (78) wohingegen vor allem Dio3 und zu einem geringeren Anteil auch Dio1 (79) ihre Deiodinaseaktivität am inneren Ring (5) entfalten, wodurch sowohl T3 als auch T4 inaktiviert werden. (74)

Aufgrund der gewebeabhängigen, lokalen Verfügbarkeit der Dio1 und Dio3 können die SDH-Spiegel lokal an die Bedürfnisse der entsprechenden Gewebe angepasst werden und sind damit nahezu unabhängig von der Menge der zirkulierenden SDH. (2) (80)

Innerhalb der Zelle entfalten die SDH ihre Wirkung hauptsächlich über die Bindung an den nukleären SDH- Rezeptor alpha1 und beta1. (78) (81) (82) Es wird diskutiert, dass SDH-Rezeptoren aufgrund ihrer Fluktuation zwischen Zytosol und Nucleus den SDH – zusätzlich zur Diffusion - als „Fähre“ dienen könnten, um die Kernmembran zu überwinden. (81) (83) (84) Der Komplex aus SDH-Rezeptor und T3 wirkt dann als liganden abhängiger Transkriptionsfaktor, indem er an SDH-Response Elemente verschiedener Gene bindet, wodurch deren Transkription entweder aktiviert oder gehemmt wird. (78) (81) (82)

2.2.3.3 Wirkung der Schilddrüsenhormone T3 und T4

Die physiologische Wirkung der SDH ist gewebeabhängig und reguliert viele Aspekte der Entwicklung, des Wachstums und des Metabolismus. (85) (78) Dabei sind sie an der Regulation und Proliferation von Stammzellen beteiligt, wodurch sie ihre wichtige Rolle im Wachstum und der Entwicklung einnehmen. (76) Sie sind von essenzieller Wichtigkeit für die normale Entwicklung des Gehirns. (76) (85) (86). Im Gastrointestinaltrakt sind SDH mitverantwortlich für die Leberzellproliferation nach Leberteilektomie (87), im Pankreas stimulieren sie die Proliferation und das Überleben von beta-Zellen (88) und im Darm sorgen sie für eine physiologische Motilität. (89) Sie regulieren die Lipogenese und Lipolyse sowie den Cholesterin- und den Kohlenhydratstoffwechsel. (90) Somit ist der Grundbedarf abhängig von der Menge an SDH. Dies betrifft auch die Skelettmuskulatur, in welcher sie den Energiekonsum sowie die Wärmeproduktion bei Aktivität stimulieren. (91) Die Hautdurchblutung, Haarstruktur- und Follikel werden ebenso durch SDH reguliert wie die Entwicklung der Cochlea und der Retina. (76) (92). Innerhalb des Knochenstoffwechsels stimulieren sie das Wachstum, sorgen aber auch beim Erwachsenen für ein Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau- und Abbau. (76) Im Herz erhöhen SDH unter anderem die Sensitivität für normale sympathomimetische Reize wodurch sie eine positiv, inotrope, lusitrope, chronotrope und dromotrope Wirkung haben. (93)

2.3 TPO und TPO-Antikörper

2.3.1 TPO

TPO ist das hauptverantwortliche Enzym in der Synthese der SDH und kommt als häm-enthaltendes Glykoprotein in der apikalen Plasmamembran der Thyreozyten vor. (10) (56) (58) Das TPO-Gen auf Chromosom 2 besteht aus 17 Exons. (94) (95) Es codiert die aus 933 Aminosäuren bestehende TPO-1. (96) Durch alternatives Splicing werden noch weitere TPO Varianten gebildet, wobei nicht für alle Varianten die physiologische Funktion bekannt ist. (26) (94) TPO 1 besteht aus einer extrazellulären Domäne am N-Terminus, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne am C-Terminus. (10) Außerdem enthält sie 5 mögliche Glykosylierungsstellen. (96) Die N-terminale Region der TPO 1 zeigt Ähnlichkeiten mit dem Enzym Myeloperoxidase (MPO). (10) Insgesamt ist die TPO zu 42% identisch mit

der MPO, (97) deren Tertiärstruktur beschrieben werden konnte. (98) Die exakte Tertiärstruktur sowie Quartärstruktur der TPO 1 ist derzeit allerdings unbekannt. (10) (99)

Posttranslational wird die TPO 1 glykosyliert, dimerisiert und am N-Terminus innerhalb der MPO- Domäne kovalent mit einer Häm-Gruppe verbunden. (100) (101) Die kovalente Bindung der Häm-Gruppe geschieht autokatalytisch durch H₂O₂. (102) Sie ist wichtig für den Weitertransport zur apikalen Zellmembran und bildet das aktive Zentrum des Enzyms. (56) (95) (102)

Momentan sind wissenschaftlich einige Fragen zur TPO noch ungeklärt. So ist, neben der unbekanntem Tertiär- und Quartärstruktur, der exakte Ort der Dimerisierung der TPO-Monomere noch unbekannt (95) (99) Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Ektodomäne von TPO sowohl als Dimer als auch als Monomer vorliegen könnte. (99) Es wurden auch zwei Modelle entwickelt, wonach das aktive Zentrum sowohl intra- als auch extrazellulär liegen könnte. (99)

2.3.2 TPO als Autoantigen

TPO ist eines der haupt- Antigene bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen wie der Hashimoto-Thyreoiditis oder dem Morbus Basedow. (10) (99)

Die exakte Struktur der Epitope des TPO-Moleküls, welche von Autoantikörpern erkannt werden, ist derzeit noch unbekannt und bedarf der genauen, hochauflösenden Aufklärung der Tertiär -und Quartärstruktur. (10) (99)

Allerdings wurden zwei diskontinuierliche Abschnitte der TPO, welche hauptsächlich in der MPO-ähnlichen Domäne liegen, (103) als Epitope beschrieben. Sie werden als immunodominante Region A und B (IDR A) (IDR B) bezeichnet. (10) (97) (103) Es gibt zwar unterschiedliche Epitope, jedoch ist das Verhältnis, in welchem die TPO-AK IDR A und/oder IDR B erkennen patientenspezifisch, über die Zeit stabil und wird genetisch in der Familie weitergegeben. (97) (104)

Auf IDR A liegen die Antikörper-Bindungsstellen vermutlich zu weit voneinander entfernt, als dass ein einzelner Antikörper dort binden könnte. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass sich die Struktur der TPO verändert, oder das Dimer sogar dissoziiert, damit dieses Epitop den Antikörpern zugänglich wird. (99) (103)

Die Antikörper-Bindungsstellen auf IDR B liegt an der Schnittstelle zwischen den beiden TPO-Monomeren, womit es - zumindest in dieser Konfiguration der TPO - einer Bindung durch TPO-Ak entgehen kann. (103)

Williams et. al. konnte zeigen, dass das antikörperspezifische Fragment (Fab) des Antikörpers lieber an das TPO- Monomer als das Dimer bindet. Dies gibt zu vermuten, dass die TPO deutliche strukturelle Veränderungen unterläuft, welche die Antikörper-Bindungsstellen der Epitope so zusammenführen, dass der Antikörper binden kann. (99)

2.3.3 Break in Tolerance

Dass Antikörper gegen die TPO gebildet werden, liegt an einem Toleranzverlust dem Antigen gegenüber, welcher auf genetischen sowie umweltbedingten Faktoren beruht. (105)

Ein einzelner Faktor, der den Toleranzverlust den Schilddrüsenproteinen, - u.a. TPO - gegenüber erklärt, konnte nicht identifiziert werden. Es handelt sich eher um ein Zusammenspiel eines anfälligen genetischen Hintergrunds, geringer zentraler Toleranz der TPO gegenüber, den autoantigenen Eigenschaften der TPO selbst sowie dem Einfluss von Umweltfaktoren. (106)

Die negativ- Selektion autoreaktiver T- Zellen innerhalb des Thymus stellt die Basis der zentralen Toleranz dar. (107) Ihre Stärke wird von der Menge der TPO bestimmt, welche auf Zellen des Thymus präsentiert wird und damit zum „Training“ des Immunsystems beiträgt (106). Da für die B-Zell Aktivierung T-Zellen benötigt werden, spielt die Ruhigstellung der B-Zell Autoreaktivität eine im Vergleich zur Selektion autoreaktiver T-Zellen untergeordnete Rolle. (106)

Zu den Eigenschaften der TPO, welche zum Toleranzverlust beitragen zählen ihre Membrangebundenheit, ihre Größe sowie Verfügbarkeit. (106)

Zu den umweltbedingten Einflussfaktoren, die zum Toleranzverlust beitragen können, gehören ein Überangebot an Iod (108), verschiedene Medikamente wie Interferon alpha (109), Infektionen (110) wie Hepatitis C (111) (112), Rauchen (105) (113) sowie eventuell Stress. (105)

Allerdings spielen genetische Determinanten in der Entwicklung von AITD die vorherrschende Rolle wie zumindest für Morbus Basedow gezeigt werden konnte. (114) Dabei sind alle identifizierten Gene, die die Anfälligkeit für AITD erhöhen, Signal- oder Verbindungsgene, welche für die Interaktion der Immunzellen untereinander benötigt werden. (105) Tomer et. al. schlägt vor, dass diese Genvarianten zum Verlust der Selbsttoleranz beitragen, der Toleranzverlust selbst jedoch durch einen Zellschaden aufgrund einer Infektion, Medikamenten oder Iod getriggert wird. Dabei entstehe zunächst eine Entzündung, die lokale T-Zellen aktiviere, welche dann eine autoimmune Reaktion in genetisch anfälligen Individuen verursachen. (105)

Die TPO-Ak werden jedoch in Reaktion auf MHC II gebundenes TPO auf den Thyreozyten selbst gebildet und nicht in Reaktion auf freigewordene TPO in Folge eines Zellschadens der Schilddrüse. (97)

Allerdings ist das Verständnis des genauen Ablaufs des Toleranzverlusts der TPO gegenüber noch unvollständig. (10)

2.3.4 TPO- Antikörper

Durch den Toleranzverlust des Immunsystems der TPO und anderen Schilddrüsenantigenen (Tg und TSHR) gegenüber kommt es zur Infiltration der SD mit B- und T-Zellen. TPO-Ak werden hauptsächlich von infiltrierenden B-Zellen produziert, wobei die Höhe der TPO-Ak im Serum mit der Stärke der lymphozytären Infiltration der SD assoziiert ist. (13) (115)

Da die TPO verschiedene Epitope besitzt, sind menschliche TPO-Ak polyklonale Antikörper und kommen bei über 90% der Patienten mit HT und bei 75% der Patienten mit Morbus Basedow vor. (10) (116) (117) Es sind hauptsächlich IgG Antikörper verschiedener Subklassen welche in sehr hohen Konzentrationen in Bereichen von bis zu mg/dl vorkommen können.(97) Häufig treten sie zusammen mit Tg-Ak auf. (97) Vermutungen eines gemeinsamen, kreuzreaktiven Epitops von Tg und TPO konnten widerlegt werden. (116) (118) Allerdings wurde bei HT-Patienten ein bispezifischer TPO- Tg Antikörper gefunden, dessen Funktion in einer protektiven Rolle bei diesen Patienten vermutet wird. (119)

Das Vorkommen der TPO-Ak bei AITD-Patienten lässt vermuten, dass sie zumindest mitverantwortlich sind für das entstehende Schilddrüsenversagen. - entweder indem

sie die Follikelzellen schädigen oder durch Inhibition der TPO. (13) (97) (115) Vermutlich aufgrund ihrer Heterogenität induzieren die TPO-Ak nicht bei allen Patienten eine Enzyminhibition. (13) Okamoto et. al. konnte zeigen, dass bei Patienten mit Morbus Basedow die TPO-Aktivität in 24% der Fälle und bei Patienten mit HT in 40% der Fälle gehemmt wurde. (120)

TPO-Ak können über natürliche T-Killerzellen eine ADCC induzieren. Dabei erkennen natürliche T-Killerzellen die auf Thyreozyten gebundenen TPO-Ak und greifen daraufhin die Zelle an. (13) (121)

Neben ihrer Fähigkeit, bei manchen Patienten eine ADCC zu induzieren, sind TPO-Ak in der Lage - ebenfalls nicht bei allen AITD- Patienten - Complementfaktoren zu fixieren, was zu einer Complement-induzierten Zytotoxizität führt. Es konnte keine Korrelation zwischen der Höhe der TPO-Ak Titer und der Complement-induzierten Zytotoxizität gefunden werden, wobei einschränkend erwähnt werden muss, dass bei niedrigen TPO-Ak Titern keine Complement-induzierte Zytotoxizität messbar war. Dies wird auf die Heterogenität im Vorhandensein verschiedenen IgG Subklassen und deren funktioneller Affinität zurückgeführt (14)

Die Antigenaffinität kann zwischen den Patienten innerhalb der IgG TPO-Ak Subklassen zwar variieren, wird aber für IgG II TPO-Ak prinzipiell als am stärksten beschrieben. TPO-Ak der Klasse IgG I sind für die Induktion des ADCC sowie für die Complementfixierung verantwortlich, wobei IgG III TPO-Ak die von allen Subklassen stärkste Fixierung der Complementfaktoren hervorrufen. (13) (14)

Neben ihrem Vorkommen bei Patienten mit AITD, finden sich TPO-Ak häufig auch bei euthyreoten Patienten ohne bekannte Schilddrüsenerkrankung. So konnte in der NHANES III Studie aus Amerika gezeigt werden, dass 11,3% der circa 17.000 Studienteilnehmer positive TPO-Ak aufwiesen. Dabei lag das Männer- Frauen Verhältnis mit 8% zu 14% bei circa 1:2. Mit steigendem Alter nimmt die Häufigkeit von TPO-Ak in der euthyreoten Bevölkerung zu. (122) Allerdings sind TPO-Ak bei Personen über 100 Jahren nur in 5,8% der Fälle nachweisbar, (123) was vermuten lassen könnte, dass deren Vorkommen mit einer niedrigeren Lebenserwartung assoziiert ist. (13)

Das Vorkommen von TPO-Ak bei schilddrüsengesunden Personen stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung einer AITD dar. (124, 125) Neben anderen

genetischen Marken spielt ein Polymorphismus im MAGI3 Gen in der Entwicklung von TPO-Ak Positivität hin zu einer ATD eine Rolle.(8, 126) Es wurde beschrieben, dass der TSH-Serumspiegel bei Frauen zwar den Hauptindikator für die Entwicklung einer manifesten aus einer subklinischen Hypothyreose darstellt, das Risiko jedoch von 2,6% auf 4,3% steigt, sobald die Betroffene ebenfalls TPO-Ak aufweist. (127) (128)

Allerdings wurde in einer Studie aus Sachsen, zur Prävalenz von Schilddrüsenerkrankungen, bei nahezu allen der 1295 euthyreoten Teilnehmer TPO-Ak zumindest im sehr niedrigen Bereich gefunden. In dem Bereich $<1,1$ IU/ml folgte die Menge der TPO-Ak dabei einer Gauß'schen Normalverteilung die unabhängig von Alter und Geschlecht war. (129) Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei TPO um ein Antigen für natürliche Autoantikörper handelt. (13) (130)

TPO-Ak spielen auch im Bereich der Reproduktionsforschung eine Rolle. Selbst bei euthyreoten Frauen steht ihr Vorkommen mit einer verminderten Fruchtbarkeit (131) und erhöhten Raten an Schwangerschaftskomplikationen in Verbindung.(132) Um Risikopatientinnen für Schwangerschaftskomplikationen, wie Frühgeburtlichkeit oder Fehlgeburten frühzeitig zu erkennen, empfiehlt die Guideline der amerikanischen Schilddrüsenassoziation die Messung der TPO-Ak innerhalb des Schilddrüsencreening.(133) Neben erhöhtem Risiko während der Schwangerschaft für den Fetus, erhöht das Vorhandensein von TPO-Ak auch nach der Schwangerschaft das Risiko der Frau an einer post partum Thyreoiditis zu erkranken. (133)

Außerdem wird in der Literatur die positive Assoziation zwischen dem Vorhandensein von TPO-Ak und kardio- metabolischen Risikofaktoren wie Arteriosklerose bei euthyreoten Patienten diskutiert. (134) (135) Zudem wurde ein erhöhtes Vorkommen von TPO-Ak bei Patientinnen mit Brustkrebs im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden. (136)

2.4 Funktionszustände der Schilddrüse

Liegt eine normale Schilddrüsenfunktion vor, bezeichnet man das als Euthyreose. (137)

Um die Schilddrüsenfunktion zu bestimmen, wird als wichtigster Parameter die Serum TSH-Konzentration bestimmt, häufig gemeinsam mit der Serumkonzentration von fT4. (69) (70)

Der Begriff der Hyperthyreose beschreibt einen Zustand, bei dem auf Gewebeebene zu viele SDH vorliegen, was zu einem breiten Spektrum an klinischen Symptomen führen kann. Im Labor findet sich ein unterdrücktes Serum TSH bei erhöhtem fT4. (7) (138)

Als subklinische Hyperthyreose wird ein Laborbefund aus unterdrücktem oder erniedrigtem TSH bei jedoch normalen fT4 Werten beschrieben. (7, 138) Trotz der Bezeichnung „subklinisch“ können hyperthyreote Symptome vorliegen. (138)

Unter Hypothyreose versteht man eine auf Gewebeebene erniedrigte Konzentration an SDH aufgrund unzureichender SDH-Produktion, welche zu vielseitigen Symptomen führen kann. Laborchemisch findet sich ein erhöhtes TSH bei erniedrigtem fT4. (139)

Als subklinische Hypothyreose bezeichnet man eine erhöhte TSH- Konzentration bei normaler fT4 Konzentration. (13) (139)

Da die SDH an unterschiedlichsten Organen ihre physiologische Wirkung (2.2.3) entfalten, sind auch die Symptome einer Hyper- bzw. Hypothyreose sehr vielfältig. (7) (69) (138) (139) (140) Tabelle 1 fasst diese zusammen.

Hyperthyreose	Hypothyreose
Gewichtsverlust bei erhöhtem Appetit	Gewichtszunahme
Häufiger Stuhlgang	Obstipation
Hitzeintoleranz	Kälteintoleranz
Feuchte, warme Haut	Trockene, kalte Haut
Haarausfall	Vergröbertes Haar mit Haarausfall
Onycholyse (Nagelablösung)	Dünne, fragile Nägel
Tachykardie	Bradykardie und verlängerte QT-Zeit
Muskelschwäche	Muskelschwäche,-Schmerz,-Krämpfe
Dyspnoe	Bradypnoe mit Hypoxie
Palmarerythem	Anämie
Zyklusstörungen	Zyklusstörungen
Depression, Angst	Depression, Angst
Feiner Tremor	Konzentrationsschwierigkeiten
Nervosität, Schlafstörungen	Müdigkeit
Lebhafte Reflexe	Verspätete Reflexrelaxation
Schnelle, gepresste Sprache	Stimmveränderungen
SD-Vergrößerung	SD- Vergrößerung

Tabelle 1: Übersicht über die Symptome der Hyper- bzw. Hypothyreose. Quellen: (7) (69) (138) (139) (140)

2.5 Autoimmunthyreopathien

Mit einer Prävalenz von ca. 5% ist die SD das am häufigsten von autoimmunen Erkrankungen betroffene Organ des menschlichen Körpers. (4) (6) (105) (141) Die häufigsten AITDs sind Morbus Basedow und Hashimoto Thyreoiditis welche sich histopathologisch durch ein lymphozytäres Infiltrat der SD charakterisieren. Labormedizinisch lassen sich Autoantikörper gegen SD-Proteine nachweisen und klinisch kommt es bei Morbus Basedow zu einer erhöhten, und bei der HT zu einer erniedrigten Schilddrüsenfunktion. (4) (105)

2.5.1 Hashimoto Thyreoiditis

1912 wurde die Hashimoto Thyreoiditis erstmals von Hakaru Hashimoto beschrieben, damals unter dem Namen „Struma lymphomatosa“. (142) Erst 1931 wurde sie jedoch als eigenständiges Krankheitsbild anerkannt und der Name Hashimoto Thyreoiditis setzte sich durch. Mit der Entdeckung 1956, dass Autoantikörper gegen Thyreoglobulin bei HT-Patienten vorkommen, wurde die Krankheit als AITD klassifiziert. (143)

Heute gilt die HT sowohl als die häufigste AITD als auch die häufigste Ursache für eine Hypothyreose in Nicht-Iod-Mangelgebieten. (9) In Iod-Mangelgebieten ist der Iodmangel die häufigste Ursache für eine Hypothyreose. (144) Bezüglich der HT konnte gezeigt werden, dass Frauen im Verhältnis zu Männern von 4-10:1 deutlich häufiger betroffen sind, dass die Prävalenz der HT und das Vorkommen von anti-Thyroid-Antikörpern mit dem Alter zunimmt und dass es Unterschiede in der Prävalenz der HT bezüglich der geographischen Region und der Ethnizität gibt. (4) (6) (141) (144)

Als Ursache der HT werden eine Kombination aus genetischen Ursachen und Umweltfaktoren angenommen, welche zu einem immunologischen Toleranzverlust mit nachfolgendem Angriff auf die SD führen. (4)

Histopathologisch imponiert ein diffuses, lymphozytäres Infiltrat und das Vorkommen von aktivierten Lymphfollikeln. (143) Einwandernde Zellen des Immunsystems sind sowohl T- als auch B- Zellen. (9) Dabei kommen regulatorische T-Zellen, welche Regulatoren des Immunsystems sind und eine wichtige Rolle in der Prävention von Autoimmunität aufweisen, bei HT-Patienten vermindert vor. (145) (146) Zytotoxizität aufgrund infiltrierender CD8+ Zellen welche gegen SD-Autoantigene wie Tg und TPO gerichtet sind (95) (8), vermehrtes Vorkommen Apoptose induzierender Moleküle wie Fas (147) und caspase-3 (148) sowie von B-Zellen produzierte Autoantikörper führen zu Fibrose und Atrophie der SD. (8) (9) (149) Dabei entsteht die Hypothyreose aufgrund der Zerstörung der Thyreozyten. (150)

Verschiedene Varianten der HT können klinisch und histopathologisch unterschieden werden. Bei der fibrotischen Variante ist die SD vergrößert und das Schilddrüsenparenchym wird vollständig fibrös ersetzt, wobei die Fibrose die Organgrenzen nicht überschreitet. (69) (151) Anders ist es bei der Riedel Thyreoiditis, bei der sich die Fibrose auch über die Organgrenzen hinweg manifestiert. (69) (143) Die fibrös atrophe Variante zeichnet sich durch eine sehr kleine (1g-6g) und stark fibrös

durchsetzte SD aus. (143) (150) Die IgG4 Thyreoiditis beschreibt die durch ein gehäuftes Vorkommen von IgG4- produzierenden Plasmazellen hervorgerufene, schnell progrediente Zerstörung der SD und kommt hauptsächlich bei jüngeren Patienten vor. (69) (143) (152)

Klinisch kann sich die HT sehr unterschiedlich präsentieren (69), wobei das Spektrum vom isolierten Vorkommen von SD-Antikörpern bei normaler SD-Funktion bis hin zu starker Hypothyreose reicht. Manche Patienten zeigen eine kurze Phase der Hyperthyreose. Allerdings entwickelt sich die Erkrankung häufig von einem euthyreoten Funktionszustand über eine subklinische Hypothyreose zur manifesten Hypothyreose.(149) Zusätzlich zu Symptomen der Hypothyreose können durch die SD-Veränderungen lokale Symptome wie Dysphonie, Dysphagie und Dyspnoe entstehen. (69) (150)

Die Diagnostik der HT setzt sich aus der klinischen Präsentation, den im Serum gemessenen SD-Antikörpern und Funktionsparametern, der Sonographie und selten der Zytologie zusammen. (9) (69) Erhöhte TPO-Ak (2.3.4) gelten als starker Hinweis für das Vorliegen einer HT und finden sich bei bis zu 95% der HT-Patienten. (69) Tg-Ak finden sich dahingegen nur bei 60-80% der HT-Patienten und kommen auch häufiger bei Gesunden vor, weswegen sie sowohl weniger sensitiv als auch weniger spezifisch für das Vorliegen einer HT sind. (69) Die Sonographie ist die am häufigsten eingesetzte bildgebende Methode bei SD-Erkrankungen. (153) Bei HT stellt sich die SD diffus vergrößert und hypoechogen dar. (69)

Die Therapie der HT ist abhängig von der klinischen Präsentation des Patienten. (154) Wenn Symptome aufgrund der Hypothyreose auftreten oder das TSH auf über 10mU/ml steigt, besteht sie in der lebenslangen, oralen Einnahme von Levo-Thyroxin (L-T4).(69) (150) (154) Ansonsten kann der Verlauf unter regelmäßigen Kontrollen zunächst beobachtet werden. (154) Eine kausale Therapie gibt es derzeit nicht, was unter anderem an den geringen Kosten der L-T4 Therapie liegt, wodurch pharmazeutische Konzerne keinen Anreiz sehen, neue Therapiekonzepte zu entwickeln. (69) Liegt eine IgG-4 HT vor, sollte ein Therapieversuch mit Glucocorticoiden unternommen werden, da damit die Krankheit eventuell geheilt und eine lebenslange Therapie vermieden werden kann. (69) (150) (155)

Eine wichtige Komplikation der HT ist die HT-Enzephalopathie.(150) Klinisch zeigen sich sowohl neurologische als auch psychiatrische Symptome, zu denen kognitive

Dysfunktion, Tremor, Krämpfe, Myoklonie sowie Ataxie und fokale Defizite gehören können. Therapeutisch zeigen Glucocorticoide bei vielen Patienten eine gute Wirksamkeit. Die genaue Pathogenese ist jedoch derzeit unbekannt. (69) (150) (156) Außerdem stellt die HT einen Risikofaktor für die Entstehung eines Non-Hodgkin SD-Lymphoms (150) und anderer SD-Karzinome dar.(157) Darüber hinaus ist sie ein Risikofaktor für Fehlgeburten. (69) (158)

2.5.2 Morbus Basedow – Graves Disease

Robert J. Graves hat 1835 als Erster vier Fälle von Frauen mit Palpitationen, Kropf und Exophthalmus beschrieben. Karl von Basedow hat 1840 unabhängig von Graves die Trias aus Kropf, Palpitationen und Exophthalmus beschrieben, welche er nach seiner Heimatstadt als Merseburger Trias benannte. Heutzutage wird auf dem europäischen Festland die Erkrankung als Morbus Basedow, im englischsprachigen Raum als Graves Disease bezeichnet. (159)

Heute ist bekannt, dass diese Erkrankung durch stimulierende Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor symptomatisch wird, weswegen sie als AITD klassifiziert wird. (159) (160)

Morbus Basedow ist die häufigste Ursache für eine Hyperthyreose und schränkt bei 20-50/100,000 Personen pro Jahr die Lebensqualität aufgrund somatischer sowie psychiatrischer Symptome ein. Die Lebenszeitwahrscheinlichkeit beträgt 3% für Frauen und 0,5% für Männer. (6) (7) (161) Auch für den Morbus Basedow gilt, dass Frauen häufiger betroffen sind als Männer und die Inzidenz geographische Unterschiede aufweist. (7) Dabei tritt im Rahmen des Morbus Basedow bei 16/100,000 Frauen und bei 3/100,000 Männern eine Ophthalmopathie auf. (7) (162) In spezialisierten Zentren tritt eine behandlungsbedürftige Ophthalmopathie bei bis zu 50% Patienten mit Morbus Basedow auf, wobei das Sehvermögen nur bei 3%-5% dieser Patienten bedroht ist. (7) (162)

Als Ursache werden für den Morbus Basedow genauso wie für die HT eine Kombination aus genetischen Faktoren und Umweltfaktoren angenommen, welche zu einem immunogenen Toleranzverlust und infolgedessen zur Entwicklung der Autoimmunität führen. (7) (160) (163) Als Risikofaktor muss hier das Rauchen hervorgehoben werden, da es zum einen mit dem Vorkommen von Morbus Basedow

assoziiert ist, zum anderen aber das Risiko für diese Patienten an einer Ophthalmopathie zu erkranken deutlich erhöht. (Odds Ratio 7,7 95%KI [4,3-13.7]) (163)

Infiltrierende B-Zellen produzieren die für den Morbus Basedow pathognomonischen TRAK. Diese können anhand ihrer Funktion in Thyroid-stimulierende Ak, Thyroid-blockierende AK und neutrale Ak eingeteilt werden. Alle Formen der TRAK sind an der Pathogenese des Morbus Basedow sowie dessen extrathyroidalen Erscheinungen beteiligt. Über die Effekte der Thyroid-stimulierende Ak ist am meisten bekannt. Sie führen zu ähnlichen Effekten am TSHR wie TSH selbst, unterliegen jedoch keinem negativen Feedback-Mechanismus, womit sie die Zellproliferation, das Wachstum sowie die Sekretion der SDH fördern und zur Hyperthyreose führen. (7) (160) (164) TPO-Ak sind bei Basedow in bis zu 75% zu finden, und TgAk kommen mit einer etwas geringeren Häufigkeit von 40-60% vor. (9) (10) (116) Neben TRAK spielen sowohl T-Zellen sowie Zytokine und Chemokine bei Morbus Basedow eine pathophysiologische Rolle. (9) (160)

Klinisch fallen Patienten mit Symptomen der Hyperthyreose (2.4), Ophthalmopathie, prätibialem Myxödem und diffus vergrößerter Schilddrüse auf. (7) Eine palpabel vergrößerte SD findet sich bei über 80% der unter 44-jährigen und ist mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert, wohingegen sie bei Patienten über 60 in weniger als 50% zu finden ist. (7) (161) Die Ophthalmopathie zeigt sich symptomatisch durch trockene, juckende und schmerzende Augen, Lichtempfindlichkeit, verstärktes Tränen, Doppelbilder sowie ein Druckgefühl hinter dem Auge. In der klinischen Untersuchung fallen eine Retraktion des oberen Augenlides, eine Rötung des periorbitalen Gewebes sowie der Konjunktiven und ein Exophthalmus auf. (162) Das prätibiale Myxödem ist die häufigste Ausprägungsform der SD-Dermopathie. Selten finden sich myxödematös veränderte Hautareale an anderen Lokalisationen wie zum Beispiel den Füßen oder an durch Traumata geschädigten Bereichen. Die SD-Dermopathie kommt fast ausschließlich bei Patienten mit Ophthalmopathie vor, wobei von dieser Gruppe 4%-13% betroffen sind. (165)

Diagnostisch sollte bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen einer Hyperthyreose zunächst die Konzentration von TSH, fT4 und eventuell fT3 im Serum gemessen werden. (166) (167) Dabei zeigt das TSH den Funktionsstatus der SD an und ist bei Hyperthyreose erniedrigt. (167) Die Konzentration der SDH ist für die Bestätigung der

vorliegenden SD-Funktionsstörung, für die Einschätzung ihrer Schwere und das Therapiemonitoring wichtig. Um die Diagnose zu sichern, müssen entweder klassische klinische, extrathyroidale Krankheitszeichen vorhanden sein, oder die TRAK werden gemessen, welche mit nahezu 100%er Sensitivität und Spezifität bei Morbus Basedow erhöht sind. (160) (167) Außerdem können TPO-Ak einen Hinweis auf eine autoimmune Genese der Hyperthyreose liefern. (167) Auch können Ultraschall und Schilddrüsenszintigraphie diagnostisch eingesetzt werden. (166) Dabei stellt sich die SD im Ultraschall hypoechogen(168) und hypervaskularisiert als sogenanntes „thyroid inferno“ dar.(167) (169)

Therapeutisch gibt es drei etablierte Ansätze zur Behandlung Des Morbus Basedow. Ablative Therapien wie die Gabe von Radioiodid oder die chirurgische Entfernung der SD verursachen eine Hypothyreose und ziehen deswegen eine lebenslange Substitutionstherapie mit L-T4 nach sich. In Europa wird die medikamentöse Behandlung mittels Thionamiden am häufigsten eingesetzt. Allerdings kommen dadurch nur ca. 50% der Patienten in eine Langzeitremission (biochemische Euthyreose und negative TRAK). Um diese nicht idealen Therapieoptionen zu erweitern, wird an alternativen Therapien geforscht, darunter die Induktion der T-Zell Toleranz über die Gabe von TSHR- Peptiden. (160) (166)

2.5.3 Weitere Autoimmunthyreopathien

Neben den beiden häufigsten AITDs, der HT und dem Morbus Basedow, gibt es noch weitere Ausprägungen wie zum Beispiel die postpartum Thyreoiditis, die medikamenten-induzierte Thyreoiditis durch Interferon-alpha und die mit einem polyglandulären, autoimmunem Syndrom (PAS) assoziierte Thyreoiditis.(105)

Die postpartum Thyreoiditis tritt mit einer Prävalenz von 5% im ersten Jahr postpartum auf. Sie ist eine autoimmunbedingte, zerstörende Thyreoiditis. (170) Positive TPO-Ak stellen einen Risikofaktor für die Entwicklung einer postpartum Thyreoiditis dar, wobei Frauen mit positiven TPO-Ak im dritten Trimester ein Risiko von 80% aufweisen, nach der Geburt an einer postpartum Thyreoiditis zu erkranken. (171) Bei etwa 50% der Betroffenen zeigt sich die Erkrankung in einer Phase der Hypothyreose, bei 25% kommt es zu einer Phase der Hyperthyreose und bei den restlichen 25% zeigt sich die klassische Form aus einer hyperthyreoten gefolgt von einer hypothyreoten Phase.

(170) (171) Die Erkrankung ist nicht immer vorübergehend und bei ca. 50% der Betroffenen entwickelt sich eine bleibende Hypothyreose. (170)

Die Interferon- induzierte Thyreoiditis ist eine häufige Nebenwirkung der Interferon alpha Therapie bei Patienten mit Hepatitis C. Bis zu 15% dieser Patienten entwickeln eine klinisch manifeste SD-Dysfunktion und bis zu 40% entwickeln Antikörper gegen SD-Antigene. Dabei kann sowohl eine Hyper- als auch eine Hypothyreose auftreten. Aufgrund ihres häufigen Vorkommens bei Interferon alpha Therapie ist ein enges Monitoring der SD-Parameter sinnvoll, um eine Interferon- induzierte Thyreoiditis frühzeitig zu erkennen und behandeln zu können. (172)

Ein PAS ist definiert als das Vorkommen von mindestens zwei autoimmun bedingten Endokrinopathien nebeneinander. Das PAS III ist innerhalb des Komplexes der PAS mit einer relativen Prävalenz von 40% am häufigsten und zeichnet sich durch das gemeinsame Vorkommen eines Diabetes Typ 1 und einer AITD aus. Dabei kann sowohl eine Hypothyreose im Sinne einer HT oder eine Hyperthyreose im Sinne eines Morbus Basedow vorliegen. (173)

2.6 TPO-Ak als diagnostischer Marker – Analytische Aspekte

Labortests zur quantitativen Bestimmung der Schilddrüsenmarker, u.a. TPO-Ak, sind ein fester Bestandteil der Diagnostik und Verlaufskontrolle bei Patienten mit Hypo- und Hyperthyreose. (16) Gerade TPO-Ak sind ein sehr wichtiger serologischer Marker für AITD, da sie bei der Mehrheit der Patienten mit Morbus Basedow und HT vorkommen. (15) Dabei ist es wichtig, Assays zu entwickeln, die zuverlässig diese Antikörper quantifizieren, und damit die Krankheiten mit einer akzeptablen Sensitivität und Spezifität diagnostizieren. (117) Seit über 60 Jahren schon werden Schilddrüsenantikörper mit sich stetig verbessernden Methoden gemessen.(17) Jedoch weisen diese Methoden auch heute noch hohe analytische Variabilität auf, was ihren diagnostischen Gebrauch erschwert. (15) (18) (22) Um die Assay-Qualität weiter zu verbessern, müssen diese standardisiert und harmonisiert werden. (19) Um generell in der Lage zu sein, ein Assay zu standardisieren, wird einheitliches Referenzmaterial benötigt. Aufgrund physiologischer Eigenschaften von Antikörpern wie ihrer strukturellen Komplexität und Polyklonalität gibt es diese Referenzmaterialien und eine entsprechende Assay-Standardisierung nicht. Aus diesem Grund kann

momentan eine Verringerung der Variabilität nur durch Harmonisierung der Assays untereinander erreicht werden. (19)

Dies zu erreichen ist aus ökonomischen, aber vor allem aus Gründen der Patientensicherheit sehr wichtig. (19)

Es werden vier Hauptgründe für die noch immer starke Variabilität der Assay-Ergebnisse angeführt: die analytischen Variablen der Assays selbst, die Nutzung von internationalen Referenz-Standards, die ausstehende Definition einer einheitlichen Cut-Off Konzentration sowie der Prozess der Autoantigen Aufreinigung. (15)

2.6.1 Harmonisierung der Assays

TPO-Ak Assays der 1. Generation wie Komplement-Fixierung, Immunodiffusion und passive Hämagglutination sowie der 2. Generation wie immunoradiometrische (IRMA), immunoenzymometrische (IEMA) und immunoluminometrische (ILMA) Assays wurden heute von zuverlässigeren Methoden abgelöst. (174) (175) Die heute in der Klinik zur Anwendung kommenden TPO-Ak Assays gehören hauptsächlich der 3. Generation an. (176) Diese sind im Vergleich zu den halb- automatisierten Assays der 2. Generation voll- automatisiert und reduzieren dadurch die Anfälligkeit für menschliche Fehler und harmonisieren die Tests insgesamt. (15) (176) Für die Unterscheidung zwischen Assays der 3. Und 4. Generation schlägt Tozillo et. al. 3 Assay-Merkmale vor. Zur 4. Generation gehören demnach automatisierte Assays, bei denen entweder das Detektionslimit (LoD) $<2.0\text{IU/ml}$ liegt, oder der Median-Wert der Referenzgruppe $<3.0\text{IU/ml}$ liegt oder der Cut-Off $<15\text{IU/ml}$ liegt. (19)

Im Zuge der Automatisierung des Assay-Ablaufs im Übergang von der zweiten zur dritten Generation fielen analytische Variablen weniger ins Gewicht und Referenz-Standards wurden öfter angewandt. Dadurch konnte die Variabilität der Testergebnisse von einem Variationskoeffizienten von durchschnittlich 75,5% (174) auf 49,8% zwar deutlich verbessert werden, dies zeugt aber immer noch von einer hohen analytischen Variabilität. (15) (17) (18) (21) (22) Dabei betrug die Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse, also die Übereinstimmung der klinischen Interpretation der Ergebnisse, zwischen den Methoden 95%. (15)

2.6.2 **Aktualität des internationalen Referenz-Standards MRC 66/387**

Der Referenz-Standard für die Herstellung von Anti-TPO-Ak, MRC 66/387, stammt aus den 1960er Jahren, als für die Bestimmung der TPO-Ak Methoden der 1. Generation angewandt wurden. Außerdem verweist MRC 66/387 nicht auf die Herstellung von anti-TPO-Ak sondern auf die der anti-Mikrosomalen-Ak. (174) Deren Herstellung kann durch andere vorhanden Antikörper wie Tg-Ak beeinflusst werden und gibt dann je nach verwendeter Antigenquelle unterschiedliche Immun-Affinitäten. (174) Dass diese Standardisierung nicht ausreichend ist, um eine Harmonisierung der Assays untereinander zu erreichen, ist an den sehr unterschiedlichen URL, LoD und Messergebnissen der einzelnen Assays erkennbar. (19) (20) (117) Schon 2002 hatte Tozillo et. al. sie aus diesen Gründen als veraltet bezeichnet. (174)

2.6.3 **Definition einer einheitlichen Cut-Off Konzentration**

Die Cut-Off Werte oder Upper reference limits (URL), welche den Wert beschreiben, ab dem eine Probe als TPO-Ak positiv eingestuft wird, werden vom Hersteller von Assay zu Assay sehr unterschiedlich angegeben.(15) Dieses URL zu definieren ist in Hinblick auf die Übertragbarkeit der Assayergebnisse untereinander und für die entsprechend korrekte Erkennung von Patienten mit AITD von äußerster Wichtigkeit. (19) Die Unklarheiten in der Festlegung der URL stammen hauptsächlich aus einer uneinheitlichen Selektion der Referenz-Population, welche initial zur Feststellung der Assay-Parameter herangezogen wird. (19) (177) Diese Referenzpopulation sollte aus 120 jungen Männern unter 30 Jahren, die keine SD-Erkrankungen in ihrer Vorgeschichte oder der Familienanamnese aufweisen, keine andere Autoimmunerkrankung haben und deren TSH-Spiegel zwischen 0,5-2,0 mIU/L liegt bestehen. (178)

Nicht alle Hersteller nutzen diese von der National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) in ihrer Guideline vorgegebenen Kriterien für die Selektion ihrer Referenzpopulation.(15) Dadurch besteht die Möglichkeit, dass Patienten mit subklinischer AITD und hohen TPO-Ak Titern in die Bestimmung des URL einbezogen werden und diesen Wert nach oben verfälschen. (18) (177)

Zusätzlich werden durch diese Populationsauswahl nur Männer für die Bestimmung des URL herangezogen, obwohl AITDs hauptsächlich Frauen betreffen. In diesem

Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass in vielen Assays, wenn man die Geschlechter getrennt betrachtet, sich die Upper Reference limits voneinander unterscheiden.(19) (177) Jensen et. al. haben in diesem Zusammenhang die NACB-Guidelines als unzureichend bezeichnet, außerdem würden damit zu hohe und zu variable URLs zustande kommen. (179) Die Aufnahme geschlechtsspezifischer URLs in die Guidelines der NACB könnte zur Harmonisierung der URL bei TPO-Ak beitragen. (19) (177) Allerdings konnte eine andere Studie zeigen, dass, obwohl die URL zwischen den Geschlechtern Unterschiede aufwies, diese nicht klinisch signifikant waren. (18)

Das URL zeigen nicht nur geschlechtsspezifische Unterschiede, sondern sind auch methodenabhängig. (19) (20) (177) (179) Dies ist hauptsächlich auf die unterschiedlichen LoD zurückzuführen, welche sich zwischen den Assays deutlich unterscheiden. (2.6.4) Ist die analytische Sensitivität geringer, z.B. 9,3 IU/ml, liegt auch das URL höher, wohingegen ein Assay mit einem LoD von 0,05 IU/ml ein sehr viel niedriger liegendes URL aufweist. (19) Während der Entwicklung von der 3ten zur 4ten TPO-Ak Assay Generation hat sich das URL um den Faktor 4-5 erniedrigt: von 20IU/ml-100IU/ml um die Jahrtausendwende zu 1,6IU/ml-24,6IU/ml, ohne dass dafür genaue Gründe bekannt wären. (18) (177)

Außerdem weicht das URL, das in den jeweiligen Method sheets angegeben wird, deutlich von dem in klinischen Studien erhaltenen URL ab. Dabei liegt das experimentelle URL meist unter dem vom Hersteller angegebenen. Diese Unterschiede könnten in einer uneinheitlichen Selektion der Referenzpopulation sowie den geographischen Gegebenheiten des Studienortes zu finden sein. (18) (19) (177)

Es kann davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche Referenzwerte der TPO-Ak zu Verwirrung führen und so die Patientensicherheit verringern. Aus diesem Grund könnte es sinnvoll sein, die benutzte Methode sowie die LoD des genutzten Assays zur Bestimmung der TPO-Ak im Laborbericht zu vermerken. (19)

2.6.4 Autoantigen-Aufreinigung

Die großen Unterschiede der LoD von 0,05IU/ml bis zu 9,3IU/ml zeigen die trotz Referenz-Standard und automatisiertem Assay-Ablauf schlechte Harmonisierung der Assays untereinander an. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen liegt in den

unterschiedlichen TPO-Antigen Aufreinigungsverfahren für verschiedene Assays. Dabei wird das TPO-Antigen entweder nativ aufgereinigt oder rekombinant hergestellt. (19) Dies führt zu unterschiedlichen Konfigurationen der so gewonnenen TPO, was die Exposition der IDRs, welche von polyklonalen TPO-Ak des Patienten erkannt werden, beeinflusst. Dies könnte zu unterschiedlichen Messergebnissen der TPO-Ak Konzentrationen bei verschiedenen Methoden führen. (15) (19) (180) Die auf dem Markt erhältlichen TPO-Ak Assays enthalten meist aufgereinigte TPO. Deren genaues Aufreinigungsverfahren ist jedoch ein Firmengeheimnis. (15)

Viele Studien sehen den Hauptgrund der noch immer großen Variabilität der Assay-Ergebnisse in einem nicht standardisierten Antigen-Aufreinigungsverfahren und laden deswegen die biochemische Industrie ein, Anstrengungen in diese Richtung zu unternehmen. (18) (19) (177)

2.6.5 Weitere Faktoren, die zur Harmonisierung der TPO-Ak Assay beitragen

Um weiteren Einfluss auf die Harmonisierung der Assays zu erlangen, sollten innerhalb der präanalytischen Phase mehrere Punkte beachtet werden. Zum einen sollten Tests nur bei entsprechender Indikation angeordnet, sowie eine einheitliche Benennung der Labortests vorgenommen werden. (19)

Innerhalb der analytischen Phase kann die Qualität der TPO-Ak Assays durch eine weitere Harmonisierung der Messungen und das Teilen von Test-Profilen und Diagnosealgorithmen verbessert werden. (19)

Postanalytisch sind neben den oben aufgeführten Punkten wie einheitlichen LoDs und URLs eine einheitliche Maßeinheit (IU/ml) für eine weitere Qualitätsverbesserung der TPO-Ak Assays wichtig. (19)

Weitere Faktoren, die bei der Beurteilung der Testergebnisse berücksichtigt werden sollten, schließen Assay-Interferenzen, Schwangerschaft, Medikation und das Alter des Patienten ein. (16)

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei dieser Studie handelt es sich um eine retrospektive Datenanalyse. Die für diese Studie gewonnenen Daten wurden vom molekularen Schilddrüsenlabor der 1. Med. Klinik der Universitätsmedizin Mainz in Zusammenarbeit mit einem auswärtigen Labor sowie dem Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz im April 2020 erhoben.

Die in diese Studie eingeflossenen Daten stammen von 250 Patienten, bei denen alle drei Labore die TPO-Ak bestimmt haben. Diese wurden mit Cobas e411 der Firma Roche, welches vom molekularen Schilddrüsenlabor der Unimedizin Mainz genutzt wird, mit IDS-iSYS der Firma IDS, welches das auswärtige Labor betreibt und mit Immulite 2000 von Siemens Healthineers des Zentrallabors der Universitätsklinik Mainz gemessen.

Dabei liegt der Schwerpunkt auf dem quantitativen und qualitativen Vergleich zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS. Die Messergebnisse von Immulite 2000 sind Hauptteil der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann, werden hier aber der Vollständigkeit halber als Nebenfragestellung analysiert. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf den qualitativen Ergebnissen von Immulite 2000 und deren Vergleich mit den anderen Methoden.

Die dafür genutzten Seren stammen aus Überschussmaterial, das in der Blutbank des molekularen Schilddrüsenlabors gelagert wurde.

3.1.1 Zusammenstellung des Patientenkollektivs

Es wurden zunächst 723 Seren mit Cobas e411 auf TPO-Ak untersucht, davon 408 aus einem Kollektiv mit Patienten, die an M. Basedow erkrankt sind, sowie 134 aus einem Kollektiv an Hashimoto-Thyreoiditis erkrankter Patienten. Ebenso wurden bei 181 Patienten aus einem schilddrüsengesunden Kollektiv die TPO-Ak bestimmt. Da neben der quantitativen Übereinstimmung zwischen den Assays auch deren qualitative Übereinstimmung beurteilt werden wollte, wurde die Kontrollgruppe als „Negativkontrolle“ in die Untersuchung aufgenommen.

Von all diesen Patienten wurden randomisiert 100 TPO-Ak positive aus jeweils der Basedow und Hashimoto Gruppe ausgewählt (n=200) sowie 50 TPO-Ak negative aus der Gruppe der Schilddrüsengesunden(n=50).

Bei diesen randomisiert ausgewählten Seren wurden anschließend von den zwei weiteren Laboren mit den jeweiligen Methoden ebenfalls die TPO-Ak bestimmt.

3.2 Material

3.2.1 Arbeitsmaterial

Die Ergebnisse der Messungen wurden vom molekularen Schilddrüsenlabor der Unimedizin Mainz in einer Excel-Tabelle zusammengefasst.

Neben den Ergebnissen der TPO-Ak Messung wurden außerdem folgende Patientendaten mit in die Tabelle aufgenommen: Patientennummer, Alter, Geschlecht, Zeitpunkt der Blutentnahme sowie das Jahr der Diagnosestellung.

A	B	C	D	E	F	G	H
Patientennummer	Abnahmedatum	Alter	Sex	Jahr d. Diagnosestellung	TPO-Ak Cobas e411 IU/ml	TPO-Ak IDS- iSYS IU/ml	TPO-Ak Immulite 2000 IU/ml

Abbildung 2. Kopfzeile der Arbeitstabelle.

Anhand dieser Tabelle wurden die Daten ausgewertet.

3.2.2 Populationsbeschreibung

Die verwendeten statistischen Methoden zur Beschreibung des Patientenkollektivs sind unter 3.4 aufgeführt.

Die Stichprobe der Erkrankten bestand aus n=32 männlichen und n=168 weiblichen Probanden (n=200). Das Geschlechtsverhältnis beträgt 16%:84%, was in etwa der Geschlechterverteilung bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen in der Gesamtpopulation entspricht. (141)

		Krankheitsbild				
		Basedow	Hashimoto	Kontrolle	Gesamt	
Geschlecht	Männlich	Anzahl	15	17	9	41
		% von Krankheitsbild	15,0%	17,0%	18,0%	16,4%
	Weiblich	Anzahl	85	83	41	209
		% von Krankheitsbild	85,0%	83,0%	82,0%	83,6%
Gesamt		Anzahl	100	100	50	250
		% von Krankheitsbild	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 2: Geschlechterverteilung.

Wie Abbildung 3 zeigt, beträgt das Durchschnittsalter der Gesamtstichprobe 45 Jahre und 8 Monate, wobei Seren von Patienten untersucht wurden, die zwischen 10 und 83 Jahren alt waren.

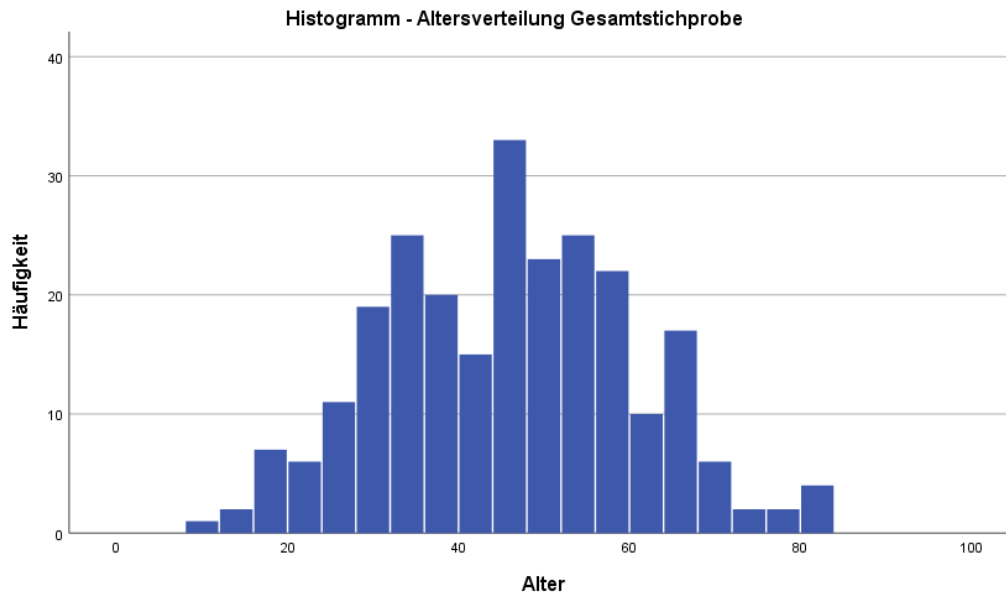


Abbildung 3: Histogramm der Altersverteilung der Gesamtstichprobe.

Die durchschnittliche Krankheitsdauer, gerundet auf Jahre, im Kollektiv der Erkrankten betrug zum Zeitpunkt der Blutentnahme 4,81 Jahre (Median: 2 Jahre). N=197. 3 fehlend.

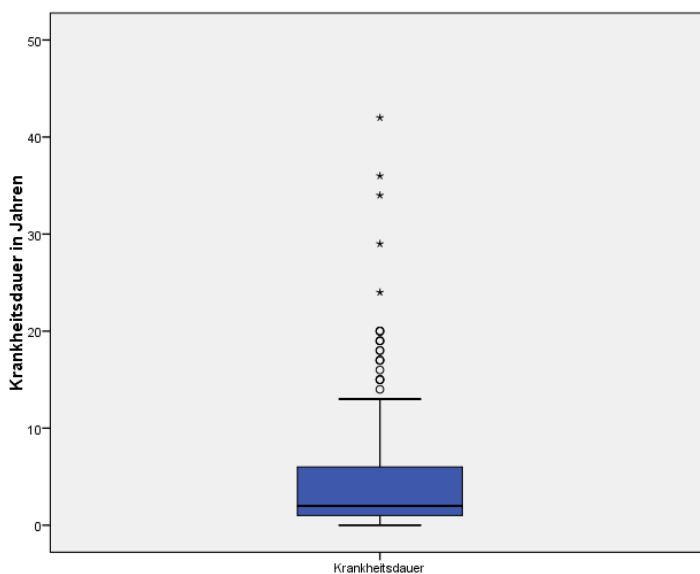


Abbildung 4: Boxplot zur Darstellung der Krankheitsdauer in Jahren.

Patienten mit Morbus Basedow waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme schon durchschnittlich 4,3 Jahre (Median: 2 Jahre) erkrankt, während Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis eine durchschnittliche Krankheitsdauer von 5,3 Jahre (Median: 2 Jahre) aufwiesen.

Bei den Männern bestand die Diagnose zum Zeitpunkt der Messung seit durchschnittlich 2,93 Jahren (Median: 1 Jahr), wohingegen die Frauen ihre Diagnose durchschnittlich 5,14 Jahre (Median: 2 Jahre) vor der Probenentnahme gestellt bekommen haben.

Das Durchschnittsalter der Proben innerhalb der Gesamtpopulation betrug zum Zeitpunkt der Messung 13 Jahre. Die ältesten Proben stammen aus dem Jahr 2002, wobei die jüngsten Proben 2010 abgenommen wurden.

Betrachtet man die Kollektive in Bezug auf das Probenalter getrennt, ergibt sich folgendes Boxplot:

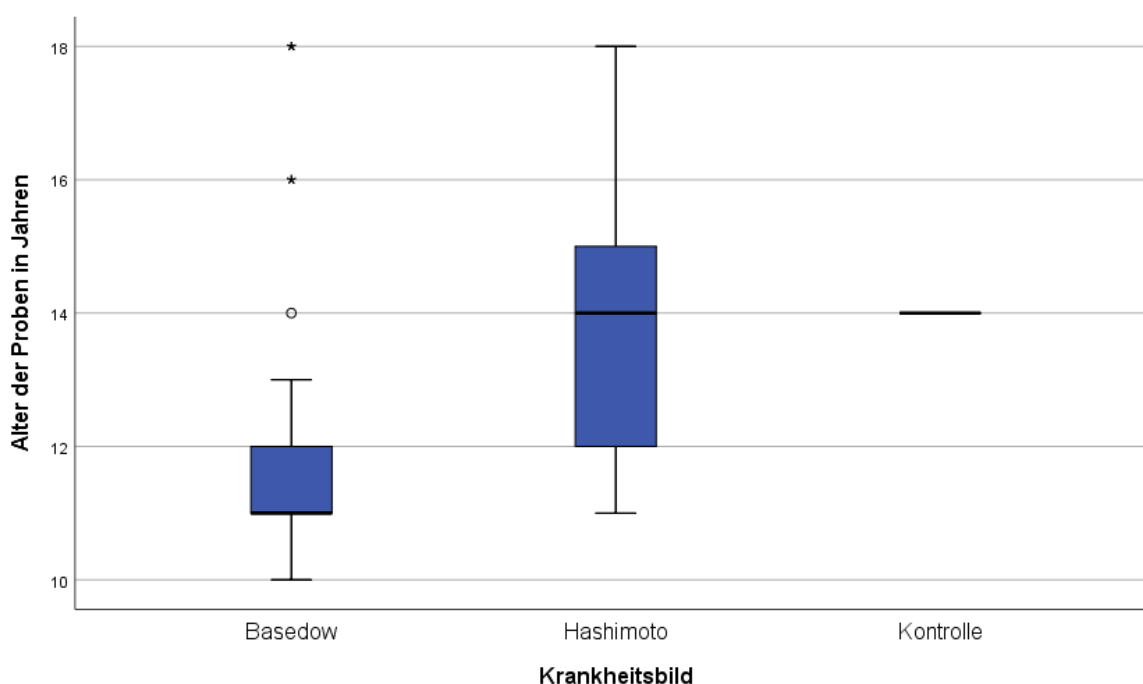


Abbildung 5: Boxplots zum Alter der Proben innerhalb der Kollektive.

Das mediane Alter der Proben des Basedowkollektivs (11 Jahre) unterscheidet sich deutlich von dem des Hashimoto- sowie des Kontrollkollektivs (14 Jahre/14 Jahre). Alle Proben des Kontrollkollektivs wurden 2006 im Rahmen einer Untersuchung des molekularen Schilddrüsenlabors der Universitätsklinik Mainz abgenommen.

3.3 Messmethoden

Im Folgenden werden die verwendeten Analyseverfahren vorgestellt und deren Funktionsweise besprochen.

3.3.1 Cobas e411

Bei dem Anti-TPO Assay von Roche, welches von Cobas e411 durchgeführt wird, handelt es sich um ein automatisiertes Elektrochemilumineszenz Immunoassay „ECLIA“. Dabei werden die TPO-AK quantitativ in einem Range von 5.0IU/ml – 600IU/ml bestimmt.(181) Um Werte bis 1000IU/ml angeben zu können, wurde mit Verdünnungsreihen gearbeitet. (181) Werte, die unterhalb der Nachweisgrenze liegen, werden laborintern als <10IU/ml angegeben, Werte, die darüber liegen als >1000IU/ml.

Der Cut-off, über dem die TPO-Ak Werte als erhöht gelten, wird von Roche für Cobas e 411 mit <35IU/ml angegeben. (181) (182)

Das limit of detection wird vom Hersteller mit 5,0IU/ml angegeben.

Das Assay wurde gegen NIBSC 66/387 standardisiert. Die Präzision wurde von Roche Diagnostics GmbH mit einem Variationskoeffizient zwischen 5,6% und 8,9% bei Kontrollen nach Protokoll und zwischen 7.1% und 24,4% in gepooltem Humanserum angegeben. (181)



Abbildung 6: Cobas e411 von Roche Diagnostics. (183)

3.3.1.1 Assay-Ablauf

Das Anti- TPO Assay von Roche nutzt ein kompetitives Verfahren und polyklonale anti-TPO-Ak des Schafes, um die TPO-Konzentration der Probe zu quantifizieren. Die Dauer der Messung beträgt 18 Minuten.

Dabei werden der Probe zunächst polyklonale anti-TPO-Ak vom Schaf hinzugegeben, welche mit einem Ruthenium Komplex gebunden sind. Im zweiten Inkubationsschritt werden biotinylierte TPO und streptavidin-beschichtete Mikropartikel hinzugefügt.

Die TPO-Ak der Probe konkurrieren mit den polyklonalen anti-TPO-Ak, welche mit Ruthenium Komplex markiert sind, um das biotinylierte TPO-Antigen.

Der so entstandene Komplex aus biotinylierter TPO und TPO-Ak wird über die Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin in der festen Phase gebunden.

Das Gemisch wird in die Reaktionszelle aspiriert, in der die Komplexe über die Mikropartikel magnetisch an die Elektrode gebunden werden. Nach Auswaschen der flüssigen Phase wird durch die Anlage von Spannung eine Chemilumineszenz induziert, welche von einem Photomultiplier gemessen wird.

Die Ergebnisse werden anhand einer gerätespezifischen Kalibrationskurve ermittelt und vom Gerät für jede Probe in IU/ml angegeben. (182) (181)

3.3.1.2 Assay Interferenzen

Werden +/- 10% des Ausgangswertes an gemessenen TPO-Ak erreicht, wird keine Wechselwirkung mit der jeweiligen Substanz angenommen.

Keine Wechselwirkungen werden angegeben für: Bilirubin <66mg/dl, Hb<1,5g/dl, Triglyceride <2100mg/dl, Biotin <10ng/dl und Rheumafaktoren <1500IU/ml.

Allerdings sollte Blut von Patienten, welche hohe Biotindosen einnehmen (z.B. 5mg/d) frühestens 8 Stunden nach der letzten Biotineinnahme abgenommen werden.

Extrem hohe Titer von Antikörper gegen Analyt-spezifische Antikörper wie Streptavidin und Ruthenium können ebenfalls zu Interferenzen führen. (181)

3.3.2 IDS – iSYS

Bei dem Anti-TPO Assay von IDS, welches von IDS-iSYS durchgeführt wird, handelt es sich um ein automatisiertes Chemilumineszenz Immunoassay „CLIA“. Dabei werden TPO-Ak quantitativ in einem Range von 0IU/ml – 1300IU/ml bestimmt. (184)

Der von IDS für das Anti-TPO Assay angegebene Cut-off-Wert beträgt <15IU/ml. Wobei Werte von 15-25IU/ml als unsicher eingestuft werden, und Werte >25IU/ml als positiv. (185)

Die Leerwertgrenze, welche den höchsten Wert, der bei einer negativ-Messung erwartbar ist, beschreibt, wird mit 1,1IU/ml angegeben.

Das limit of detection wird von IDS für deren Anti-TPO Assay mit 3,0IU/ml angegeben.

Die Präzision wird vom Hersteller mit einem Variationskoeffizienten zwischen 1,8% und 4,2% angegeben.

Die absolute Übereinstimmung hinsichtlich der qualitativen Assay-Ergebnisse eines handelsüblichen TPO-Ak Assays und dem hier vorgestellten Assay, wird von IDS mit 96,1% 95%KI [92,8-98,0] angegeben (185)



Abbildung 7: IDS-iSYS. (186)

3.3.2.1 Assay-Ablauf

Das Anti-TPO Assay von IDS nutzt zur quantitativen Bestimmung der TPO-Ak ein nicht kompetitives Verfahren.

Hierzu werden zunächst 6 µl der Patientenprobe (Serum/Plasma) mit magnetischen Partikeln inkubiert, welche mit rekombinantem TPO-Antigen beschichtet sind. Im Anschluss erfolgt die Auswaschung aller nicht gebundenen magnetischen Partikel.

Im Zuge der zweiten Inkubation wird ein spezifisches, mit Acridin beschichtetes Anti-IgG hinzugefügt. Die noch vorhandenen Magnetpartikel, welche zu diesem Zeitpunkt an die TPO-Ak der Probe sowie an die spezifischen Anti-TPO-Ak gebunden sind, werden magnetisch eingefangen, woraufhin ungebundene Analyte ausgewaschen werden.

Im letzten Schritt werden Trigger-Reagenzien hinzugefügt, woraufhin von der Acridin-Markierung Licht abgegeben wird. Dieses Licht ist proportional zur Anti-TPO-IgG Konzentration der ursprünglichen Patientenprobe. (185)

3.3.2.2 Assay Interferenzen

Keine Interferenzen werden angegeben für: Bilirubin <20mg/dl, Hämoglobin <1000mg/dl, Triglyceride <3000mg/dl. Dabei wird die Nutzung von hämolytischen, lipämischen und trüben Proben nicht empfohlen.

Auch bei sehr hohen, im Serum des Patienten eventuell vorkommenden, Antikörperkonzentrationen konnte keine Kreuzreaktion mit dem verwendeten Antigen beobachtet werden.

Heterophile Antikörper, welche eventuell im Serum von Patienten, die regelmäßig mit Tieren in Kontakt sind, vorkommen, können in vitro Assays stören, wodurch auch bei diesem Assay unter bestimmten Voraussetzungen anormale Werte zu beobachten sein können.

Auch bei sehr hohen TPO-Ak-Konzentrationen von bis zu über 8000IU/ml wurde kein Hook-Effekt beobachtet. (185)

3.3.3 Immulite 2000

Dieses Analyseverfahren sowie seine Messergebnisse gehören zur Dissertation von L. Schenk- Schlautmann und werden hier der Vollständigkeit halber ebenfalls aufgeführt.

Das Anti-TPO Assay für Immulite 2000 von Siemens Healthineers verwendet ein sequenzielles Festphasen- Chemilumineszenz- immunometrisches Assay zur quantitativen Bestimmung der TPO-AK. Dabei werden TPO-Ak in einem Range von 5,0 IU/ml – 1000IU/ml bestimmt. Die Untergrenze von 10IU/ml in diesem Datensatz wurde laborintern festgelegt.

Der Cut-Off, oberhalb dessen TPO-Ak Konzentrationen als erhöht gelten, wurde von Siemens Healthineers auf 35IU/ml festgelegt.

Der im method sheet enthaltene Methodenvergleich vergleicht das Anti-TPO-AK Assay von Immulite 2000 mit dem von Immulite. Aufgrund der in diesem Vergleich guten Korrelation von $r = 0,987$ wurden vom Hersteller für Immulite 2000 dieselben Referenzwerte angenommen wie für Immulite. Das Assay wurde mit der Internationalen Referenzpreparation MRC 66/387 standardisiert. (187)



Abbildung 8. Immulite 2000 - Siemens Healthcare Diagnostics Products. (188)

3.3.3.1 Assay – Ablauf

Der genaue Ablauf des Assays wird im Method-Sheet nicht beschrieben. Verwendete Bestandteile beinhalten Kugeln, welche mit aufgereinigter TPO beschichtet sind, sowie anti-TPO aus monoklonalen anti-humanen IgG der Maus. (187)

3.3.3.2 Assay – Interferenzen

Es werden keine Interferenzen für Bilirubin < 200mg/l, Hämoglobin von bis zu 381mg/dl sowie Triglyceride von bis zu 3000 mg/dl angegeben. Hohe Biotinkonzentrationen von 1500ng/ml können die Ergebnisse um bis zu 10% verändern. Höhere Konzentrationen können zu falschen Messergebnissen führen.

Außerdem können heterophile Antikörper des Patienten mit Immunglobulinen, welche im Assay enthalten sind interagieren und somit die Messergebnisse verfälschen.

Siemens Healthineers weist auf mögliche Unterschiede der Bindungscharakteristika der patienteneigenen sowie der zur Kalibrierung verwendeten TPO-Ak hin.

Auch bei sehr hohen TPO-AK Konzentrationen von bis zu 16624 IU/ml wurde kein Hook-Effekt beobachtet. (187)

3.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung wurde hauptsächlich mit SPSS 27 durchgeführt, die ROC-Analyse erfolgte mittels R. Die Methoden und Ergebnisse wurden mit dem Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universität Mainz besprochen.

Sofern bei einem statistischen Verfahren ein p-Wert ermittelt wird, gilt er ab einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ als signifikant. Alle p-Werte sind zweiseitig.

3.4.1 Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Messwerte

Zur Visualisierung der Verteilung der Daten eignet sich hier das Histogramm. Es ist ein Balkendiagramm, dessen Balken aus sich nicht überlappenden Bereichen zusammensetzen und deren Höhe sich aus der Anzahl der Messergebnisse innerhalb des Bereichs jedes einzelnen Balkens definiert. (189)

Das Boxplot ermöglicht ebenfalls eine Beurteilung der Datenverteilung sowie zusätzlich die Entdeckung auffälliger Werte im Datensatz. Hierzu wird eine Box erstellt, die Werte zwischen der 25. – 75. Perzentile einschließt. Vertikal von dieser Box abgehend befinden sich die sogenannten „Whiskers“, welche jeweils bis zum kleinsten sowie größten Wert reichen, der nicht weiter als den 1,5-fache Interquartilsabstand entfernt liegt. Alle Werte, die außerhalb der Whiskers liegen, gelten als auffällig und werden als Ausreißer bezeichnet. Sofern sie nicht weiter als drei Interquartilsabstände entfernt liegen, werden sie als Kreis dargestellt, ansonsten als *.

3.4.2 Lage-, Streu- und Formmaße

Als Lagemaße wurden hier der Mittelwert und der Median, als Streumaße die Varianz und die Standardabweichung und als Formmaße die Schiefe und Wölbung (auch: Kurtosis) berechnet. Letztere zeigen die Asymmetrie und Tendenz zur Erzeugung extremer Werte einer Verteilung an. (189) (190) Aus diesem Grund wurden sie hier zur Beurteilung der Normalverteilung der Daten herangezogen. Weichen eine oder beide Maßzahlen deutlich von 0 ab, kann davon ausgegangen werden, dass die Daten nicht normalverteilt sind. (190)

3.4.3 Test auf Normalverteilung

Bevor man einen statistischen Test auf Normalverteilung durchführt, kann über die Betrachtung, zum Beispiel eines Histogramms der Häufigkeitsverteilung sowie der Formmaße, ein erster Eindruck über die (Normal-)Verteilung der Daten gewonnen werden. (190)

Zu den hier angewandten, statistischen Tests auf Normalverteilung gehören der Shapiro- Wilk Test sowie der Kolmogorov- Smirnov Test. Beide Verfahren beurteilen die Nullhypothese, wonach die betrachtete Stichprobe normalverteilt ist. Fällt der Test also signifikant aus, muss die Nullhypothese zu Gunsten der Alternativhypothese verworfen werden. Diese besagt, dass die betrachteten Daten nicht normalverteilt sind. (189) (190)

Da nicht das erkrankte Kollektiv auf die Höhe, Verteilung und Variabilität ihrer Antikörper untersucht werden soll, sondern die Übereinstimmung der TPO-Ak Messwerte der Assays - in qualitativer sowie in quantitativer Hinsicht- der Gesamtstichprobe Gegenstand der Untersuchung sind, bringt die Testung der Normalverteilung der einzelnen Kollektive keinen zusätzlichen Vorteil und wird nicht vorgenommen.

3.4.4 Verteilung der Differenzen der Messergebnisse

Es bietet sich hier an, die Verteilung der Differenzen der Ergebnisse beider Analyseverfahren zu betrachten, um zu erfahren, ob ein Verfahren öfters als das andere hohe beziehungsweise niedrige Werte gemessen hat und mit welcher Häufigkeit diese Schwankungen auftreten.

Somit kann schnell ein Eindruck über etwaige systematische Unterschiede zwischen den Analyseverfahren gewonnen werden.

3.4.5 Vorzeichentest bei verbundenen Stichproben

Ein t-Test zum Vergleich der Mittelwerte kann nur berechnet werden, wenn die Voraussetzung der Normalverteilung erfüllt ist. (191) (192)

Der Wilcoxon- Vorzeichen- Rang- Test kann nur durchgeführt werden, wenn die Differenzen der Messergebnisse symmetrisch verteilt sind. Ist dies nicht der Fall, wird der Vorzeichentest, durchgeführt. Dieser prüft, ob der Median der Differenzen =0 ist. (190)

3.4.6 Einfache lineare Regression

Die einfache lineare Regression beschreib den linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen mathematisch. Durch die im Modell generierte Regressionsgerade lässt sich, sobald man das Messergebnis eines Geräts kennt, das Ergebnis des anderen vorhersagen.

Die Verlässlichkeit dieser Vorhersage wird durch das Bestimmtheitsmaß R^2 gegeben.

Es besagt, wie viel Prozent der Varianz einer Messung durch die Messung des anderen Geräts erklärt werden kann. (189)

3.4.7 „Linie der Gleichheit“ in einem Streudiagramm

Die Winkelhalbierende, die von Bland und Altman auch als die „Linie der Gleichheit“ bezeichnet wurde, ermöglicht den visuellen Vergleich einer theoretischen, absoluten Gleichheit von zwei Messverfahren mit den tatsächlichen Messergebnissen beider Verfahren innerhalb eines Streudiagramms.

Wären die Messverfahren identisch, würden im Streudiagramm alle Punkte auf dieser Geraden liegen. (193)

$$y = 1 * x + 0$$

Formel 1: Gleichung für die Winkelhalbierende in einem Streudiagramm. (194)

Um einen graphischen Eindruck der relativen Messunterschiede zu erlangen, können die Daten in logarithmierter Form in einem Streudiagramm dargestellt werden. So lassen sich der niedrige und hohe Assay-Bereich in ihren relativen Messunterschieden besser beurteilen.

Um die Ergebnisse von IDS-iSYS logarithmieren zu können, wurden Werte =0IU/ml zu =1IU/ml umcodiert und anschließend logarithmiert.

3.4.8 Zusammenhangsanalyse

Der Pearson-Korrelationskoeffizient gibt einen Wert für den linearen Zusammenhang zweier Variablen an. (189) Als parametrisches Testverfahren stellt er einige Anforderungen an die Daten, um das Ergebnis sicher interpretieren zu können. Dazu gehören unter anderem eine bivariate Normalverteilung sowie das Nichtvorhandensein von Ausreißern und ein linearer Zusammenhang der Variablen. (195)

Sind die Voraussetzungen für eine sichere Interpretation des Pearson-Korrelationskoeffizienten nicht gegeben, empfiehlt es sich den nicht parametrischen Korrelationskoeffizienten nach Spearman zu berechnen. (195) (196) Dieser beschreibt das Maß des monotonen Zusammenhangs. (189)

Die Korrelationsanalyse wird in diesem Fall dafür genutzt, zu prüfen, ob die Ergebnisse beider Geräte miteinander in einem Zusammenhang stehen.

3.4.9 Variationskoeffizient

Der Variationskoeffizient (CV) ist der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert. Durch seine Eigenschaften als Quotient zweier Werte mit derselben Maßeinheit ist er dimensionslos und gibt die Streuung der Daten um den Mittelwert anhand eines Faktors an. (189) (190)

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

Formel 2: Variationskoeffizient. (189)

Er kann sowohl zur Bestimmung der Präzision einer Methode, also der Intra-Assay-Variabilität, als auch zur Einschätzung der Übereinstimmung zwischen verschiedenen Assays, also der Inter-Assay-Variabilität genutzt werden. (15) (20)

Sollte die Differenzen zwischen den Messungen eher proportional zu deren Mittelwerten sein, so kann folgende Formel verwendet werden.

$$CV = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n \frac{d_i^2}{m_i^2}} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n CV_i^2}, CV_i^2 = \frac{d_i^2}{2m_i^2}$$

Formel 3: Formel zur Errechnung des CV bei zum Mittelwert proportionalen Differenzen. (197)

Dazu wird aus jedem Wertepaar der Quotient aus Differenz und Mittelwert gebildet und daraus ein Quadratmittel abgeleitet. Aus den so gewonnenen individuellen und noch quadrierten CVs wird der Mittelwert errechnet und durch Wurzelziehung der CV gebildet. (197)

Dabei steht d_i für die individuellen Differenzen der Messwertepaare und m_i für die individuellen Mittelwerte. CV_i steht für die individuellen CVs der Messwertepaare.

Da sich für die TPO-Ak Messungen eine starke Abhängigkeit der Differenzen vom Mittelwert gab, wird diese Methode zur Bestimmung des CV verwendet.

Ein 95% Konfidenzintervall für den CV wird mit Hilfe des aus dem für den CV_i^2 ermittelten Standardfehlers durch Wurzelziehung ermittelt. (198)

$$95\% \text{ KI}(CV) = \sqrt{CV^2 \pm 1,96 \times SE(\{CV_i^2\})}$$

Formel 4: 95% KI für den CV. (198)

Obwohl der Konkordanz-Korrelationskoeffizient nach Lin besser geeignet sein soll, die Genauigkeit der Übereinstimmung zweier Variablen zu beschreiben, (199) wird der CV häufig in Publikationen zu TPO-Ak Assay-Vergleichen angegeben, (15) (20) (174) weswegen er auch in dieser Dissertation Anwendung findet.

Da keiner der zu vergleichenden Werte kleiner 0 war, hat der CV in diesem Falle eine klare Interpretation. (200)

3.4.10 Konkordanz- Korrelationskoeffizient nach Lin

Der Konkordanz- Korrelationskoeffizient (CCC) nach Lin gibt an, wie genau die Wertepaare auf der Geraden der Übereinstimmung liegen. Jede Abweichung von dieser Geraden wird Werte <1 produzieren, selbst wenn der Korrelationskoeffizient nach Pearson=1 ist. (201)

Einige Autoren berichten über eine Überlegenheit des CCC gegenüber dem CV bei der Bestimmung der Übereinstimmung zweier Methoden. (199) (202) Aus diesem Grund wurde der CCC auch in dieser Arbeit berechnet.

Allerdings veröffentlichten Atkinson et. al. 1997 einen Kommentar in welchem sie den Konkordanz- Korrelationskoeffizienten nach Lin als ebenso unsicherheitsbehaftet wie andere Korrelationsmethoden, welche zur Evaluierung der Übereinstimmung zweier Methoden herangezogen werden, beschrieben. (203) Auch Bland und Altman haben schon 1986 und 1995 Korrelationsmessungen zur Bestimmung der Übereinstimmung zweier Methoden deutlich kritisiert und ein alternatives Vorgehen vorgeschlagen. (193) (194)

Eine Schätzung des CCC berechnet sich nach Formel 5 mit der Kovarianz s_{xy} sowie den jeweiligen Mittelwerten (3.4.2) (\bar{x}_1 und \bar{x}_2) und Standardabweichungen (3.4.2) (s_1 und s_2) der Analyseverfahren. (201) (204)

$$P_c = \frac{2s_{xy}}{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2 + s_1^2 + s_2^2}$$

Formel 5: Schätzung des Konkordanz Korrelationskoeffizient nach Lin. (201) (204)

Anhand von Tabelle 3 lässt sich das Ergebnis interpretieren. (204)

Konkordanz-Korrelationskoeffizient	Übereinstimmung, heuristisch
<0,10	keine
0,10 - 0,40	schwache
0,41 - 0,60	deutliche
0,61 - 0,80	starke
0,81 - 1,00	fast vollständige

Tabelle 3: Interpretation des CCC.

McBride et. al. haben 2005 strengere Kriterien für die Beurteilung des Maßes an Übereinstimmung für die Konkordanz-Korrelationskoeffizienten nach Lin vorgeschlagen. (205)

Hierzu wird die untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls mit den Werten in der Tabelle verglichen und entsprechend Tabelle 4 interpretiert. (205)

Maß der Übereinstimmung	Konkordanz-Korrelationskoeffizient bei kontinuierlichen Variablen
fast vollständig	>0,99
stark	0,95 - 0,99
deutlich	0,90 - 0,95
schwach	<0,90

Tabelle 4: Alternative Interpretation des CCC nach McBride et. al.

Die 95% Konfidenzintervalle für den CCC wurden mit Hilfe der Fisher-Z Transformation bestimmt. (206) (207)

3.4.11 Bland Altman Plot

Der Bland Altman Plot ermöglicht eine graphische Analyse der Streuung der Differenzen einzelner Wertepaare und hat sich als Verfahren der Wahl zum Vergleich zweier Messmethoden etabliert. (208)

Aufgrund seiner Eigenschaften wurde der Bland Altman Plot auch in dieser Arbeit erstellt.

Dabei wird auf der x-Achse der Mittelwert der Wertepaare abgebildet und gegen die Differenz der Wertepaare auf der y-Achse aufgetragen.

Als Orientierungshilfen werden der Mittelwert der Differenzen und die Übereinstimmungsgrenzen (auch limits of agreement) (LoA) als Geraden in das Diagramm gelegt. (193) Diese entsprechen dem 95% Konfidenzintervall der mittleren Differenz.

Der Mittelwert der Differenzen, auch Bias genannt, gibt den systematischen Fehler der Geräte zueinander an, wohingegen die Breite der Übereinstimmungsgrenzen von der Größe des zufälligen Fehlers abhängt. (189)

Die Übereinstimmungsgrenzen wurden auf $Mittelwert \pm 1,96SD$ festgelegt.

Formel 6: Berechnung der Übereinstimmungsgrenzen. (193) (194)

Um die 95% Konfidenzintervalle für die mittlere Differenz \bar{x} sowie für die LoA zu erhalten wurde folgende Formel verwendet: (193)

$$x_{0/n} = \bar{x} \pm 1,96 \cdot \frac{s_x}{\sqrt{n}}$$

Formel 7: Berechnung der 95% KI der Übereinstimmungsgrenzen des Bland Altman Plots. (193)

Dabei ist \bar{x} der Mittelwert der Differenzen und $\frac{s_x}{\sqrt{n}}$ der Standardfehler des Mittelwerts. (193)

Um die Gültigkeit der Übereinstimmungsgrenzen über den gesamten Wertebereich zu gewährleisten, dürfen die Differenzen der Wertepaare keine systematische Abweichung aufweisen. (193)

Sollten die Differenzen der Wertepaare allerdings proportional zu den Mittelwerten sein, können die Daten zur genaueren Festlegung der Übereinstimmungsgrenzen logarithmiert werden. (193)

Da eine Logarithmierung nur möglich ist, wenn der Ausgangswert ungleich 0 ist, wurden alle Werte mit 0IU/ml auf 1IU/ml umcodiert. Somit wird das Logarithmieren möglich und die artifizielle Verfälschung bleibt minimal.

Zur besseren klinischen Interpretation müssen diese Werte rücktransformiert werden, woraus sich ein dimensionsloser Faktor ergibt. (193)

Diese Rücktransformation der logarithmischen Übereinstimmungsgrenzen und des Mittelwertes erfolgte mittels:

$$m = 2 \left(\frac{e^c - 1}{e^c + 1} \right)$$

Formel 8: Rücktransformation der Übereinstimmungsgrenzen und des Mittelwertes. Vgl. (200)

c steht stellvertretend für entweder den Mittelwert der Differenzen oder die obere/untere Übereinstimmungsgrenze der logarithmierten Daten und m für die sich aus der Berechnung ergebende Steigung der Gerade durch den Ursprung welche dem rücktransformierten Mittelwert der Differenzen oder der rücktransformierten oberen/unteren Übereinstimmungsgrenze zugehörig ist.

Diese rücktransformierten Werte (m) wurden nun auf ein konventionelles Bland-Altman Plot übertragen. (193)

Durch diese Auftragung der Übereinstimmungsgrenzen kann das Problem der systematischen Abweichung der Differenzen und die daraus resultierenden ungenauen Übereinstimmungsgrenzen umgangen werden. (194) (200)

In nächsten Schritt wurde die vom Hersteller anhand der Cut-Off Werte (3.3.1, 3.3.2) angegebene Abweichung der Geräte berücksichtigt. Dafür wurde ermittelt, dass IDS-iSYS laut Cut-Off $15/35=0,42$ (42%) der Höhe der Werte von Cobas e411 sowie von Immulite 2000 misst. Um diesen Faktor auszugleichen, wurden die Ergebnisse von Cobas e411 beziehungsweise Immulite 2000 mit 0,42 multipliziert. Bei zu den Mittelwerten proportionalen Differenzen erfolge eine Logarithmierung und Rücktransformation wie oben beschrieben. Die so erhaltenen Werte wurden in ein konventionelles Bland Altman Plot übertragen.

3.4.12 Sensitivität und Spezifität

Um die klinische Übereinstimmung der Assays zu beurteilen, wurden sowohl die Sensitivität wie auch die Spezifität berechnet.

Die Sensitivität beschreibt den Anteil der vom Test korrekterweise als erkrankt Erkannten von allen tatsächlich erkrankten Probanden. (209)

$$\text{Sensitivität} = \text{richtig Positive} / (\text{richtig Positive} + \text{falsch Negative})$$

Formel 9: Sensitivität. (209)

Die Spezifität beschreibt den Anteil der vom Test korrekterweise als erkrankungsfrei Erkannten von allen tatsächlich erkrankungsfreien Probanden. (209)

$$\text{Spezifität} = \text{richtig Negative} / (\text{richtig Negative} + \text{falsch Positiven})$$

Formel 10: Spezifität. (209)

Graphisch darstellen und errechnen lassen sie sich anhand einer 4 Felder Tafel.

Da die Einteilung in positiv und negativ hier auf den Messergebnissen von Cobas e411 beruht, beziehen sich die angegebenen Sensitivitäten und Spezifitäten auf den Vergleich zu Cobas e411.

Es kann somit die klinische Übereinstimmung der Messverfahren auf Basis einer Einteilung von Cobas e411 untersucht werden.

Da bei Cobas e411 und bei Immulite 2000, anders als bei IDS- iSYS vom Hersteller kein „unsicherer“ Bereich der Interpretation vorgesehen ist, (3.3.1, 3.3.2, 3.3.3) musste für den klinischen Vergleich ein Cut-Off für IDS-iSYS ohne diesen festgelegt werden. Aus diesem Grund wurde der untere, vom Hersteller angegebene Cut-Off von 15IU/ml für das Anti-TPO-Assay von IDS-iSYS verwendet.

Somit wird eine hohe Sensitivität gewährleistet, während die Spezifität theoretisch abnimmt.

3.4.13 Receiver Operating Characteristic- Analyse (ROC)

Um die Trennschärfe der Methoden in Bezug zum Vorhandensein einer mit TPO-Ak assoziierten AITD zu untersuchen, wurde eine nichtparametrische ROC-Analyse angefertigt. Je größer die Fläche unter einer Kurve, desto besser erkennt die entsprechende Methode erkrankte Probanden. Durch einen Vergleich der ROC-Kurven verschiedener Methoden kann also deren Trennschärfe zwischen TPO-Ak positiven und negativen Proben verglichen werden. (210)

4 Ergebnisse

Es werden zunächst die Ergebnisse des Vergleichs zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS vorgestellt. Im Verlauf folgen die Vergleiche der eben genannten Methoden mit Immulite 2000. (ab 4.12) Die Daten der TPO-Ak Messungen von Immulite 2000 stammen aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann und sind der Vollständigkeit wegen in dieser Dissertation ebenfalls ausgewertet. Die Dissertation von L. Schenk-Schlautmann befindet sich momentan in der Entstehung und kann aus diesem Grund nicht zitiert werden.

4.1 Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Messwerte

4.1.1 Histogramme

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung der Messwerte in einem Histogramm (3.4.1), fällt bei den Messungen mit Cobas e411 auf, dass 34 maximale Werte (1000IU/ml) gemessen wurden. Es wurde 38-mal der Wert der unteren Assaygrenze (10IU/ml) gemessen. Insgesamt 50-mal wurden Werte unterhalb des Cut- Offs von 35IU/ml gemessen. Da die Gruppeneinteilung auf Basis dieser Messwerte erfolgte, entfallen alle diese Werte konsequenterweise auf die Kontrollgruppe. Grün steht für Werte unterhalb des URL von 35IU/ml, blau für Werte darüber.

Die Häufigkeit der Messwerte zwischen den Maxima nahm mit steigender Höhe ab.

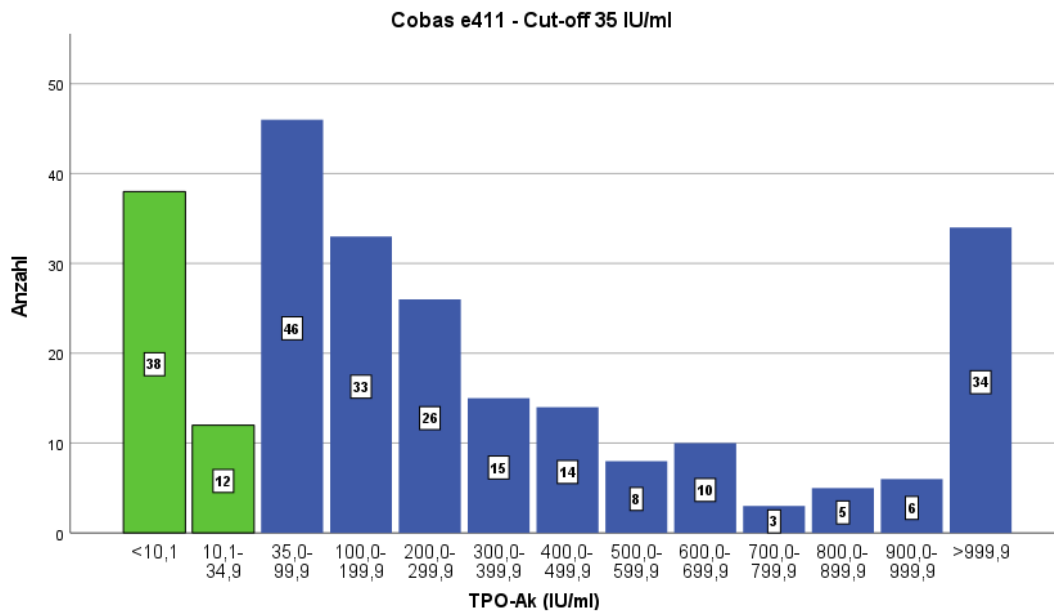


Abbildung 9: Balkendiagramm - Häufigkeitsverteilung der TPO-Ak Messwerte von Cobas e411 in IU/ml.

Die Verteilung der Messwerte von IDS-iSYS zeigte eine stark rechtsschiefe Verteilung mit sehr vielen Werten im niedrigen Assay-Bereich. Dabei wurden 66-mal Werte unterhalb des Cut-Offs von 15IU/ml gemessen. 50 dieser 65 Werte waren der schilddrüsengesunden Kontrollgruppe zuzuordnen. Nur ein Messwert von IDS-iSYS lag an der oberen Assay-Grenze von 1300IU/ml. Grün steht für Werte unterhalb des URL von 15IU/ml, blau für Werte darüber.

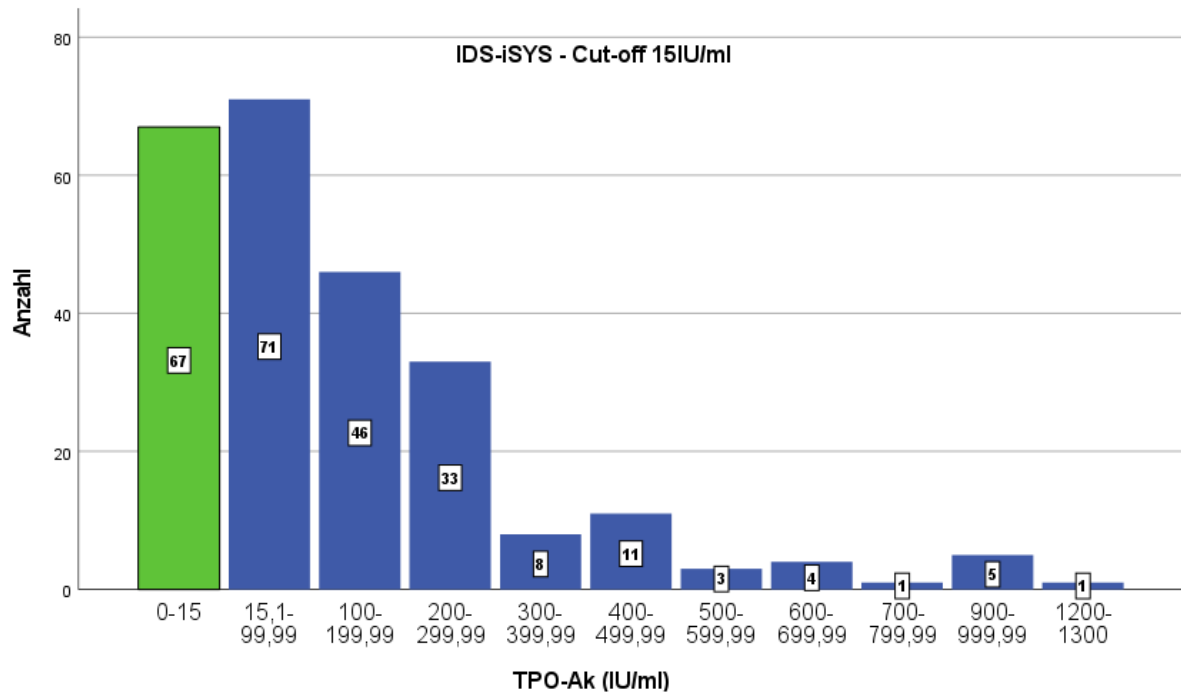


Abbildung 10: Balkendiagramm- Häufigkeitsverteilung der TPO-Ak Messwerte von IDS-iSYS in IU/ml.

Anhand der Histogramme zur Häufigkeitsverteilung der Messwerte beider Geräte ist schon erkennbar, dass keine Normalverteilung bestand.

4.1.2 Boxplots

In dem Boxplot (3.4.1) in Abbildung 11 ist zu erkennen, dass bei den Messungen von Cobas e411 keine Ausreißer detektiert wurden. Bei IDS-iSYS hingegen fanden sich 14 Ausreißer, von denen 6 als extreme Ausreißer klassifiziert wurden.

Außerdem war graphisch ein deutlicher Unterschied in der Lage der Mediane beider Methoden zu erkennen.

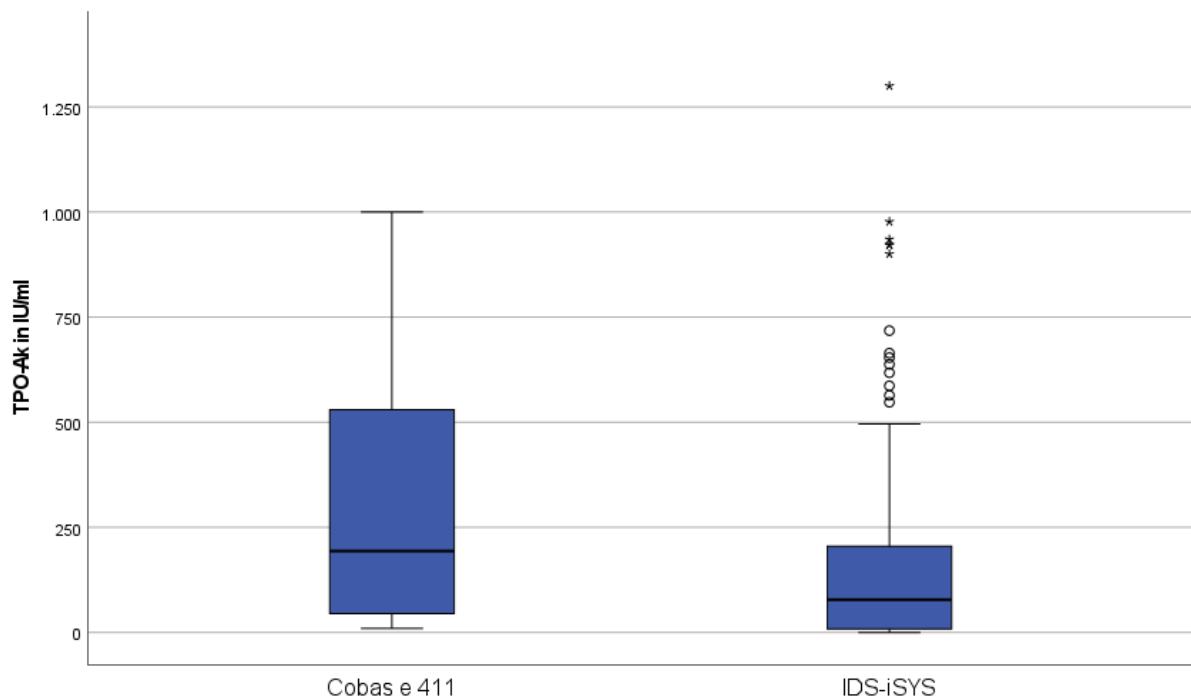


Abbildung 11: Boxplots der TPO-Ak Messwerte in IU/ml von Cobas e411 und IDS-iSYS.

Es wurde entschieden, die Ausreißer in der Stichprobe zu belassen und die weitere Analyse mit der gesamten Stichprobe auszuführen, da davon ausgegangen wurde, dass es sich um korrekt gemessene Werte handelt.

4.2 Lage-, Streu- und Formmaße

Betrachtet man nun die Messwerte der einzelnen Geräte, sieht man, dass beide Geräte den vollen Umfang des Assays nutzten.

Der Mittelwert war bei Cobas e411 mehr als doppelt so hoch wie bei IDS-iSYS. Ebenso war die Standardabweichung deutlich unterschiedlich.

Der Median lag bei Cobas e411 mit 194,0 IU/ml circa 2,5mal so hoch bei wie IDS-iSYS mit 78,15 IU/ml.

<i>Statistiken</i>		Cobas e 411	IDS-iSYS
N	Gültig	250	250
	Fehlend	0	0
Mittelwert		332,18	146,89
Standardfehler des Mittelwerts		22,28	12,78
Median		194,00	78,15
Std.-Abweichung		352,26	202,06
Schiefe		,94	2,46
Kurtosis		-,60	7,55
Minimum		10,00	,00
Maximum		1000,00	1300,00
Perzentile	25	44,95	8,43
	50	194,00	78,15
	75	530,00	205,43

Tabelle 5: Deskriptive Statistik der TPO-Ak Messwerte in IU/ml von Cobas e411 und IDS-iSYS.

4.3 Test auf Normalverteilung

Um das Nichtvorliegen einer Normalverteilung statistisch zu bestätigen, wurden die Tests auf Normalverteilung (3.4.3) nach Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk durchgeführt.

Diese zeigten für beide Geräte zu $p=0,0001$, dass die 0-Hypothese, nämlich dass die Messwerte normalverteilt sind, verworfen werden muss.

	<i>Tests auf Normalverteilung</i>					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Cobas e 411	,195	250	<,0001	,801	250	<,0001
IDS- iSYS	,234	250	<,0001	,718	250	<,0001

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 6: Tests auf Normalverteilung der TPO-Ak Messwerte von Cobas e411 und IDS-iSYS.

Weder eine Quadratwurzel- Transformation noch eine logarithmische oder inverse Transformation führte zu einer Normalverteilung, die mittels obiger Tests (3.4.3) bestätigt werden konnte.

Das Vorliegen einer Normalverteilung war allein aufgrund des Einschusses des Kontrollkollektivs nicht zu erwarten. Die Bestätigung dieser Vermutung spielt allerdings eine Rolle bei der im Verlauf folgenden Auswahl der statistischen Testverfahren.

4.4 Verteilung der Differenzen

Abbildung 12 stellt die Verteilung der Differenzen (IDS-iSYS - Cobas e411) dar (3.4.4). Diese lagen meist im niedrigen, aber dennoch negativen Wertebereich. Zusätzlich gab es auch sehr große Differenzen zwischen den Ergebnissen beider Geräte, welche durchweg im negativen Wertebereich lagen.

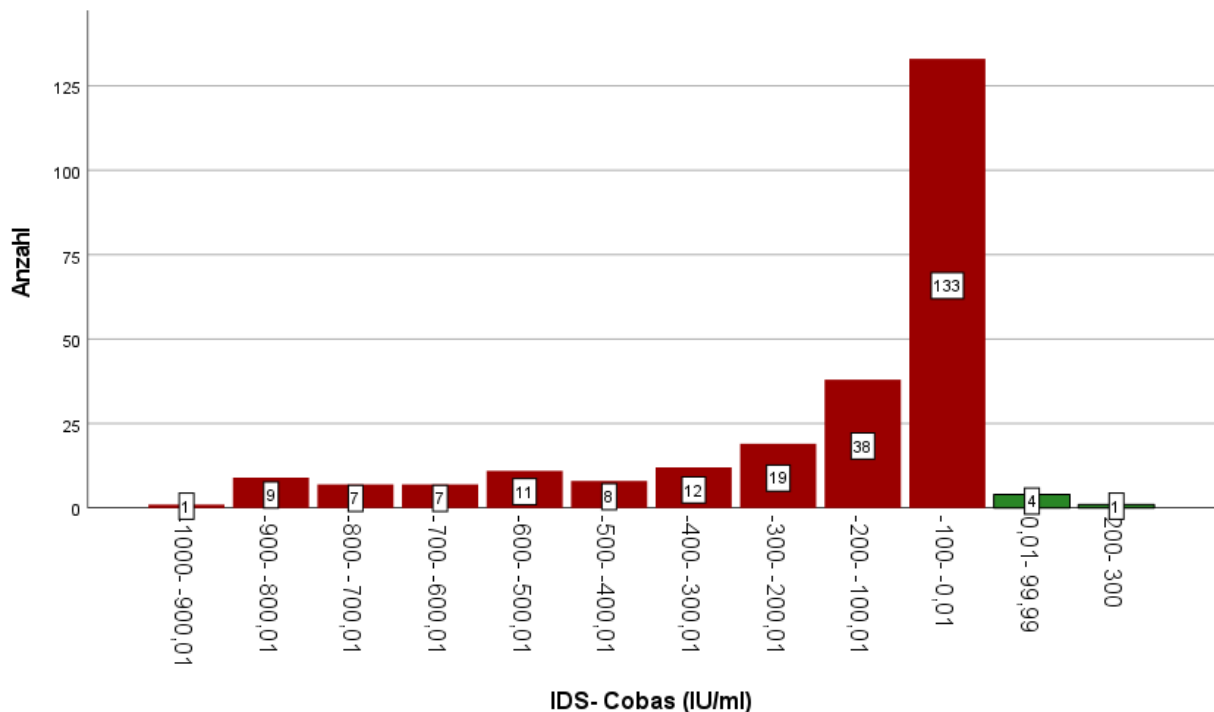


Abbildung 12: Verteilung der Differenzen (IDS-iSYS - Cobas e411) in IU/ml.

Bei 245/250 (98%) Messungen hatte Cobas e 411 höher gemessen als IDS-iSYS.

5/250 (2%) der Messungen hatte IDS-iSYS höher als Cobas e411 gemessen.

4.5 Vorzeichentest bei verbundenen Stichproben

Die vom Vorzeichentest bei verbundenen Stichproben (3.4.5) getestete 0-Hypothese besagt, dass der Median der Differenzen (4.1.2) zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS =0 sei. Sie musste bei $p < 0,0001$ abgelehnt werden.

4.6 Einfache lineare Regression mit Winkelhalbierender im Streudiagramm

Da beide Assays dazu designt wurden, die TPO-Ak zu messen, gingen wir hier von einem linearen Zusammenhang aus.

Abbildung 13 zeigt über ein Modell der einfachen linearen Regression (3.4.6) diesen linearen Zusammenhang der Messergebnisse beider Messgeräte, veranschaulicht durch die Regressionsgerade.

Das Bestimmtheitsmaß $R^2 = 56,9\%$ besagt, dass dieses Modell 56,9% der Varianz der Messwerte erklärt.

Dies bedeutet konkret, dass mit den Messergebnissen von IDS-iSYS ca. 57% der Messergebnisse von Cobas e411 erklärt werden können.

Dass fast alle Wertepaare unterhalb der Winkelhalbierenden (3.4.7) lagen, zeigt abermals, dass IDS-iSYS fast alle Proben niedriger gemessen hat als Cobas e411.

Im Streudiagramm erkennt man außerdem, dass bei steigendem Wertebereich die Größe der Differenzen zwischen den Ergebnissen von Cobas e411 und IDS-iSYS zunahm. Das ist an dem häufig großen Abstand der Wertepaare zur Winkelhalbierenden vor allem im oberen Assay-Bereich zu erkennen und führt zu dem Eindruck, dass die Messverfahren vor allem in diesem Bereich wenig übereinstimmende Messergebnisse lieferten.

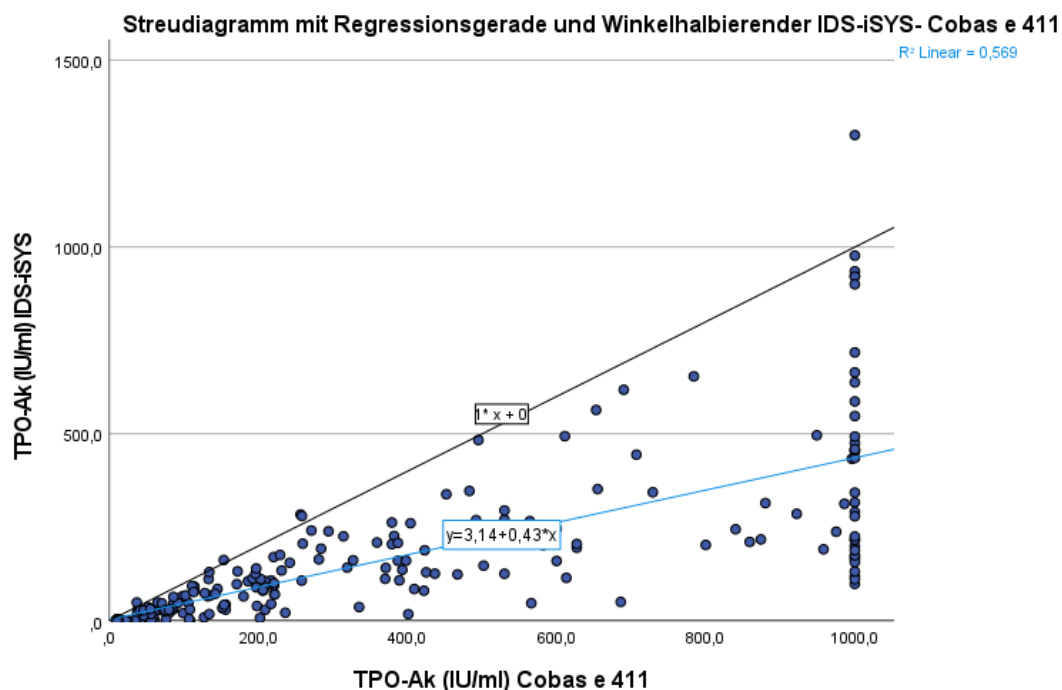


Abbildung 13: Streudiagramm IDS-iSYS auf Cobas e411 mit linearer Regressionsgerade und Winkelhalbierender.

Um die Unterschiede der Assays auf einer relativen Skala graphisch zu analysieren, wurde ein Streudiagramm mit logarithmierten Daten angefertigt. (3.4.6)

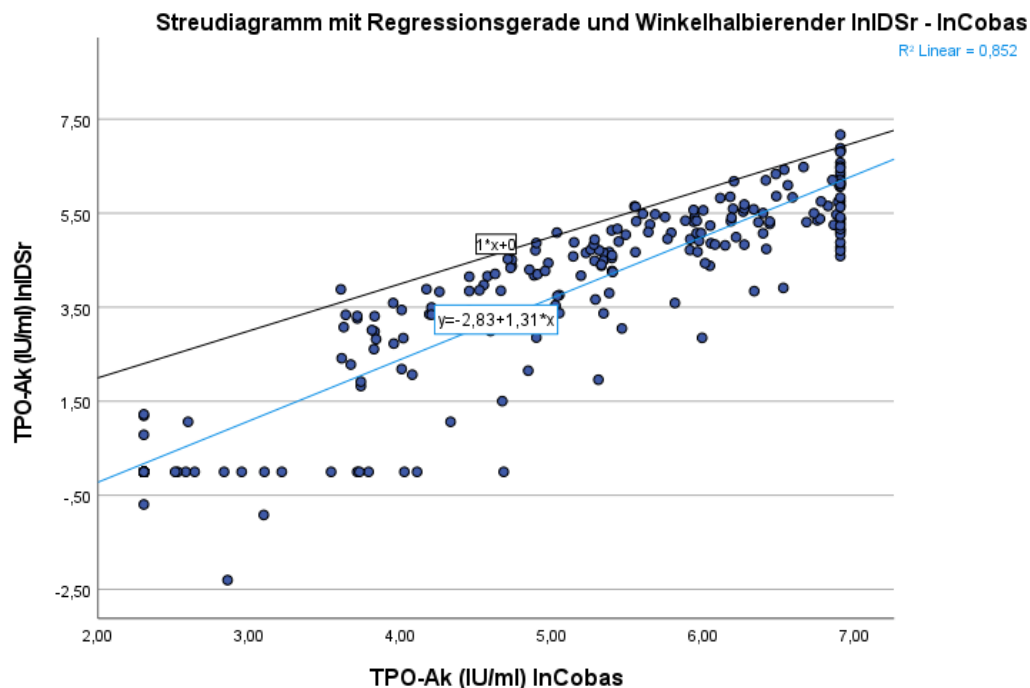


Abbildung 14: Streudiagramm In IDSr auf In Cobas e411 mit linearer Regressionsgerade und Winkelhalbierender.

Man erkennt in Abbildung 14, dass die relative Abweichung im niedrigen Assay-Bereich ähnlich hoch ist wie im hohen.

4.7 Zusammenhangsanalyse

Da die Voraussetzungen für eine sichere Interpretation des Pearson Korrelationskoeffizienten nicht gegeben waren, wurde dessen nicht parametrisches Äquivalent, die Spearman Korrelation, berechnet. (3.4.8)

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman bestätigte mit $r_s = 0,915 [0,892; 0,934]$ eine nach Cohen (211) stark positive Korrelation zwischen den Messergebnissen von Cobas e411 und IDS-iSYS.

4.8 Variationskoeffizient

Da in diesem Datensatz keine Präzisionsmessungen vorliegen, konnte der CV für die Intra-Methoden Variabilität nicht berechnet werden. (3.4.9)

Allerdings konnte die Inter-Methoden Variabilität (3.4.9) mittels des CV beschrieben werden. Ergänzend zu der in 3.4.9 beschriebenen Methode wird zusätzlich der Median der individuellen CVs angegeben.

Der mittlere Variationskoeffizient zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS betrug $CV=0,875$ 95%KI $[0,822;0,925]$ =87,5%.

Der Median der Variationskoeffizienten zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS betrug CV (median)= $0,7126= 71,26\%$.

Der Unterschied zwischen mittlerem und medianen CV ist vermutlich auf die von IDS-iSYS mit TPO-Ak=0IU/ml gemessenen Kontrollen zurückzuführen. Dies wird von Abbildung 15 verdeutlicht.

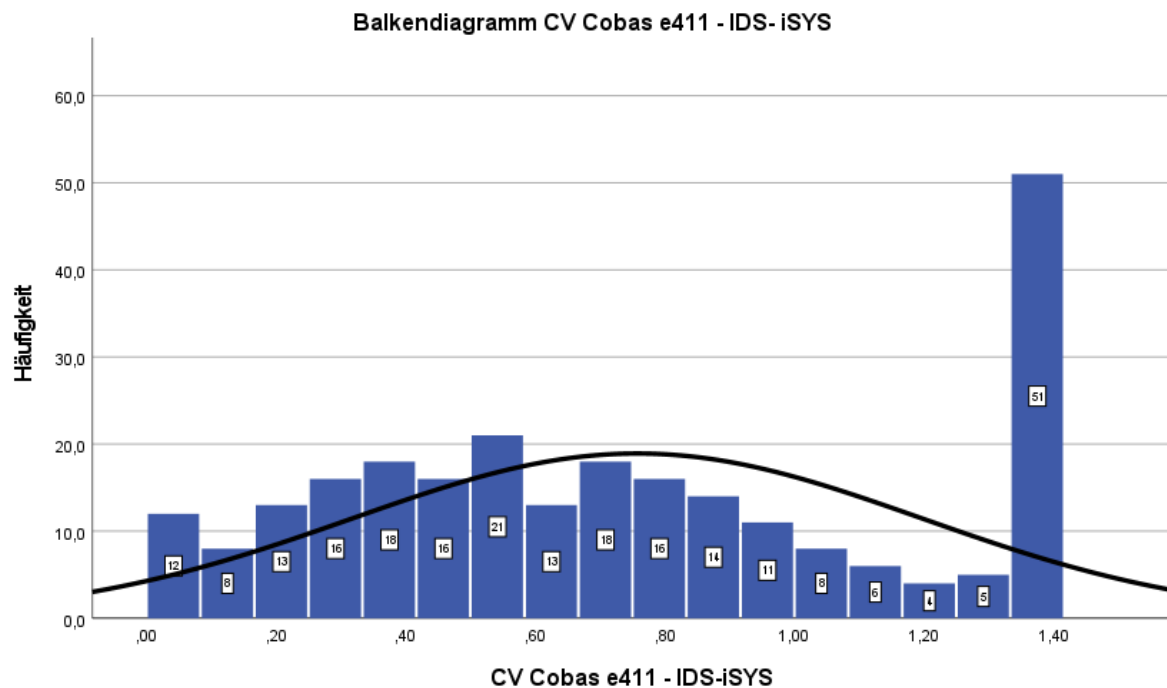


Abbildung 15: Balkendiagramm zur Verteilung der individuellen CVs zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS.

4.9 Konkordanz- Korrelationskoeffizient nach Lin

Es ergab sich für die betrachtete Stichprobe ein $p_c = 0,539$ 95% KI [0,62;0,45], was eine deutliche Übereinstimmung (3.4.10) der Wertepaare mit der Geraden der vollständigen Übereinstimmung attestierte.

Nach der Einschätzung von McBride et. al. (3.4.10) würde der hier gefundene CCC mit $p_{cuntere95KI} = 0,45$ einer schwachen Übereinstimmung der Messverfahren entsprechen.

4.10 Bland Altman Plot

Im Bland Altman Plot (3.4.11) ist die Lage der Übereinstimmungsgrenzen abhängig von der Verteilung der Differenzen.

Wie jedoch in Abbildung 12 zu sehen ist, folgte die Verteilung der Differenzen keiner Normalverteilung. Aus diesem Grund wurden die Daten zur Basis e logarithmiert und in Abbildung 16 aufgetragen.

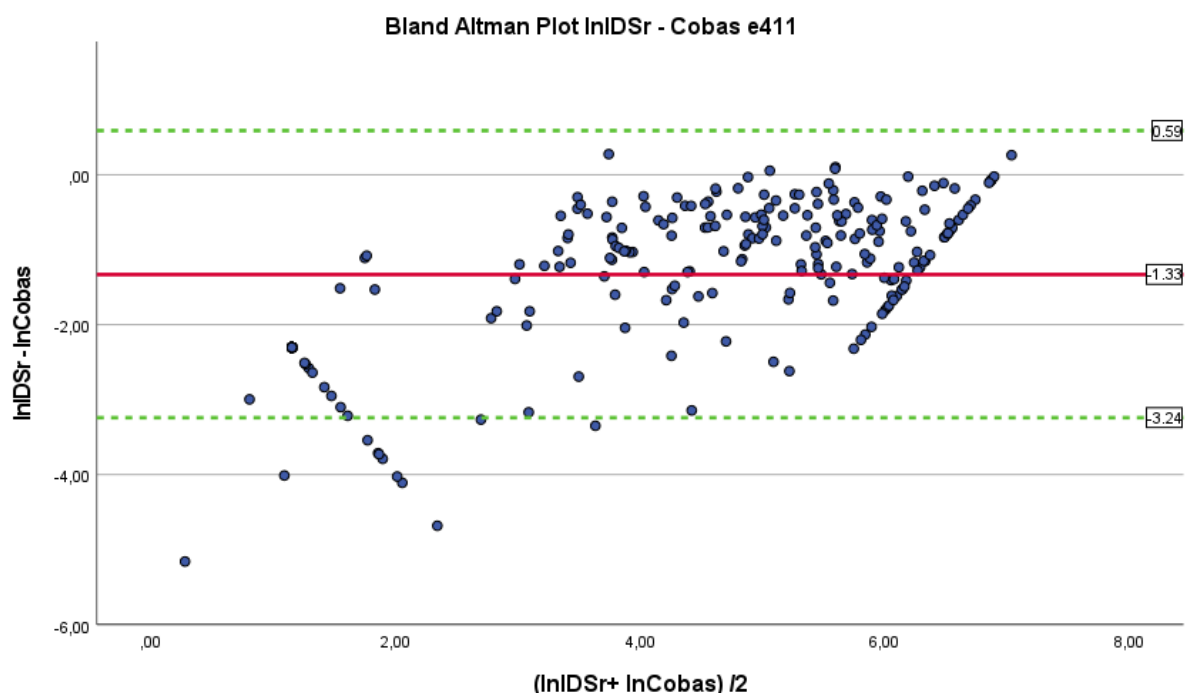


Abbildung 16: Bland Altman Plot. Daten zur Basis e log- transformiert. Cobas e411, IDS- iSYS.

Dadurch, dass nur sehr wenige Punkte eine positive Differenz aufwiesen, und die durchschnittliche Differenz der Messwerte negativ war, wurde abermals gezeigt, dass IDS-iSYS niedriger gemessen hat als Cobas e411.

Für die Berechnung der Konfidenzintervalle des Mittelwertes und der Übereinstimmungsgrenzen wurde der Standardfehler desselben benötigt (3.4.11), welcher hier 0,0619 IU/ml beträgt.

Der Mittelwert der Differenzen der logarithmierten Daten betrug $y = -1,33$ 95%KI [-1,21; -1,45]. Die obere Übereinstimmungsgrenze lag bei 0,59 95%KI [0,71; 0,45] und die untere bei -3,24 95% KI [-3,12; -3,36].

Durch die Rücktransformation der Werte aus Abbildung 16, ergab sich die Steigung der Geraden der mittleren Differenz mit $m = -1,16 \text{ IU/ml}$ 95%KI $[-1,04; -1,28]$, die Steigung der Geraden der oberen Übereinstimmungsgrenze mit $m = 0,57 \text{ IU/ml}$ 95%KI $[0,69; 0,45]$ und die der unteren mit $m = -1,85 \text{ IU/ml}$ 95% KI $[-1,73; -1,97]$.

Mithilfe der Rücktransformation konnten die angepassten Übereinstimmungsgrenzen in ein Bland Altman Plot aufgetragen werden, das über den gesamten Wertebereich keine absoluten, sondern relative, für jeden Wert individuelle Übereinstimmungsgrenzen angibt.

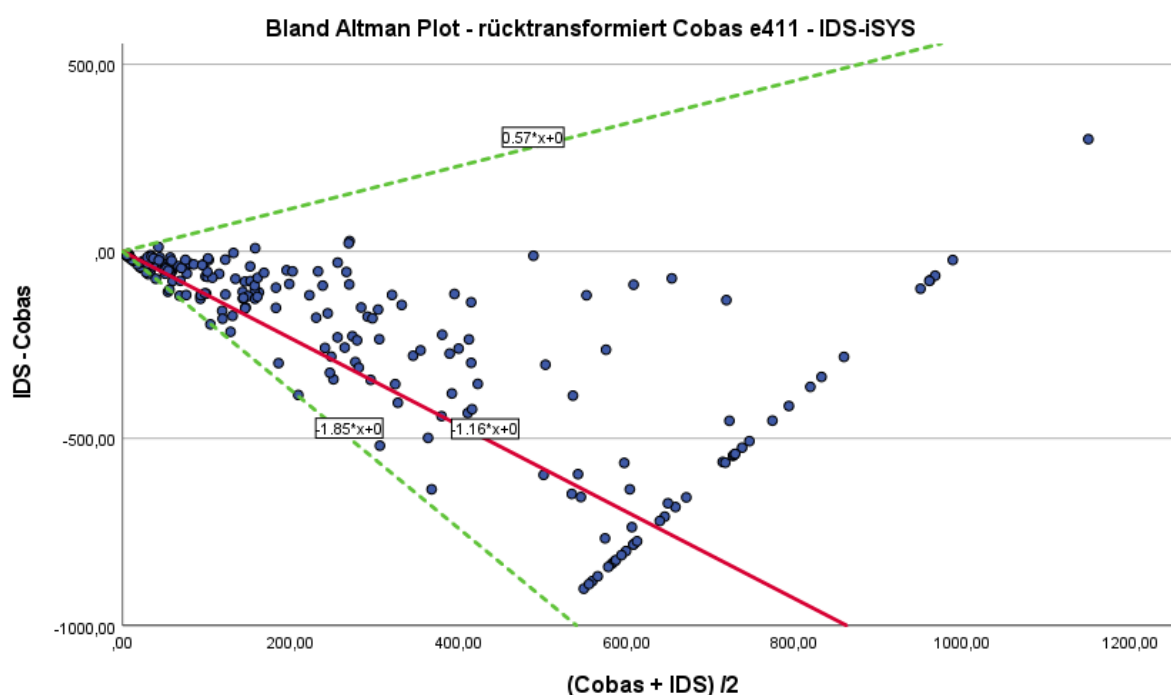


Abbildung 17: Bland Altman Plot mit rücktransformierter, mittlerer Differenz und Übereinstimmungsgrenzen.

Man erkennt, dass die Übereinstimmung der Messergebnisse beider Verfahren gering war. Wäre sie groß gewesen, hätten sich die Punkte um $y=0$ gruppiert, womit auch die Steigung der Gerade der mittleren Differenz näher an $m=0$ gelegen hätte.

4.10.1 Bland Altman Plot unter Berücksichtigung der vorgegebenen Cut-offs

Im nächsten Schritt wurde die vom Hersteller anhand der Cut-Off Werte (3.3.1, 3.3.2) angegebene Abweichung der Geräte berücksichtigt. Dafür wurde ermittelt, dass IDS-iSYS laut Cut-Off $15/35=0,42$ (42%) der Höhe der Werte von Cobas e411 misst. Um

diesen Faktor auszugleichen, wurden die Ergebnisse von Cobas e411 mit 0,42 multipliziert.

Da die Verteilung der Differenzen (3.4.4) nach Anpassung an die Cut-Offs weder graphisch noch rechnerisch durch die Tests nach Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk (3.4.3) eine Normalverteilung aufwies, wurden die Daten auch hier zur Basis e logarithmiert. Diese transformierten Daten wurden, wie in 3.4.11 beschrieben, in ein Bland Altman Plot aufgetragen und anschließend rücktransformiert.

Die rücktransformierten Ergebnisse wurden daraufhin in ein konventionelles Bland Altman Plot übertragen, wodurch sich abermals individuelle Übereinstimmungsgrenzen ergaben.

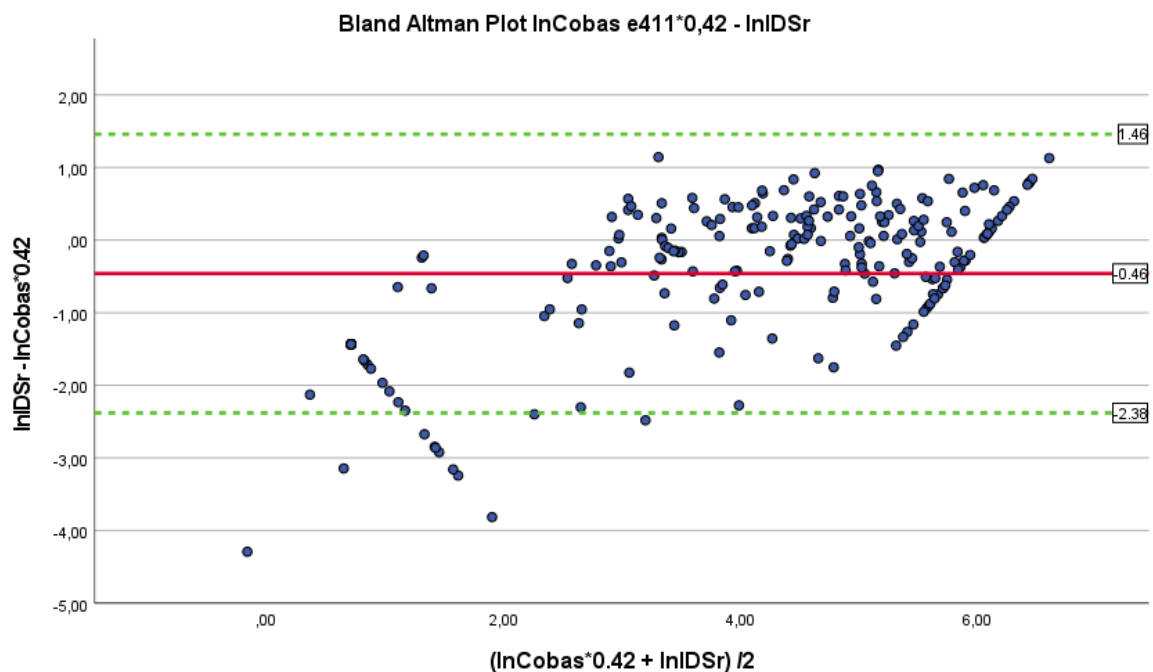


Abbildung 18: Bland Altman Plot. Daten zur Basis e transformiert. Anpassung der Messwerte an die Cut-offs der Methoden. Cobas e411 du IDS-iSYS.

Man erkennt, dass die mittlere Differenz in Abbildung 18 näher an $y=0$ liegt als in Abbildung 16.

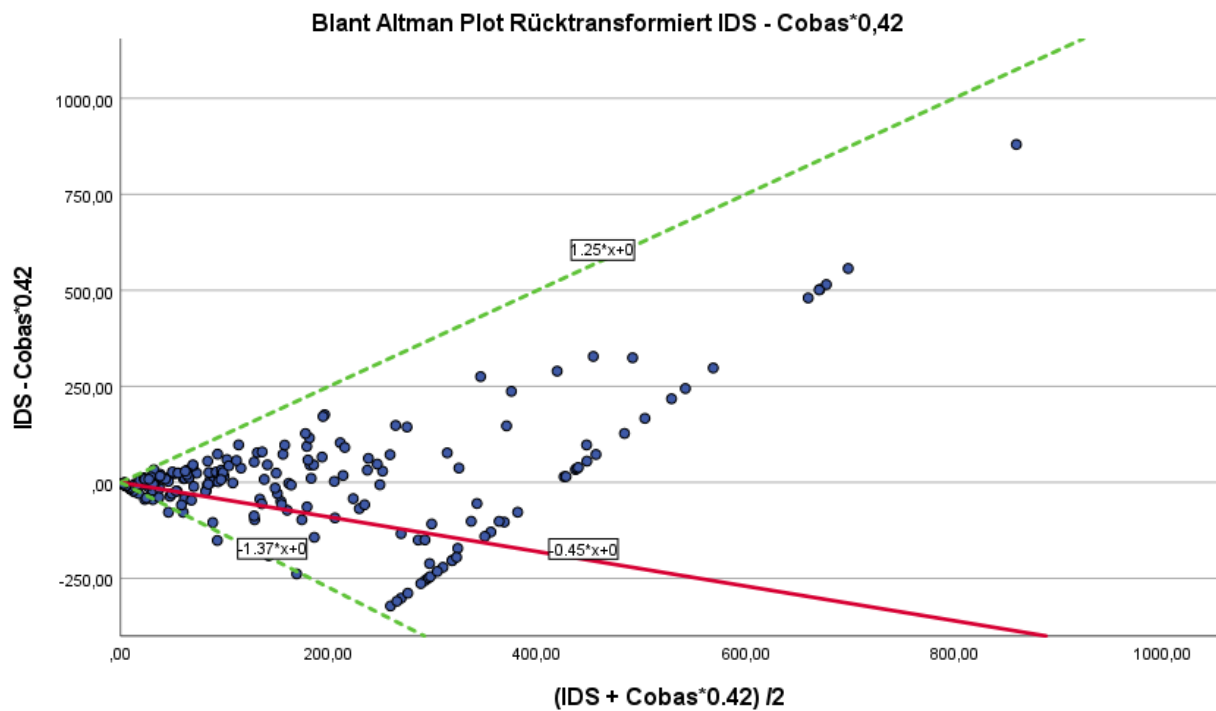


Abbildung 19: Konventionelles Bland Altman Plot unter Anpassung der Messwerte an die Cut-offs der Methoden mit rücktransformierten LoA und Gerade der mittleren Differenzen.

Die Gerade der mittleren Differenz liegt mit $m = -0,45$ 95%KI $[-0,33; -0,57]$ deutlich von $m = 0$ entfernt. Damit konnte auch nach Anpassung der Messwerte anhand der vom Hersteller angegebenen Cut-Offs keine gute Übereinstimmung der Messwerte zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS erreicht werden.

4.11 Sensitivität und Spezifität

Für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität (3.4.12) wurde eine 4 Felder Tafel der klinischen Interpretation der TPO-Ak Messergebnisse von Cobas e411 und IDS-iSYS angefertigt.

Dabei wurden 17 von insgesamt 200 TPO-Ak positiven Seren von IDS- iSYS nicht als solche erkannt. Von den 50 TPO-Ak negativen Seren wurden alle von IDS- iSYS als negativ erkannt. Die absolute Abweichung von IDS zu Cobas e411 betrug demnach 17/250(6,8%), die absolute Übereinstimmung entsprechend 233/250 (93,2%).

	Cobas e411 positiv	Cobas e411 negativ	total
IDS-iSYS positiv	183	0	183
IDS-iSYS negativ	17	50	67
	200	50	250

Tabelle 7: 4 Felder Tafel, Cobas e411 – IDS-iSYS.

Berechnete man anhand dieser 4 Felder Tafel die Sensitivität und Spezifität für IDS-iSYS mit Cobas e411 als Bezugsgerät, so ergab sich für die TPO-Ak Messung von IDS- iSYS eine Sensitivität von $183/200=91,5\%$ und eine Spezifität von $50/50=100\%$.

IDS-iSYS erkannte also alle von Cobas e411 als Negativeingestuften ebenfalls als negativ, und 91,5% der von Cobas e411 als positiv Eingestuften als positiv.

4.12 Zusammenfassung der Vergleiche mit Immulite 2000

Die Daten von Immulite 2000 stammen aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann und sind hier der Vollständigkeit halber mit eingebunden.

Hier soll eine Zusammenfassung zweier weiterer Methodenvergleiche erfolgen. Zum einen wird ein Vergleich zwischen Immulite 2000 und IDS-iSYS zusammenfassend vorgestellt, zum anderen ein Vergleich der klinischen Ergebnisse von Cobas e411 und Immulite 2000 beschrieben.

4.12.1 Häufigkeitsverteilung Immulite 2000

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung (3.4.1) der Messwerte von Immulite 2000 in Abbildung 20, fällt auf, dass Häufungen sowohl im niedrigen als auch im hohen Assay-Bereich vorkommen. Allerdings wurde dabei bei keiner Probe ein Wert an der unteren Assay-Grenze von 10IU/ml gemessen. Nur 4 Proben, welche alle aus der Kontrollgruppe stammen, wurden mit einem Wert niedriger als der mit 35IU/ml angegebene Cut-Off gemessen. (3.3.3) Bei 52 Proben wurde bei einer Messung mit Immulite 2000 die obere Assay-Grenze von 1000IU/ml erreicht. Grün stellt Messungen unterhalb des Cut-Offs von 35IU/ml dar, blau Messungen oberhalb davon.

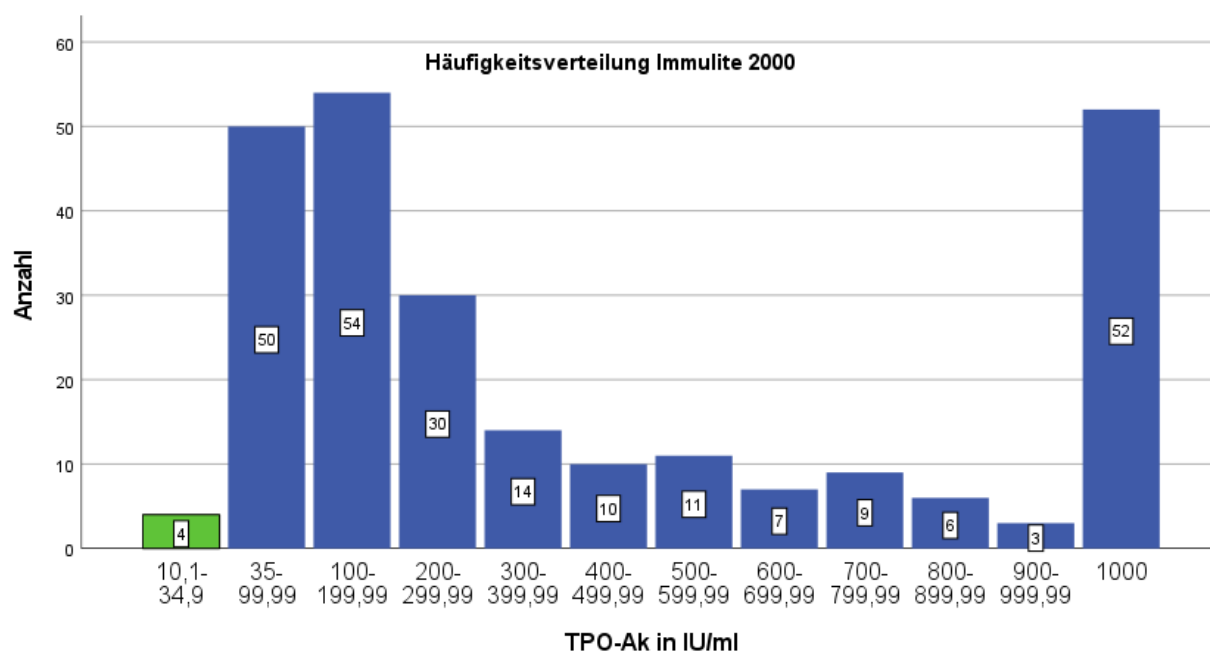


Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung der TPO-Ak Messwerte von Immulite 2000. Daten aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann.

Anhand der Verteilung der Werte von Immulite 2000 ist deutlich zu erkennen, dass keine Normalverteilung vorliegt.

IDS-iSYS hat im Gegensatz zu Immulite 2000 sehr häufig Werte der unteren Assay-Grenze und nur einmal einen Wert der oberen Assay-Grenze gemessen. (vergleiche: 4.1)

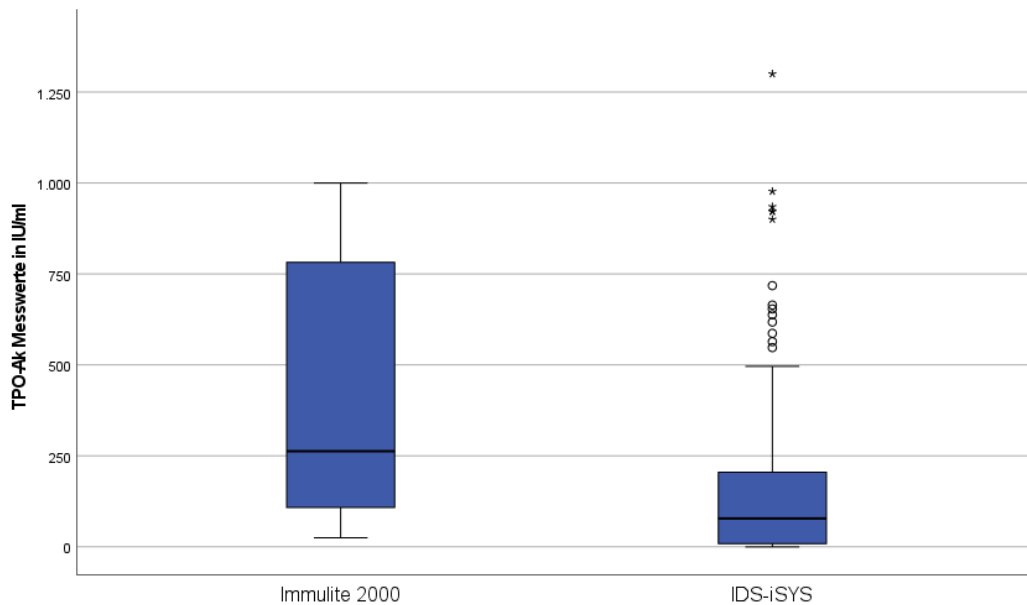


Abbildung 21: Boxplots zu den TPO-Ak Messwerten in IU/ml von Immulite 200 und IDS-iSYS. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann.

In dem Boxplot in sieht man, dass bei den Messungen von Immulite 2000, anders als bei IDS-iSYS (4.1), keine Ausreißer detektiert wurden.

Es wurde entschieden, die Ausreißer in der Stichprobe zu belassen und die weitere Analyse mit der gesamten Stichprobe auszuführen, da davon ausgegangen wurde, dass es sich um korrekt gemessene Werte handelt. (4.1)

Außerdem ist schon graphisch ein deutlicher Unterschied in der Lage des Medians zu erkennen. Dieser liegt bei Immulite 2000 mit 263 IU/ml mehr als 3-mal so hoch wie bei IDS-iSYS mit 78,2 IU/ml.

Weitere Lage- und Streumaße (3.4.2) sind in Tabelle 8 aufgeführt.

<i>Deskriptive Statistik</i>		IDS-iSYS	Immolute 2000
N	Gültig	250	250
	Fehlend	0	0
Mittelwert		146,89	422,55
Standardfehler des Mittelwerts		12,78	22,94
Median		78,15	263,00
Std.-Abweichung		202,06	362,73
Minimum		,00	25,10
Maximum		1300,00	1000,00
Perzentile	25	8,43	107,75
	50	78,15	263,00
	75	205,43	783,25

Tabelle 8: Lage- und Streumaße der Messwerte von IDS-iSYS und Immolute 2000 in IU/ml. Daten von Immolute 2000 aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann.

4.12.2 Streudiagramm IDS iSYS - Immolute 2000

Da beide Assays dazu designt wurden, die TPO-Ak zu messen, gehen wir hier von einem linearen Zusammenhang aus.

Im Streudiagramm aus Abbildung 22 erkennt man, dass sowohl im niedrigen als auch im hohen Wertebereich die Abweichungen der Messergebnisse von Immolute 2000 und IDS-iSYS groß sind. Da nahezu alle Punkte unterhalb der Winkelhalbierenden liegen, zeigt sich abermals, dass IDS-iSYS deutlich niedrigere Werte gemessen hat als Immolute 2000.

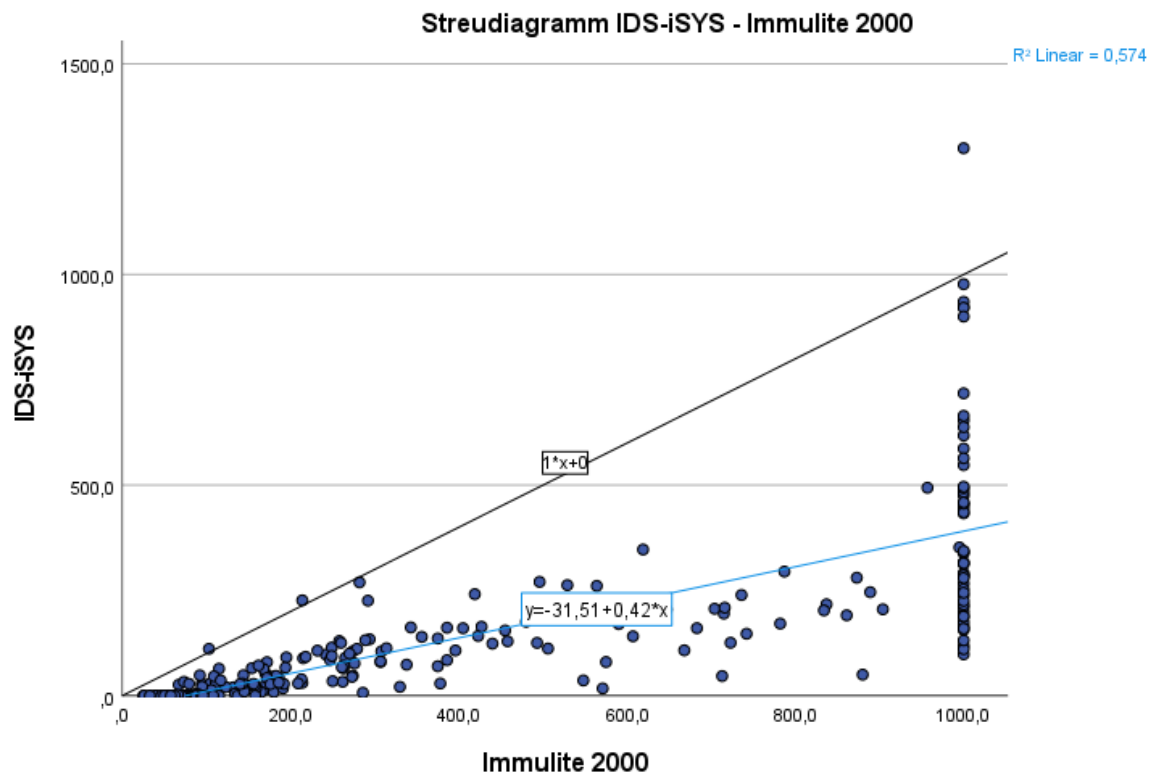


Abbildung 22: Streudiagramm IDS-iSYS auf Immulite 2000 mit linearer Regressionsgrade und Winkelhalbierender. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.

Um die Abweichungen der Assays über den gesamten Messbereich auf einer relativen Skala graphisch zu analysieren, wurde ein Streudiagramm mit logarithmierten Daten angefertigt. (3.4.6) Um die Daten von IDS-iSYS logarithmieren zu können, wurden sie wie in 3.4.6 beschrieben, umcodiert.

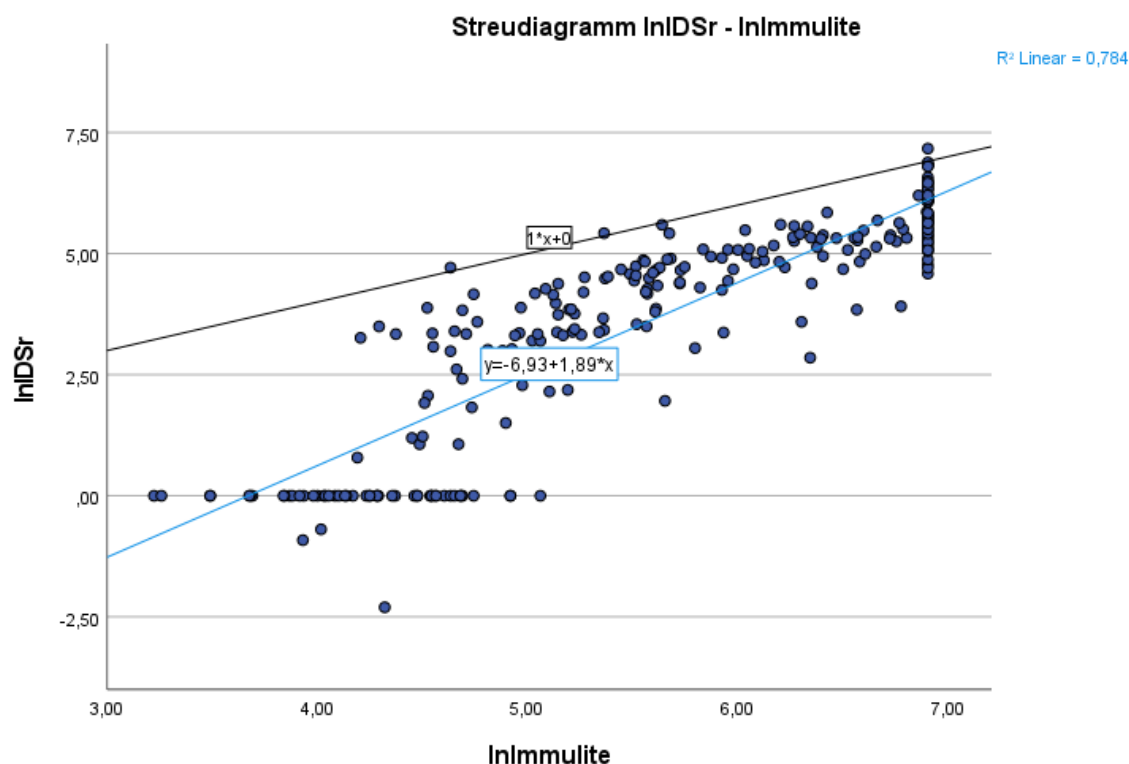


Abbildung 23: Streudiagramm In IDSr auf In Immulite 2000 mit linearer Regressionsgrade und Winkelhalbierender. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.

Man erkennt in Abbildung 23, dass die relative Abweichung im hohen Assay-Bereich größer ist als im niedrigen.

4.12.3 Spearman Korrelation

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman (3.4.8) bestätigt mit $r_s = 0,915[0,891; 933]$ zu $p < 0,001$ eine nach Cohen stark positive Korrelation zwischen den Messergebnissen von Immulite 2000 und IDS-iSYS.

			IDS-iSYS	Immulate 2000
Spearman-Rho	IDS-iSYS	Korrelationskoeffizient	1,000	,915**
		Sig. (2-seitig)	.	<,001
		N	250	250

** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Tabelle 9: Spearman Korrelationskoeffizient, Immulite 2000 – IDS-iSYS.

4.12.4 Variationskoeffizient IDS-iSYS – Immulite 2000

Da auch in diesem Datensatz keine Präzisionsmessungen vorliegen, konnte die Intra-Methoden- Variabilität nicht berechnet werden. (3.4.9)

Allerdings konnte die Inter-Methoden Variabilität mittels des CV beschrieben werden. (3.4.9) Zusätzlich zu den in 3.4.9 beschriebenen Methoden wurde hier der Median der individuellen CVs berechnet.

Der durchschnittliche Variationskoeffizient zwischen IDS-iSYS und Immulite 2000 betrug $CV=0,981$ 95%KI [0,938;1,023] = 98,1%, der CV- Median= 0,8819= 88,19%.

4.12.5 Konkordanz- Korrelations- Koeffizient nach Lin IDS-iSYS – Immulite 2000

Der CCC (3.4.10) für die betrachtete Stichprobe beträgt $p_c = 0,447$ 95% KI [0,54; 0,34] was eine deutliche Übereinstimmung der Wertepaare mit der Geraden der vollständigen Übereinstimmung attestiert.

Nach der Einschätzung von McBride et. al. (3.4.10) würde der hier gefundene CCC mit $p_{cuntere95KI} = 0,34$ einer schwachen Übereinstimmung der Messverfahren entsprechen.

4.12.6 Bland Altman Plot - IDS-iSYS – Immulite 2000

Es ergibt sich mithilfe der Rücktransformation ein Bland Altman Plot (3.4.11), das über den gesamten Wertebereich keine absoluten, sondern relative, für jeden Wert individuelle, Übereinstimmungsgrenzen angibt.

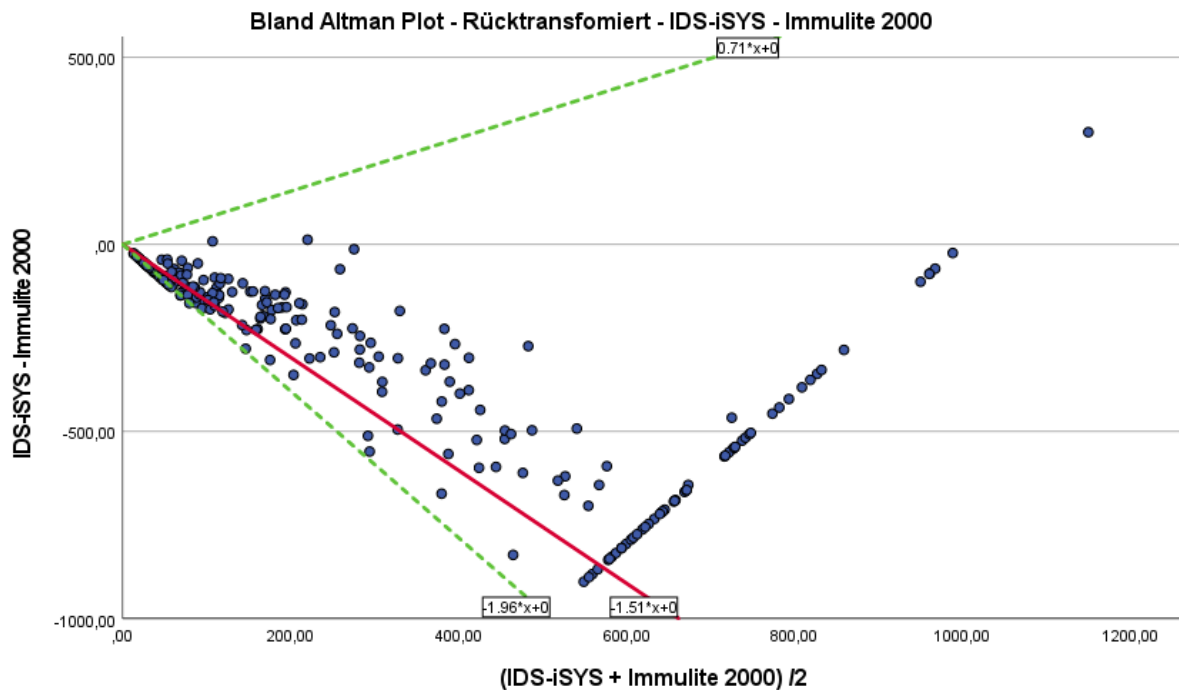


Abbildung 24: Konventionelles Bland Altman Plot mit rücktransformierten LoA und Gerade der mittleren Differenzen. IDS-iSYS – Immulite 2000. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann.

Dadurch, dass nahezu alle Punkte unterhalb $y=0$ liegen, erkennt man, dass ein von IDS-iSYS höher als von Immulite 2000 gemessener Wert sehr ungewöhnlich wäre.

Man erkennt außerdem, dass die Übereinstimmung der Messergebnisse beider Verfahren gering ist. Wäre sie groß, würden sich die Punkte um $y=0$ gruppieren, womit auch die Steigung der Gerade der mittleren Differenz näher an $m=0$ läge.

Die Steigung der Gerade der mittleren Differenz liegt, mit $m= -1,51$ 95% KI $[-1,39; -1,63]$, niedriger als beim Vergleich zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS (4.10) mit $m= -1,16$ 95% KI $[-1,04; -1,28]$ was zeigt, dass die Übereinstimmung der einzelnen Messergebnisse zwischen IDS-iSYS und Immulite 2000 geringer ist als zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS.

4.12.7 Bland Altman Plot unter Berücksichtigung der vorgegebenen Cut-Offs, IDS-iSYS und Immulite 2000

Dafür wurden, wie in 3.4.11 beschrieben, die Assay- Ergebnisse anhand ihrer Cut-Off Werte angepasst. Die Messwerte von Immulite 2000 wurden mit dem Faktor 0,42 multipliziert (3.3.2, 3.3.3). Die Erstellung der Bland-Altman-Plots erfolgte nach oben beschriebenem Schema. (3.4.11)

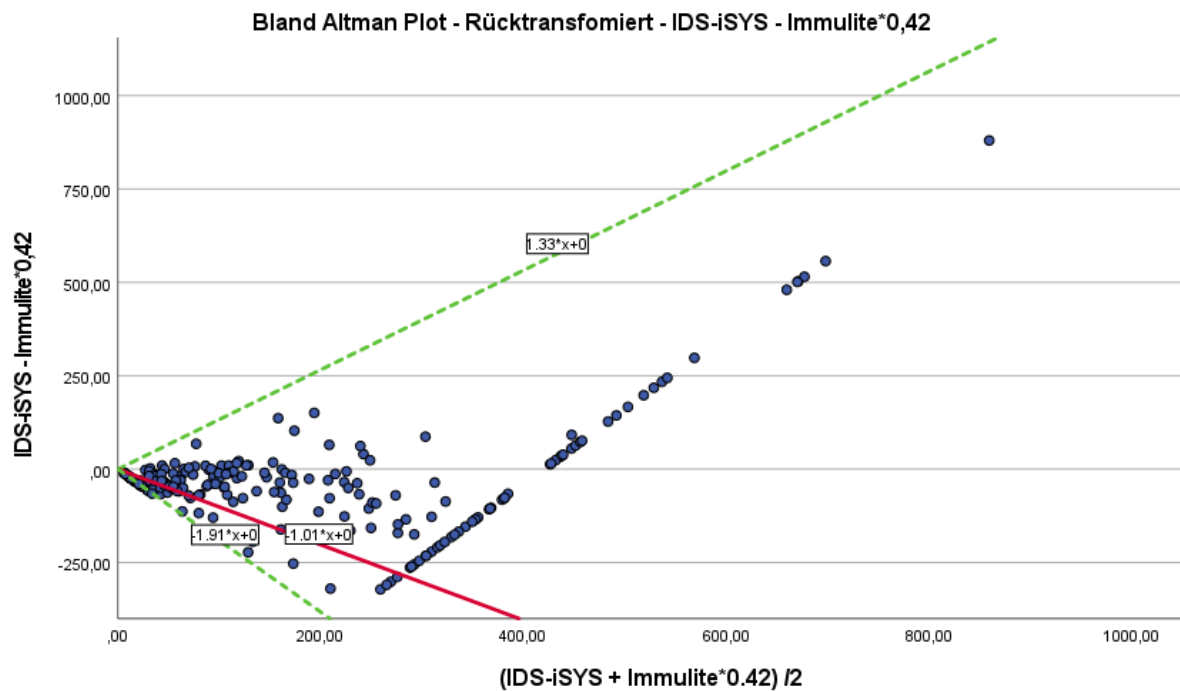


Abbildung 25: Konventionelles Bland Altman Plot unter Anpassung der Messwerte an die Cut-offs der Methoden mit rücktransformierten LoA und Gerade der mittleren Differenzen. IDS-iSYS – Immulite*0,42. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.

Man erkennt in Abbildung 25, dass selbst nach Anpassung der Cut-Offs die Steigung der Geraden der mittleren Differenzen mit $m = -1,01$ 95%KI $[-0,89; -1,13]$ stark von $m = 0$ abweicht, was zeigt, dass die Werte selbst bei angepassten Cut-Offs nicht miteinander übereinstimmen.

4.12.8 Sensitivität und Spezifität

Sensitivität und Spezifität können in diesem Datensatz nur in Bezug auf Cobas e411 angegeben werden, da dieses als Referenzmethode diente. (3.4.12) Aus diesem Grund wurde für den Vergleich Immulite 2000- IDS- iSYS deren klinische Übereinstimmung/Abweichung betrachtet.

	Immulite 2000 positiv	Immulite 2000 negativ	total
IDS-iSYS positiv	183	0	183
IDS-iSYS negativ	63	4	67
	246	4	250

Tabelle 10: 4 Felder Tafel, Immulite 2000 Cut Off 35IU/ml – IDS-iSYS Cut Off 15IU/ml. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann.

Die absolute Übereinstimmung zwischen Immulite 2000 und IDS- iSYS betrug 187/250 (74,8%), die absolute Abweichung entsprechend 63/250 (25,2%).

Die klinische Abweichung zwischen IDS- iSYS und Immulite 2000 liegt mit 25,2% 3,7mal so hoch wie zwischen Cobas e411 und IDS- iSYS. (4.11)

Um alle drei Methoden darstellen zu können, wurde für die Veranschaulichung der klinischen Interpretation der Assay-Ergebnisse folgende 6 Felder Tafel angelegt.

	Cobas e411 (Cut-off 35IU/ml)	IDS- iSYS (Cut-off 15IU/ml)	Immulite 2000 (Cut-off 35IU/ml)
positiv	200	183	246
negativ	50	67	4
total	250	250	250

Tabelle 11: 6 Felder Tafel: Cobas e411, IDS-iSYS, Immulite 2000. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.

Aus Tabelle 7, Tabelle 10 und Tabelle 11 ergebenden sich die absolute Übereinstimmung, die Sensitivität sowie die Spezifität (3.4.12) der Methoden, welche zusammenfassend in Tabelle 12 dargestellt sind.

	Cobas e411	Immulite 2000
IDS- iSYS (Cut-off 15IU/ml)	1: 93,2% 2: 91,5% 3: 100%	1: 74,8%
Immulite 2000	1: 81,6% 2: 100% 3: 8%	

Tabelle 12: Klinischer Methodenvergleich. 1=absolute Übereinstimmung, 2=Sensitivität, 3=Spezifität. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.

4.12.9 ROC Analyse IDS-iSYS – Immulite 2000

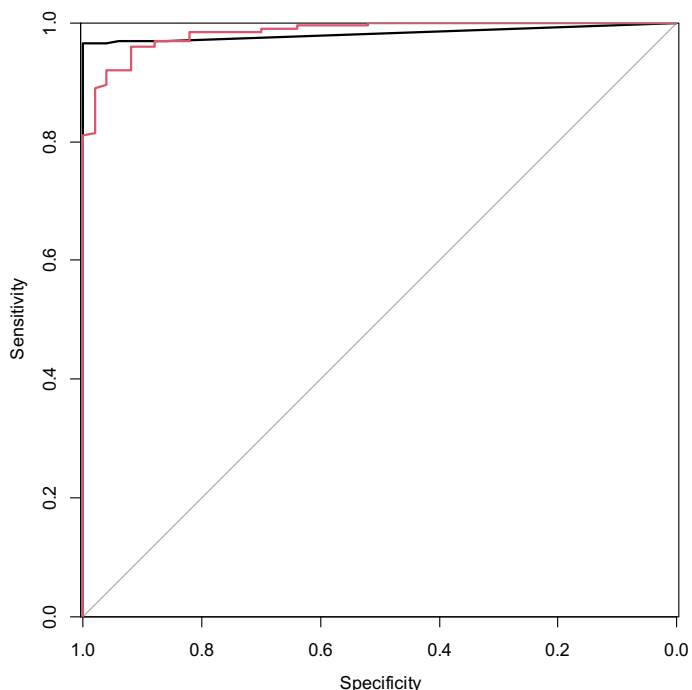


Abbildung 26: ROC-Kurven, IDS-iSYS rot, Immulite 2000 schwarz. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.

Anhand der ROC-Kurve lässt sich sagen, dass sowohl IDS-iSYS als auch Immulite 2000 eine gute Diskrimination zwischen Gesunden und Erkrankten aufweisen. Die rechnerische ROC-Analyse (Tabelle 13+Tabelle 14) findet dabei mit $p=0,84$ keinen signifikanten Unterschied zwischen den Methoden bezüglich deren Fähigkeit zur Diskrimination zwischen Erkrankten und den Kontrollen.

	AUC	95%KI
IDS-iSYS	0,983	0,969/-0,996
Immulate 2000	0,985	0,973/-0,996

Tabelle 13: AUC der ROC- Kurven von IDS-iSYS und Immulite 2000, AUC: Fläche unter der Kurve. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.

	AUC1	AUC2	Differenz	Untres 95%KI	Oberes 95%KI	p-Wert
Immulate 2000 vs. IDS-iSYS	0,985	0,983	0,002	-0,019	0,019	0,84

Tabelle 14: ROC-Analyse der AUC von IDS- iSYS und Immulite 2000. AUC: Fläche unter der Kurve. Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

5.1.1 Cobas e411 – IDS-iSYS

Schon anhand der Histogramme zur Häufigkeitsverteilung (3.4.1) lässt sich erkennen, dass IDS-iSYS niedrigere Werte gemessen hat als Cobas e411 (4.1.1). Dies wird durch die Steigung der Regressionsgerade (3.4.6) (4.6), welche geringer ist als die der Gerade der Übereinstimmung und die Verteilung der Differenzen (3.4.4) (4.4) bestätigt.

Um diesen Unterschied zu quantifizieren, können nun die Mittelwerte (3.4.2) betrachtet werden. Cobas e411 hat 2,26-mal so hoch gemessen wie IDS-iSYS. (4.2) Anders ausgedrückt, sind die Messergebnisse von IDS-iSYS nur 44,22% so hoch wie die von Cobas e411. (4.2) Betrachtet man nun die vom Hersteller angegebenen Cut-Off Werte (3.3.1 + 3.3.2), misst IDS-iSYS 42,86% so hoch wie Cobas e411.

Zunächst scheinen die quantitativen Differenzen der Assays in dieser Arbeit gut mit den Herstellerangaben übereinzustimmen. Allerdings kann daraus nicht geschlussfolgert werden, dass die einzelnen Ergebnisse beider Methoden anhand des durch die Division der Cut-offs erhaltenen Faktors ineinander umgerechnet werden können. Dies wird durch die, nach Anpassung an die Cut-offs, immer noch deutlich von $m=0$ abweichende Steigung der Gerade der mittleren Differenz im Bland Altman Plot (3.4.11) in Abbildung 19 gezeigt.

Dass ein über die Herstellerangaben hinaus bestehender Messunterschied besteht, zeigten auch der hohe CV (3.4.9) von 87,5% (4.8) und der CCC (3.4.10) mit einem Wert von 0,539 (4.9) Beide unterscheiden sich deutlich von dem durch die Division der Cut-offs erhaltenen Faktor, was zeigt, dass es neben dem vom Hersteller angegebenen systematischen Fehler noch mindestens einen weiteren systematischen oder zufälligen Fehler geben muss.

Betrachtet man die Zusammenhangsanalyse (3.4.8), wird ein stark positiver Zusammenhang zwischen den Messergebnissen beider Assays sichtbar. (4.7) Das bedeutet, dass hohe Werte bei Cobas e411 auch hohe Werte bei IDS-iSYS ergeben haben, und umgekehrt. Wichtig bei der Untersuchung der Übereinstimmung zweier Analyseverfahren ist, dass die Zusammenhangsanalyse nicht für die Prüfung der

Übereinstimmung der einzelnen Messergebnisse beider Geräte herangezogen werden kann. (193)

Interpretiert man die Messergebnisse nun aber anhand ihrer klinischen Aussagen (3.4.12), zeigt sich hier eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS. Dabei betrug die absolute Übereinstimmung 93,2%, die Sensitivität und Spezifität je 91,5% und 100%. (4.11) Dies bedeutet, dass in dieser Stichprobe bei etwa jedem 15ten Patienten die Assays bezüglich der Beurteilung Antikörper negativ/positiv zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen.

Hier zeigt sich, dass, trotz der Unmöglichkeit einer zuverlässigen Umrechnung der absoluten Messergebnisse ineinander, die Interpretation anhand der Cut-Offs vergleichbare klinische Ergebnisse liefert.

Diese gute klinische Übereinstimmung zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS in dieser Analyse ist ein Zeichen, dass diese zwei Assays in ihrem klinischen Einsatz austauschbar verwendet werden könnten.

Weitere Untersuchungen müssen durchgeführt werden um die gute Übereinstimmung der klinischen Ergebnisse zwischen IDS-iSYS und Cobas e411 zu bestätigen.

5.1.2 IDS-iSYS – Immulite 2000

Vorab sei erneut erwähnt, dass alle Daten von Immulite 2000 aus der Dissertation von L. Schenk- Schlautmann stammen und deren Auswertung hier der Vollständigkeit halber ebenfalls aufgeführt ist.

Auch bei dem Vergleich der Assays Immulite 2000 und IDS-iSYS ließ sich anhand der Häufigkeitsverteilung (3.4.1) (4.1.1 + 4.12.1), der Höhe der Mediane (3.4.2) sowie der Verteilung der Punktwolke im Streudiagramm mit entsprechender Regressionsgerade (3.4.6) (4.12.2) erkennen, dass IDS-iSYS deutlich niedrigere Werte als Immulite 2000 gemessen hat.

Diese Unterschiede lassen sich, wie schon im obigen Vergleich (5.1.1), nicht rein durch die unterschiedlichen Cut-offs (3.3.1 + 3.3.3) erklären. Dies wird abermals durch das Bland Altman Plot mit an die Cut Offs angepassten Werten (3.4.11) belegt. Dort ist ersichtlich, dass selbst eine Umrechnung der Werte anhand des durch die Cut Offs angegebenen Faktors nicht zu einer Übereinstimmung der Wertepaare führt. (4.12.7)

Um die Unterschiede der Assays vollständig zu beschreiben, muss es folglich, neben dem von den Herstellern angegebenen systematischen Fehler, noch mindestens einen weiteren systematischen oder zufälligen Fehler geben.

Diese geringe Übereinstimmung der Werte spiegelt sich auch in der klinischen Interpretation (3.4.12) der Messergebnisse wider. Die absolute Übereinstimmung zwischen IDS-iSYS und Immulite 2000 betrug 74,8% (4.12.8), womit in diesem Kollektiv bei etwa jeder 4ten Probe ein klinisch abweichendes Ergebnis zu erwarten war.

Aufgrund dieser geringen klinischen Übereinstimmung sind Immulite 2000 und IDS-iSYS nicht in der Lage sich in der Diagnostikentscheidung zu ergänzen. Die Methoden sind also nicht austauschbar verwendbar. Allenfalls kann Immulite 2000 zu einer Bestätigung hoher TPO-Ak Titer herangezogen werden und IDS-iSYS zu Bestätigung niedriger TPO-Ak Titer.

5.1.3 Gemeinsamkeiten und Differenzen der Vergleiche

Die Korrelation zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS (4.7) ist genauso stark wie zwischen IDS-iSYS und Immulite 2000 (4.7 + 4.12.3)

Auf quantitativer Ebene zeigen sowohl der CV (3.4.9), der CCC (3.4.10) sowie die an die Cut-off Werte angepassten Bland Altman Plots (3.4.11) eine bessere Übereinstimmung zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS als zwischen Immulite 2000 und IDS-iSYS. (4.8 +4.12.4), (4.9 +4.12.5), (4.10.1 +4.12.7).

Diese bessere Übereinstimmung zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS zeigt sich auch im Vergleich der Sensitivität und Spezifität (3.4.12) der Methoden. Nur in diesem Vergleich konnten akzeptable Werte erhalten werden, wohingegen zwischen Cobas e411 und Immulite 2000 die hohen Messergebnisse von Letzterem zu einer sehr geringen Spezifität von 4% geführt haben (4.11 + 4.12.8).

Die ROC-Analyse (3.4.13) zeigt allerdings keinen signifikanten Unterschied in der Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen TPO-Ak positiven und negativen Proben für IDS-iSYS und Immulite 2000. (4.12.9) Dies bedeutet, dass Immulite 2000 prinzipiell in der Lage ist, diese Diskriminierung zu leisten. Der vorgegebene Cut-Off von 35IU/ml

ist in dieser Untersuchungsreihe jedoch zu niedrig angesetzt, um diese gute Differenzierung abzubilden.

Die Ergebnisse dieser statistischen Ausarbeitung der Methodenvergleiche gibt ein erstes Anzeichen dafür, dass Cobas e411 und IDS-iSYS diagnostisch austauschbar genutzt werden können. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese gute Übereinstimmung zwischen den oben genannten Methoden zu bestätigen. Immulite 2000 konnte in dieser Dissertation aufgrund seiner geringer Spezifität, jedoch in keiner Kombination zeigen, dass es mit den anderen Methoden austauschbar verwendet werden kann.

5.2 Einordnung der Ergebnisse anhand aktueller Literatur

Methoden zur Bestimmung der TPO-Ak Konzentration im Serum zeigen in ihrer Gesamtheit auch heute noch, nachdem Anstrengungen zur Harmonisierung unternommen wurden, eine hohe analytische Variabilität. (15) (19) (22) (177) Dieser Methodenvergleich soll dazu dienen, ein besseres Verständnis für diese Variabilität zu bekommen, die diagnostische Sicherheit zu erhöhen und langfristig zu einer Harmonisierung der Assays beitragen. Dafür wurden in dieser Arbeit drei Methoden hingehend ihrer quantitativen und qualitativen Ergebnisse miteinander verglichen. Diese waren: Cobas e411 von Roche Diagnostics, IDS-iSYS von IDS und Immulite 2000 von Siemens Healthineers.

In der Literatur konnte kein Methodenvergleich gefunden werden, der das anti-TPO Assay von IDS mit einbezieht, weswegen diese Vergleiche dazu beitragen könnten, diese Methode zwischen Besserbekanntem zu etablieren.

5.2.1 Technische Aspekte

Alle drei Methoden nutzten die Einheit IU/ml zur Beschreibung der Messergebnisse. Was die Messverfahren selbst angeht, so nutzt Cobas e411 ein elektronisches Chemilumineszenz Assay, IDS-iSYS ein Chemilumineszenzassay und Immulite 2000 ein sequenzielles Festphasen chemilumineszenz- immunometrisches Assay. Die Assays von Cobas e411 und Immulite 2000 wurden nach MRC66/387 standardisiert.

Für IDS-iSYS ist dies nicht im Method sheet vermerkt, somit , dass dieser Standard nicht angewandt wurde. (181) (185) (187)

Es fällt auf, dass sowohl Cobas e411 als auch Immulite 2000 nach MRC66/387 standardisiert sind und denselben Cut-off aufweisen, jedoch trotzdem klinisch hohe Diskrepanzen aufweisen. Es muss also weitere Faktoren geben, oder der Standard ist unzureichend, weswegen beide Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Diese könnten als technischer Fehler in dem Gerät, das die Messung durchgeführt hat, an der Kalibration vor der Messung oder auch an der Durchführung der Messung selbst liegen. Als weitere mögliche Fehlerquelle kommen eine, von den anderen Methoden abweichende Reaktion auf Lagerungsprodukte der Proben (212) sowie der Prozess der Antigen-Aufreinigung (2.6.4) in Betracht. Dieser wird von vielen Autoren als hauptverantwortlich für die hohe analytische Variabilität der TPO-AK Assays gesehen. (15) (18) (19) (20) (177) (180)

Da sich die Assays im Laufe der Zeit weiterentwickelt haben, schlagen Tozzilo et. al., wie oben erwähnt (2.6.1) eine Einteilung der Methoden in verschiedene Generationen vor. (19) Demnach fallen Cobas e411 und Immulite 2000 eindeutig in die dritte Generation. Bei IDS-iSYS ist die Einteilung nicht eindeutig, da der Cut-off bei 15IU/ml, exakt auf der Grenze zwischen dritter und vierter Generation, und das LoD mit 3,0IU/ml im Bereich der dritten Generation liegt. Ein Median der Referenzgruppe ist im Method sheet nicht beschrieben. (185)

Es wurde beobachtet, dass, ohne erkennbaren Grund, Methoden der vierten Generation deutlich niedrigere Werte messen als solche der dritten Generation. (18) (177) Innerhalb der hier vorgestellten Methoden hat IDS-iSYS deutlich niedrigere Werte gemessen als die beiden anderen Methoden (4.14.12.2), was zeigt, dass es zumindest einige Eigenschaften einer Methode der vierten Generation aufweist.

Was die Variabilität zwischen den Methoden betrifft, so schien diese bei einer Untersuchung von D´Aurizio et. al. mit steigenden TPO-Ak Titern abzunehmen. (15) Eine derart exakte Darstellung dieses Phänomens wie bei D´Aurizio et. al. zu sehen, findet sich in dieser Analyse nicht. Die logarithmierten Streudiagramme für den Vergleich zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS zeigen eine etwa ebenso große Variabilität im hohen wie im niedrigen Assaysbereich. Die logarithmierten Streudiagramme für den Vergleich zwischen IDS-iSYS und Immulite 2000 zeigen

anders als bei D´Aurizio et. al. im hohen Assaybereich eine größere Variabilität als im niedrigen. (4.6 + 0)

5.2.2 Quantitative Aspekte

Da der CCC von Lin (3.4.10) dem CV in der Beurteilung der Übereinstimmung zweier Methoden überlegen sein soll (199) (202) (3.4.9), wurde er in dieser Arbeit berechnet. Allerdings scheint der CCC für den Methodenvergleich zur TPO-Ak Bestimmung nicht verbreitet zu sein, so dass keine Studie gefunden werden konnte, die auf ihn zurückgegriffen hat.

Der CV (3.4.9) hingegen wird in der Literatur genutzt, um die analytische Variabilität zwischen zwei Methoden zur TPO-Ak Messung zu beschreiben. Er wird dabei sowohl zur Quantifizierung der Präzision, also der Intra-Assay-Variabilität, als auch zur Beschreibung der Übereinstimmung zweier Methoden, der Inter-Assay Variabilität genutzt. (15) (20) (177)

Da in diesem Datensatz keine Präzisionsmessungen vorliegen, wurde sich auf die Beschreibung der Inter-Assay- Variabilität beschränkt. Dabei betrug der CV für Cobas e411 - IDS-iSYS (4.8) 87,5% und für IDS-iSYS - Immulite 2000 (4.12.4) 98,1%.

La´ulu et. al. benutzten in ihrem Methodenvergleich den CV nur zur Messung der Präzision, weswegen ein Vergleich mit ihrer Publikation nicht möglich ist. (20) D´Aurizio et. al. konnten bei einem Methodenvergleich zwischen fünf handelsüblichen Assays Inter-Method-CVs zwischen 48,6% und 126,3% erzielen. (177) In einer weiteren Studie die 2015 publiziert wurde, wurden 8 Methoden miteinander verglichen. Dort konnten Inter-Method-CVs zwischen 23,1% - 104,5% beobachtet werden. (15)

Obwohl weder ein CV von 87,5% (4.8) noch von 98,1% (4.12.4) eine gute Variabilität zwischen Assays darstellt, die beide dieselben tatsächlich vorhandenen TPO-Ak messen sollten, scheinen diese Größenordnungen mit denen aus der Literatur übereinzustimmen. Diese Variabilität wird zum einen auf die unterschiedlichen LoD und Cut-Off Werte der einzelnen Methoden zurückgeführt, allerdings jedoch hauptsächlich auf die verschiedenen Prozesse der Antigen-Aufreinigung. Hier geht man davon aus, dass durch ebendiese Prozesse Epitope der aufgereinigten TPO unterschiedlich exponiert sind und die polyklonalen TPO-Ak des Patienten diese

unterschiedlich gut erreichen, was zur analytischen Variabilität der Assays führt. (15)
(18) (19) (20) (177) (180)

5.2.3 Qualitative Aspekte

Es gibt eine Reihe von Studien, die sich mit der klinischen Genauigkeit verschiedener TPO-Ak Assays beschäftigt haben.

Amouzegar et. al. haben dafür in der Teheran Thyroid Study über 4000 Proben untersucht und eigene TPO-Ak Cut-offs errechnet, um Studienteilnehmer mit klinischer Hypothyreose anhand der TPO-Ak Konzentration zu erkennen. Dabei konnte eine Sensitivität von 86% und eine Spezifität von 83% erreicht werden. (21)

D´Aurizio et. al. haben die diagnostische Leistung von Assays der dritten Generation untersucht und konnten eine absolute klinische Übereinstimmung von 95,3% feststellen. Darunter fanden sich das Cobas 8000 und das Immulite 2000 xpi. (15) Allerdings zeigt sich hier sogar eine leichte Verschlechterung im Vergleich zu einer Studie von 2002, in welcher Tozzilo et. al. Methoden der zweiten Generation miteinander verglichen und eine absolute Übereinstimmung von 96,5% fanden. (174)

Innerhalb eines Vergleichs von fünf automatisierten Assays zur Bestimmung der TPO-Ak konnten La´ulu et. al. selbst mit neu festgelegten Cut-Off Werten nur eine absolute Übereinstimmung von 77,5% - 84,7% feststellen. Nutzten sie die vom Hersteller angegebenen Cut-Off Werte, fiel die absolute Übereinstimmung mit 62,7% - 84,7% noch geringer aus. Dabei wurde unter anderem Immulite 2000 mit Advantage (dort Standard) verglichen, wobei Immulite 2000 unter seinen vier Konkurrenten die geringste absolute Übereinstimmung aufwies. Das innerhalb der Studie errechnete URL für Immulite 2000 lag mit 30,8IU/ml niedriger als vom Hersteller angegeben. Dies stimmt nicht mit den Beobachtungen in dieser Arbeit überein, nach welchen das URL von Immulite 2000 höher anzusetzen wäre als vom Hersteller angegeben. (vgl. 4.12.8) Insgesamt kommen La´ulu et. al. zu der Einschätzung, dass die Assays nicht austauschbar verwendet werden können. (20)

Bohuslavizki et. al. haben speziell das Anti-TPO Assay für Immulite 2000 untersucht und konnten zeigen, dass Immulite 2000 eine absolute klinische Übereinstimmung mit mehreren anderen Assays von 87%-97% aufwies. (213)

In dieser Arbeit hat Immulite 2000 im Vergleich mit Cobas e411 eine absolute Übereinstimmung der klinischen Ergebnisse von 81,6%, im Vergleich mit IDS-iSYS von 74,2% erreicht. (4.12.8) Damit konnte die 95% absolute Übereinstimmung von Tozzilo et. al. (15) nicht erreicht werden. Ebenso konnten die guten Ergebnisse von Bohuslavizki et. al. (213) nicht repliziert werden. Im Vergleich mit den Ergebnissen aus der Studie von La'ulu et. al. (20) fallen die Ergebnisse dieser Arbeit für Immulite 2000 mit den vom Hersteller angegebenen Cut-Offs für beide Vergleiche besser als 62,7% aus. (4.12.8) Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen aufgrund der geringen klinischen Übereinstimmung und der damit verbundenen diagnostischen Unsicherheit nicht zu, dass Immulite 2000 mit den anderen Methoden austauschbar verwendet werden kann.

Die absolute Übereinstimmung zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS liegt mit 93,2% (4.12.8) nahe den von Tozzilo et. al. (15) erreichten 95% und übertrifft die Ergebnisse von La'ulu (20) deutlich. Innerhalb des Method-Sheets für das Anti-TPO Assay wird für IDS-iSYS im Vergleich mit einer handelsüblichen Methode eine absolute Übereinstimmung von 95,7% angegeben. (185) Dieses Ergebnis wird auch in dieser Studie nahezu erreicht. Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass IDS-iSYS und Cobas e411 diagnostisch austauschbar verwendet werden könnten. Weitere Untersuchungen werden benötigt um diese Annahme zu bestätigen.

Auffällig ist, dass nach der ROC-Analyse (3.4.13) sowohl IDS-iSYS als auch Immulite 2000 sehr gut TPO-Ak positive von TPO-Ak negativen Proben unterscheiden konnten, und dass es keinen signifikanten Unterschied diesbezüglich zwischen den beiden Methoden gab. (4.12.9) Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Immulite 2000 mit einem angepassten Cut-Off ebenfalls eine hohe diagnostische Sicherheit aufweisen sollte. Allerdings muss nach den Kriterien der NACB eine Referenz-Gruppe von 120 schilddrüsengesunden männlichen Probanden unter 30 Jahren, mit niedrigem TSH und unauffälligem Schilddrüsenultraschall, auf TPO-AK untersucht werden, um ein URL (Cut-Off) festzulegen. (178) Diese Kriterien werden schon durch die Zusammensetzung des Gesamtkollektivs gebrochen, in welchem sich 200 Schilddrüsenerkrankte wiederfinden (3.1.1). Innerhalb dieser Arbeit kann dementsprechend kein angepasster Cut-Off für die verschiedenen Methoden berechnet werden.

5.3 Limitationen der Studie

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine statistische Analyse von Messergebnissen mehrerer TPO-Ak Assays. Als Folge dieses Studiendesigns konnte auf präanalytische Einflussgrößen wie zum Beispiel die Kalibration der Messgeräte und die Vorbereitung der Proben kein Einfluss genommen werden. Da allerdings die Messungen von professionellen, langjährigen Mitarbeitern der jeweiligen Labore durchgeführt wurden, ist eine Messungengenauigkeit aufgrund dieser Faktoren als gering einzuschätzen.

Auch durch das Studiendesign bedingt war es nicht möglich, einen „eigenen“ Cut-Off für die jeweiligen Methoden zu bestimmen, da dies laut den Kriterien der NACB (178) anhand einer definierten Referenzpopulation erfolgen sollte. (2.6.3) Somit konnte der guten Trennschärfe von Immulite 2000 zwischen positiven und negativen Seren in der ROC-Analyse (3.4.13) keine Rechnung getragen werden.

Weitere potenzielle präanalytische Fehlerquellen betreffen unter anderem das Alter der Proben und die Ungewissheit, ob einzelne Proben im Laufe der Zeit mehrere Auftau-Gefrier-Zyklen durchlaufen haben.

Die Empfehlung von Roche Diagnostics bezüglich der Probenlagerung für das Anti-TPO-Assay für Cobas e411 sieht eine Lagerung bei -20°C für maximal einen Monat vor, bevor die einmalig eingefrorene Probe spätestens analysiert werden sollte. (181) Für IDS-iSYS als auch für Immulite 2000 wird keine Maximaldauer der Lagerung angegeben, allerdings sollte diese bei -20°C erfolgen. (185) (187) IDS weist ebenfalls darauf hin, dass keine mehrfachen Gefrier-Auftau-Zyklen erfolgen sollten. (185)

Im Rahmen einer Untersuchung zu den Eigenschaften der Anti-TPO Assays für Cobas e411 konnte gezeigt werden, dass schon nach kurzer Lagerung von nur 12 Tagen bei -20°C die TPO-Ak Konzentration signifikant steigt. Aus diesem Grund empfehlen Samsudin et. al. die Verarbeitung der Proben wie vom Hersteller vorgeschlagen durchzuführen. (214) Für Immulite 2000 und IDS-iSYS gibt es keine vergleichbaren Daten, weswegen nicht mit Sicherheit vorhersagbar ist, ob und in welchem Maße ähnliche Effekte zu erwarten sind. Somit könnten sich die Messergebnisse schon aufgrund unterschiedlicher Sensitivität der Methoden auf Effekte der Probenlagerung unterscheiden.

Männistö et. al. konnten 2007 zeigen, dass innerhalb der ersten 12 Jahre der Lagerung die TPO-Ak Konzentration stetig steigt, später der Konzentrationsanstieg jedoch deutlich steiler wird, weswegen sie empfehlen, TPO-Ak nur aus Proben zu bestimmen, welche nicht älter als 14 Jahre sind. Außerdem sprechen sie sich dafür aus, Vergleiche zwischen Proben unterschiedlichen Alters, bei denen eine Probe älter als 14 Jahre ist, mit Vorsicht auszuführen. (212)

Die Proben in dieser Arbeit waren zum Messzeitpunkt im Median 13 Jahre alt, wobei das maximale Alter einer Probe 18 Jahre betrug. Auch unterschied sich das Probenalter der Kollektive. Dabei waren die Proben des Basedow- Kollektivs mit im Median 11 Jahren die jünger als die des Hashimoto- und des Kontroll-Kollektivs mit im Median 14 Jahren. (3.1.1) Ob aufgrund des Alters der Proben ein systematischer Fehler zwischen den Assays entstand, ist unklar. Nach Männistö et. al. ist das Alter der Proben zudem als grenzwertig alt zu bewerten. (212)

Außerdem kann aufgrund des hier beschriebenen Alters der Proben nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Proben schon ein oder mehrere Auftau-Gefrier- Zyklen durchlaufen haben, was die TPO-Ak Messung dieser Proben verfälscht haben könnte.

Von den Herstellern sind für die verschiedenen Assays Stoffe wie zum Beispiel Biotin oder Rheumafaktoren angegeben, welche zu Assay-Interferenzen führen könnten. (181) (185) (187) Die verwendeten Proben wurden nicht auf das Vorhandensein dieser Stoffe hin untersucht, weswegen nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese in einzelnen Proben die Messergebnisse beeinflussen. Auch eine unterschiedliche Reaktion auf diese Stoffe zwischen den verschiedenen Methoden könnte eine mögliche Fehlerquelle darstellen.

Zudem sind die Messverfahren der Assays selbst heterogen. CLIA für IDS-iSYS, ECLIA für Cobas e411 und ein sequenzielles Festphasen chemilumineszenz-immunometrisches Assay für Immulite 2000. Auch unterscheiden sich die Methoden durch die verwendeten Antigene und Antikörper. (3.3.1, 3.3.2, 3.3.3) Gerade die von Methode zu Methode nicht standardisierte TPO-Antigen Aufreinigung wird von vielen Autoren als Hauptgrund für die hohe analytische Variabilität zwischen den Methoden gesehen. Da durch die unterschiedlichen Aufreinigungsprozesse die Epitope der TPO

nicht auf die exakt selbe Weise präsentiert werden, kann es dabei durch die Poliklonalität der TPO-AK des Patienten und die dabei vorliegende individuelle genetische Verteilung der TPO-AK in Bezug auf deren Zielepitope (2.3.2) zu unterschiedlichen Messergebnissen bei unterschiedlichen Methoden kommen. (15) (18) (19) (20) (21) (177) (180)

5.4 Fazit

Die quantitative Bestimmung der TPO-AK ist im Rahmen der Diagnostik bei Verdacht auf AITD ein wichtiger Bestandteil. (69) (167) Allerdings ist die analytische Variabilität der Methoden trotz Anstrengungen zu deren Harmonisierung immer noch hoch. (15) (19) (20) (177) (180) Auch die Methoden, die in dieser Arbeit miteinander verglichen wurden, weisen mit einen CV von 75,75% und 90,78% eine hohe analytische Variabilität auf. (4.8, 4.12.4) Aus diesem Grund ist die Kenntnis der Cut-Off Werte der einzelnen Methoden für die diagnostische Einordnung der Messwerte essenziell. Eine Umrechnung der Messergebnisse anhand des sich durch die unterschiedlichen Cut-Offs ergebenden Faktors ist allerdings nicht möglich. (4.10.1, 4.12.7)

Außerdem muss beachtet werden, dass die Methoden aufgrund dieser hohen analytischen Variabilität häufig nicht diagnostisch austauschbar sind. (15) (20) (22) Als diagnostisch austauschbar haben sich in dieser Arbeit Cobas e411 und IDS-iSYS gezeigt. Immulite 2000 kann jedoch nicht diagnostisch austauschbar mit den anderen Methoden verwendet werden. (4.12.8)

Auffällig ist, dass nach der ROC-Analyse (3.4.13) sowohl IDS-iSYS als auch Immulite 2000 sehr gut positive von negativen Proben unterscheiden konnten, und dass es keinen signifikanten Unterschied diesbezüglich zwischen den beiden Methoden gab. (4.12.9) Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Immulite 2000 mit einem angepassten Cut-Off eine höhere diagnostische Sicherheit aufweisen sollte. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, sollten Folgeuntersuchungen möglichst mit einer Referenzpopulation nach den Kriterien der NACB (178) erfolgen um herstellerunabhängige Cut-Off Werte zu ermitteln und damit die diagnostische Sicherheit zu erhöhen.

Zudem wäre es wünschenswert, wenn weitere Studien mit jüngeren Proben durchgeführt würden, um Effekte der Lagerung sowie damit einhergehende, mögliche systematische Verzerrungen zwischen den Assays zu minimieren.

Da ein wichtiger Grund für die analytische Variabilität vermutlich im technischen Prozess der Autoantigenaufreinigung liegt, wäre es zudem wünschenswert, wenn die biochemische Industrie Anstrengungen in Richtung einer Standardisierung dieses Prozesses unternehmen würde.

In der Literatur war das Anti-TPO Assay von IDS- iSYS nicht vorbeschrieben zu finden. Daher könnte diese Untersuchung zu dessen Etablierung beitragen, indem sie zeigt, dass es mit bekannten Methoden wie Cobas e411 in der Diagnostik von AITDs austauschbar verwendet werden kann. (4.12.8)

6 Zusammenfassung

Die Schilddrüse (SD) spielt als größte rein endokrine Drüse des Menschen eine wichtige Rolle im Hormonhaushalt. Dabei sind Störungen der Schilddrüsenfunktion neben Iodmangel häufig autoimmunen Ursprungs. Sie ist das am häufigsten von autoimmunen Erkrankungen betroffene Organ des Menschen, wobei die Hauptvertreter der autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (AITDs) die Hashimoto Thyreoiditis (HT) und der Morbus Basedow (englisch: Graves Disease) (GD) sind.

Thyreoperoxidase-Antikörper (TPO-Ak) lassen sich bei über 90% der HT-Patienten und bei 75% der GD-Patienten nachweisen. Sie richten sich gegen die Thyreoperoxidase (TPO), ein entscheidendes Enzym im Syntheseprozess der Schilddrüsenhormone (SDH), welches die Organifikation des Iodids katalysiert. Aufgrund ihres häufigen Vorkommens in erhöhten Konzentrationen bei Patienten mit AITD ist die Messung der TPO-Ak ein integraler Bestandteil deren Diagnostik und Verlaufskontrolle.

Die Methoden zur Bestimmung der TPO-Ak haben sich über die Jahrzehnte weiterentwickelt, weisen allerdings auch heute noch eine hohe analytische Variabilität auf, was ihre gegenseitige Austauschbarkeit teilweise verhindert und ihren diagnostischen Gebrauch somit erschwert. Mehrere Arbeitsgruppen weltweit arbeiten daran, diese Variabilität zu quantifizieren, mögliche Ursachen zu finden und Lösungsvorschläge anzubringen.

Diese Dissertation beinhaltet den Vergleich dreier Methoden zur Bestimmung der TPO-Ak. Im Rahmen der Hauptfragestellung wurden die Messergebnisse von Cobas e411 und IDS-iSYS auf ihre quantitative sowie qualitative Übereinstimmung hin untersucht. Alle Daten von Immulite 2000 sind der Dissertation von L. Schenk-Schlautmann entnommen und die sich daraus ergebenden Ergebnisse hier mit dem Schwerpunkt auf den qualitativen Merkmalen der Vollständigkeit wegen aufgeführt.

Die Bestimmung der TPO-Ak erfolgte an jeweils 250 Proben, wobei 100 Proben jeweils aus einem Kollektiv von an HT und GD-Erkrankten entstammen. 50 Proben gehören einem schilddrüsengesunden Kontrollkollektiv an. Diese Arbeit stellt eine statistische Auswertung, Interpretation und anschließende Einordnung der Messergebnisse dar.

Für den quantitativen Vergleich wurde statistisch hauptsächlich der Variationskoeffizient (CV) sowie das Bland Altman Plot herangezogen. Um die Assays

qualitativ zu vergleichen, wurden die absolute klinische Übereinstimmung, Sensitivität und Spezifität errechnet sowie eine ROC-Analyse erstellt.

Quantitativ zeigte sich zwischen Cobas e411 und IDS-iSYS ein CV von 87,5%, was zwar keiner guten Übereinstimmung entspricht, innerhalb der Literatur jedoch nicht ungewöhnlich zu sein scheint. Klinisch zeigte sich dieser Methodenvergleich mit einer absoluten Übereinstimmung von 93,2%, was auch verglichen mit Ergebnissen aus der Literatur einen guten Wert darstellt. Daraus folgt, dass Cobas e411 und IDS-iSYS - innerhalb dieser Studie - zur TPO-Ak Bestimmung austauschbar verwendet werden könnten. Um die Allgemeingültigkeit dieser Beobachtung zu bestätigen sind weitere Untersuchungen notwendig.

In der quantitativen Analyse zwischen IDS-iSYS und Immulite 2000 zeigte sich der CV mit 98,1% deutlich höher als im oben beschriebenen Vergleich, jedoch ebenfalls in Einklang mit Werten aus der Literatur. Jedoch lag die absolute Übereinstimmung mit 74,8% nicht ausreichend hoch, als dass die Methoden klinisch austauschbar einsetzbar wären. Dasselbe gilt für den klinischen Vergleich der Ergebnisse von Cobas e411 und Immulite 2000, welcher eine absolute Übereinstimmung von 81,6% zeigte.

Auffällig war, dass nach der ROC-Analyse sowohl IDS-iSYS als auch Immulite 2000 sehr gut TPO-Ak positive von TPO-Ak negativen Proben unterscheiden konnten, und dass es keinen signifikanten Unterschied diesbezüglich zwischen den beiden Methoden gab. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Immulite 2000 mit einem angepassten Cut-Off eine höhere diagnostische Sicherheit im Vergleich mit den beiden anderen Methoden aufweisen sollte als hier gezeigt werden konnte. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, sollten Folgeuntersuchungen möglichst mit einer Referenzpopulation nach den Kriterien der NACB erfolgen, um herstellerunabhängige Cut-Off Werte zu ermitteln und damit die diagnostische Sicherheit zu erhöhen.

Zudem würde es die analytische Sicherheit erhöhen, wenn bei zukünftigen Untersuchungen Proben mit kürzerer Lagerungsdauer genutzt würden, um potenzielle Lagerungseffekte sowie damit eventuell einhergehende systematische Verzerrungen zwischen den Methoden zu verhindern.

7 Literaturverzeichnis

1. L. Braverman DC, C. C. Capen. The Thyroid. A fundamental and clinical Text: Lippincott Williams&Wilki; 2012.
2. Braun D, Schweizer U. Thyroid Hormone Transport and Transporters. *Vitam Horm.* 2018;106:19-44.
3. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3035-43.
4. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev.* 2015;14(2):174-80.
5. Triggiani V, Tafaro E, Giagulli VA, Sabbà C, Resta F, Licchelli B, et al. Role of iodine, selenium and other micronutrients in thyroid function and disorders. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2009;9(3):277-94.
6. McLeod DS, Cooper DS. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine.* 2012;42(2):252-65.
7. Smith TJ, Hegedüs L. Graves' Disease. *N Engl J Med.* 2016;375(16):1552-65.
8. Ajjan RA, Weetman AP. The Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis: Further Developments in our Understanding. *Horm Metab Res.* 2015;47(10):702-10.
9. Ragusa F, Fallahi P, Elia G, Gonnella D, Paparo SR, Giusti C, et al. Hashimotos' thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2019;33(6):101367.
10. Godlewska M, Gawel D, Buckle AM, Banga JP. Thyroid Peroxidase Revisited - What's New? *Horm Metab Res.* 2019;51(12):765-9.
11. Mondal S, Raja K, Schweizer U, Mughes G. Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016;55(27):7606-30.
12. Di Jeso B, Arvan P. Thyroglobulin From Molecular and Cellular Biology to Clinical Endocrinology. *Endocr Rev.* 2016;37(1):2-36.
13. Prummel MF, Wiersinga WM. Thyroid peroxidase autoantibodies in euthyroid subjects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005;19(1):1-15.
14. Chiovato L, Bassi P, Santini F, Mammoli C, Lapi P, Carayon P, et al. Antibodies producing complement-mediated thyroid cytotoxicity in patients with atrophic or goitrous autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(6):1700-5.
15. D'Aurizio F, Tozzoli R, Villalta D, Pesce G, Bagnasco M. Immunoassay of thyroid peroxidase autoantibodies: diagnostic performance in automated third generation methods. A multicentre evaluation. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(3):415-21.
16. Soh SB, Aw TC. Laboratory Testing in Thyroid Conditions - Pitfalls and Clinical Utility. *Ann Lab Med.* 2019;39(1):3-14.
17. Tozzoli R, Villalta D, Bizzaro N, Tonutti E, Manoni F. [Laboratory diagnosis of autoimmune thyroid disease]. *Recenti Prog Med.* 2001;92(10):609-17.
18. Tozzoli R, D'Aurizio F, Ferrari A, Castello R, Metus P, Caruso B, et al. The upper reference limit for thyroid peroxidase autoantibodies is method-dependent: A collaborative study with biomedical industries. *Clin Chim Acta.* 2016;452:61-5.
19. Tozzoli R, Villalta D, Bizzaro N. Challenges in the Standardization of Autoantibody Testing: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017;53(1):68-77.

20. La'lulu SL, Slev PR, Roberts WL. Performance characteristics of 5 automated thyroglobulin autoantibody and thyroid peroxidase autoantibody assays. *Clin Chim Acta*. 2007;376(1-2):88-95.
21. Amouzegar A, Bakhtiyari M, Mansournia MA, Etemadi A, Mehran L, Tohidi M, et al. Sex- and Age-Specific Reference Values and Cutoff Points for TPOAb: Tehran Thyroid Study. *Thyroid*. 2016;26(3):458-65.
22. Bruce H.R. Wolffenbuttel HJCMW, Anneke C. Muller Kobold, Caroline Roozendaal, Melanie M. Klauw. Comparison of four commercially available thyroid peroxidase autoantibody and two thyroglobulin autoantibody assays. Preprint ed2022.
23. Marshall CF. Variations in the Form of the Thyroid Gland in Man. *J Anat Physiol*. 1895;29(Pt 2):234-9.
24. Viduetsky A, Herrejon CL. Sonographic Evaluation of Thyroid Size: A Review of Important Measurement Parameters. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*. 2019;35(3):206-10.
25. Wiersinga WM. *The Thyroid Gland, Anatomy and Physiologie* 2004. 453 p.
26. Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;458:6-15.
27. Williams GR. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(6):784-94.
28. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*. 2009;150(3):1091-6.
29. Dietrich JW, Landgrafe G, Fotiadou EH. TSH and Thyrotropic Agonists: Key Actors in Thyroid Homeostasis. *J Thyroid Res*. 2012;2012:351864.
30. Lechan RM, Fekete C. Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): mechanisms for the non-thyroidal illness syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2004;27(6 Suppl):105-19.
31. Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev*. 1992;13(3):596-611.
32. Horita A, Carino MA, Lai H. Pharmacology of thyrotropin-releasing hormone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1986;26:311-32.
33. Monga V, Meena CL, Kaur N, Jain R. Chemistry and biology of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its analogs. *Curr Med Chem*. 2008;15(26):2718-33.
34. Kleine B, Rossmanith WG. *Hormone und Hormonsystem: Lehrbuch der Endokrinologie*: Springer; 2010.
35. Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, Schally AV. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1969;37(4):705-10.
36. Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*: Springer Berlin Heidelberg; 2019.
37. Dardente H, Hazlerigg DG, Ebling FJ. Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:19.
38. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Uribe RM, Charli JL. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. *J Endocrinol*. 2015;226(2):T85-t100.
39. Shupnik MA, Ridgway EC, Chin WW. Molecular biology of thyrotropin. *Endocr Rev*. 1989;10(4):459-75.
40. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*: Springer-Verlag; 2014.
41. O'Cuinn G, O'Connor B, Elmore M. Degradation of thyrotropin-releasing hormone and luteinising hormone-releasing hormone by enzymes of brain tissue. *J Neurochem*. 1990;54(1):1-13.

42. Gershengorn MC, Osman R. Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol Rev.* 1996;76(1):175-91.
43. Purves HD, Adams DD. Thyroid-stimulating hormone. *Br Med Bull.* 1960;16:128-32.
44. Latif R, Morshed SA, Zaidi M, Davies TF. The thyroid-stimulating hormone receptor: impact of thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor antibodies on multimerization, cleavage, and signaling. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2009;38(2):319-41, viii.
45. Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev.* 1998;19(6):673-716.
46. Dumont JE. The action of thyrotropin on thyroid metabolism. *Vitam Horm.* 1971;29:287-412.
47. Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med.* 2002;43(9):1188-200.
48. De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1083-105.
49. Arriagada AA, Albornoz E, Opazo MC, Becerra A, Vidal G, Fardella C, et al. Excess iodide induces an acute inhibition of the sodium/iodide symporter in thyroid male rat cells by increasing reactive oxygen species. *Endocrinology.* 2015;156(4):1540-51.
50. Wolff J, Chaikoff IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem.* 1948;174(2):555-64.
51. Fong P. Apical iodide efflux in thyroid. *Vitam Horm.* 2015;98:33-62.
52. Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet.* 1999;21(4):440-3.
53. Gillam MP, Sidhaye AR, Lee EJ, Rutishauser J, Stephan CW, Kopp P. Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *J Biol Chem.* 2004;279(13):13004-10.
54. van den Hove MF, Croizet-Berger K, Jouret F, Guggino SE, Guggino WB, Devuyt O, et al. The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. *Endocrinology.* 2006;147(3):1287-96.
55. Iosco C, Cosentino C, Sirna L, Romano R, Cursano S, Mongia A, et al. Anoctamin 1 is apically expressed on thyroid follicular cells and contributes to ATP- and calcium-activated iodide efflux. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(3):966-80.
56. Degroot LJ, Niepomniszcze H. Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. *Metabolism.* 1977;26(6):665-718.
57. Lissitzky S. [Thyroglobulin and the biosynthesis of thyroid hormones]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1985;179(2):157-67.
58. Tice LW, Wollman SH. Ultrastructural localization of peroxidase on pseudopods and other structures of the typical thyroid epithelial cell. *Endocrinology.* 1974;94(6):1555-67.
59. Carvalho DP, Dupuy C. Role of the NADPH Oxidases DUOX and NOX4 in Thyroid Oxidative Stress. *Eur Thyroid J.* 2013;2(3):160-7.
60. Van Zyl A, Edelhofer H. The properties of thyroglobulin. XV. The function of the protein in the control of diiodotyrosine synthesis. *J Biol Chem.* 1967;242(10):2423-7.
61. Gavaret JM, Cahnmann HJ, Nunez J. Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. The mechanism of the coupling reaction. *J Biol Chem.* 1981;256(17):9167-73.

62. Lisi S, Pinchera A, McCluskey RT, Willnow TE, Refetoff S, Marcocci C, et al. Preferential megalin-mediated transcytosis of low-hormonogenic thyroglobulin: a control mechanism for thyroid hormone release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(25):14858-63.
63. Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, Ohayon R, Kaniewski J, Noël-Hudson MS, et al. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *Faseb j*. 2004;18(13):1574-6.
64. Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Philp NJ, Weiss RE, Refetoff S. Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *J Clin Invest*. 2010;120(9):3377-88.
65. Pilo A, Iervasi G, Vitek F, Ferdeghini M, Cazzuola F, Bianchi R. Thyroidal and peripheral production of 3,5,3'-triiodothyronine in humans by multicompartmental analysis. *Am J Physiol*. 1990;258(4 Pt 1):E715-26.
66. Janssen ST, Janssen OE. Directional thyroid hormone distribution via the blood stream to target sites. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;458:16-21.
67. Bartalena L, Bogazzi F, Brogioni S, Burelli A, Scarcello G, Martino E. Measurement of serum free thyroid hormone concentrations: an essential tool for the diagnosis of thyroid dysfunction. *Horm Res*. 1996;45(3-5):142-7.
68. Oppenheimer JH. Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones. *N Engl J Med*. 1968;278(21):1153-62.
69. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):391-7.
70. Tatsumi K, Takeoka K, Amino N. [Serum TSH measurement]. *Nihon Rinsho*. 1999;57(8):1806-9.
71. Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev*. 2001;22(4):451-76.
72. Blondeau JP, Beslin A, Chantoux F, Francon J. Triiodothyronine is a high-affinity inhibitor of amino acid transport system L1 in cultured astrocytes. *J Neurochem*. 1993;60(4):1407-13.
73. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem*. 2003;278(41):40128-35.
74. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*. 2002;23(1):38-89.
75. Bianco AC, da Conceição RR. The Deiodinase Trio and Thyroid Hormone Signaling. *Methods Mol Biol*. 2018;1801:67-83.
76. Pascual A, Aranda A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(7):3908-16.
77. Köhrle J. Thyroid hormone deiodinases--a selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone action. *Acta Med Austriaca*. 1996;23(1-2):17-30.
78. Tedeschi L, Vassalle C, Iervasi G, Sabatino L. Main Factors Involved in Thyroid Hormone Action. *Molecules*. 2021;26(23).
79. Moreno M, Berry MJ, Horst C, Thoma R, Goglia F, Harney JW, et al. Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase. *FEBS Lett*. 1994;344(2-3):143-6.
80. Schweizer U, Weitzel JM, Schomburg L. Think globally: act locally. New insights into the local regulation of thyroid hormone availability challenge long accepted dogmas. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;289(1-2):1-9.

81. Anyetei-Anum CS, Roggero VR, Allison LA. Thyroid hormone receptor localization in target tissues. *J Endocrinol.* 2018;237(1):R19-r34.
82. Ortiga-Carvalho TM, Sidhaye AR, Wondisford FE. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(10):582-91.
83. Bunn CF, Neidig JA, Freidinger KE, Stankiewicz TA, Weaver BS, McGrew J, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of the thyroid hormone receptor alpha. *Mol Endocrinol.* 2001;15(4):512-33.
84. Kolodkin AN, Bruggeman FJ, Plant N, Moné MJ, Bakker BM, Campbell MJ, et al. Design principles of nuclear receptor signaling: how complex networking improves signal transduction. *Mol Syst Biol.* 2010;6:446.
85. Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone and the brain: Mechanisms of action in development and role in protection and promotion of recovery after brain injury. *Pharmacol Ther.* 2018;186:176-85.
86. Bernal J. Thyroid hormone regulated genes in cerebral cortex development. *J Endocrinol.* 2017;232(2):R83-r97.
87. Malik R, Mellor N, Selden C, Hodgson H. Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. *Hepatology.* 2003;37(1):79-86.
88. Verga Falzacappa C, Panacchia L, Bucci B, Stigliano A, Cavallo MG, Brunetti E, et al. 3,5,3'-triiodothyronine (T3) is a survival factor for pancreatic beta-cells undergoing apoptosis. *J Cell Physiol.* 2006;206(2):309-21.
89. Pustorino S, Foti M, Calipari G, Pustorino E, Ferraro R, Guerrisi O, et al. [Thyroid-intestinal motility interactions summary]. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2004;50(4):305-15.
90. Ritter MJ, Amano I, Hollenberg AN. Thyroid Hormone Signaling and the Liver. *Hepatology.* 2020;72(2):742-52.
91. Simonides WS, van Hardeveld C. Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. *Thyroid.* 2008;18(2):205-16.
92. Forrest D, Erway LC, Ng L, Altschuler R, Curran T. Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function. *Nat Genet.* 1996;13(3):354-7.
93. Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev.* 2005;26(5):704-28.
94. Ferrand M, Le Fourn V, Franc JL. Increasing diversity of human thyroperoxidase generated by alternative splicing. Characterized by molecular cloning of new transcripts with single- and multispliced mRNAs. *J Biol Chem.* 2003;278(6):3793-800.
95. Godlewska M, Banga PJ. Thyroid peroxidase as a dual active site enzyme: Focus on biosynthesis, hormonogenesis and thyroid disorders of autoimmunity and cancer. *Biochimie.* 2019;160:34-45.
96. Magnusson RP, Chazenbalk GD, Gestautas J, Seto P, Filetti S, DeGroot LJ, et al. Molecular cloning of the complementary deoxyribonucleic acid for human thyroid peroxidase. *Mol Endocrinol.* 1987;1(11):856-61.
97. McLachlan SM, Rapoport B. Thyroid peroxidase as an autoantigen. *Thyroid.* 2007;17(10):939-48.
98. Zeng J, Fenna RE. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol.* 1992;226(1):185-207.
99. Williams DE, Le SN, Hoke DE, Chandler PG, Gora M, Godlewska M, et al. Structural Studies of Thyroid Peroxidase Show the Monomer Interacting With Autoantibodies in Thyroid Autoimmune Disease. *Endocrinology.* 2020;161(2).

100. Godlewska M, Góra M, Buckle AM, Porebski BT, Kemp EH, Sutton BJ, et al. A redundant role of human thyroid peroxidase propeptide for cellular, enzymatic, and immunological activity. *Thyroid*. 2014;24(2):371-82.
101. McDonald DO, Pearce SH. Thyroid peroxidase forms thionamide-sensitive homodimers: relevance for immunomodulation of thyroid autoimmunity. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(10):971-80.
102. Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, Franc JL. Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H₂O₂ generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding. *J Biol Chem*. 1999;274(15):10533-8.
103. Le SN, Porebski BT, McCoey J, Fodor J, Riley B, Godlewska M, et al. Modelling of Thyroid Peroxidase Reveals Insights into Its Enzyme Function and Autoantigenicity. *PLoS One*. 2015;10(12):e0142615.
104. Nishikawa T, Costante G, Prummel MF, McLachlan SM, Rapoport B. Recombinant thyroid peroxidase autoantibodies can be used for epitopic "fingerprinting" of thyroid peroxidase autoantibodies in the sera of individual patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(4):944-9.
105. Tomer Y, Huber A. The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *J Autoimmun*. 2009;32(3-4):231-9.
106. McLachlan SM, Rapoport B. Breaking tolerance to thyroid antigens: changing concepts in thyroid autoimmunity. *Endocr Rev*. 2014;35(1):59-105.
107. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*. 1987;49(2):273-80.
108. Rose NR, Bonita R, Burek CL. Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmun Rev*. 2002;1(1-2):97-103.
109. Oppenheim Y, Ban Y, Tomer Y. Interferon induced Autoimmune Thyroid Disease (AITD): a model for human autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2004;3(5):388-93.
110. Valtonen VV, Ruutu P, Varis K, Ranki M, Malkamäki M, Mäkelä PH. Serological evidence for the role of bacterial infections in the pathogenesis of thyroid diseases. *Acta Med Scand*. 1986;219(1):105-11.
111. Tomer Y, Villanueva R. Hepatitis C and thyroid autoimmunity: is there a link? *Am J Med*. 2004;117(1):60-1.
112. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, Ferrari SM, Ghinoi A, Rotondi M, et al. Thyroid disorders in chronic hepatitis C virus infection. *Thyroid*. 2006;16(6):563-72.
113. Vestergaard P. Smoking and thyroid disorders--a meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2002;146(2):153-61.
114. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, Hegedüs L. Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):930-4.
115. Mikoś H, Mikoś M, Obara-Moszyńska M, Niedziela M. The role of the immune system and cytokines involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD). *Endokrynol Pol*. 2014;65(2):150-5.
116. 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.
117. Sinclair D. Analytical aspects of thyroid antibodies estimation. *Autoimmunity*. 2008;41(1):46-54.
118. Latrofa F, Pichurin P, Guo J, Rapoport B, McLachlan SM. Thyroglobulin-thyroperoxidase autoantibodies are polyreactive, not bispecific: analysis using human monoclonal autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(1):371-8.

119. Li W, Fan G, Chen L, Zhang R, Zhang K, Sun Y, et al. A new type of natural bispecific antibody with potential protective effect in Hashimoto thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(9):E1602-9.
120. Okamoto Y, Hamada N, Saito H, Ohno M, Noh J, Ito K, et al. Thyroid peroxidase activity-inhibiting immunoglobulins in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;68(4):730-4.
121. Rodien P, Madec AM, Ruf J, Rajas F, Bornet H, Carayon P, et al. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in autoimmune thyroid disease: relationship to antithyroperoxidase antibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(7):2595-600.
122. 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.
123. Mariotti S, Sansoni P, Barbesino G, Caturegli P, Monti D, Cossarizza A, et al. Thyroid and other organ-specific autoantibodies in healthy centenarians. *Lancet.* 1992;339(8808):1506-8.
124. Amouzegar A, Ghaemmaghami Z, Beigy M, Gharibzadeh S, Mehran L, Tohidi M, et al. Natural Course of Euthyroidism and Clues for Early Diagnosis of Thyroid Dysfunction: Tehran Thyroid Study. *Thyroid.* 2017;27(5):616-25.
125. 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.
126. Medici M, Porcu E, Pistis G, Teumer A, Brown SJ, Jensen RA, et al. Identification of novel genetic Loci associated with thyroid peroxidase antibodies and clinical thyroid disease. *PLoS Genet.* 2014;10(2):e1004123.
127. 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.
128. 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 Wickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1995;43(1):55-68.
129. Zöphel K, Saller B, Wunderlich G, Grüning T, Koch R, Wilde J, et al. Autoantibodies to thyroperoxidase (TPOAb) in a large population of euthyroid subjects: implications for the definition of TPOAb reference intervals. *Clin Lab.* 2003;49(11-12):591-600.
130. Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchère E, Coutinho A, et al. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods.* 1998;216(1-2):117-37.
131. Vissenberg R, Manders VD, Mastenbroek S, Fliers E, Afink GB, Ris-Stalpers C, et al. Pathophysiological aspects of thyroid hormone disorders/thyroid peroxidase autoantibodies and reproduction. *Hum Reprod Update.* 2015;21(3):378-87.
132. Bliddal S, Feldt-Rasmussen U, Rasmussen Å K, Kolte AM, Hilsted LM, Christiansen OB, et al. Thyroid Peroxidase Antibodies and Prospective Live Birth Rate: A Cohort Study of Women with Recurrent Pregnancy Loss. *Thyroid.* 2019;29(10):1465-74.
133. Alexander EK, Pearce EN, Brent GA, Brown RS, Chen H, Dosiou C, et al. 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease During Pregnancy and the Postpartum. *Thyroid.* 2017;27(3):315-89.
134. Shimizu Y, Kawashiri SY, Noguchi Y, Nagata Y, Maeda T, Hayashida N. Normal range of anti-thyroid peroxidase antibody (TPO-Ab) and atherosclerosis among eu-

- thyroid population: A cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(38):e22214.
135. Liu J, Duan Y, Fu J, Wang G. Association Between Thyroid Hormones, Thyroid Antibodies, and Cardiometabolic Factors in Non-Obese Individuals With Normal Thyroid Function. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:130.
136. Muller I, Barrett-Lee PJ. The antigenic link between thyroid autoimmunity and breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2020;64:122-34.
137. Matthias Prager PR. Pschyrembel online 2016 [Available from: <https://www.pschyrembel.de/Euthyreose/K07BF/doc/>].
138. Kravets I. Hyperthyroidism: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2016;93(5):363-70.
139. Almandoz JP, Gharib H. Hypothyroidism: etiology, diagnosis, and management. *Med Clin North Am*. 2012;96(2):203-21.
140. Wilson SA, Stem LA, Bruehlman RD. Hypothyroidism: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2021;103(10):605-13.
141. McGrogan A, Seaman HE, Wright JW, de Vries CS. The incidence of autoimmune thyroid disease: a systematic review of the literature. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69(5):687-96.
142. Hashimoto H. Zur Kenntniss der lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse (Struma). *Archiv für klinische Chirurgie*. 1912;97:219.
143. Hiromatsu Y, Satoh H, Amino N. Hashimoto's thyroiditis: history and future outlook. *Hormones (Athens)*. 2013;12(1):12-8.
144. Vanderpump MP. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull*. 2011;99:39-51.
145. Hu Y, Zhang L, Chen H, Liu X, Zheng X, Shi H, et al. Analysis of Regulatory T Cell Subsets and Their Expression of Helios and PD-1 in Patients with Hashimoto Thyroiditis. *Int J Endocrinol*. 2019;2019:5368473.
146. Weetman AP. An update on the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Endocrinol Invest*. 2021;44(5):883-90.
147. Baker JR, Jr. Dying (apoptosing?) for a consensus on the Fas death pathway in the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(8):2593-5.
148. Kaczmarek E, Lacka K, Jarmolowska-Jurczyszyn D, Sidor A, Majewski P. Changes of B and T lymphocytes and selected apoptosis markers in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Pathol*. 2011;64(7):626-30.
149. Zaletel K, Gaberšček S. Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease. *Curr Genomics*. 2011;12(8):576-88.
150. Ralli M, Angeletti D, Fiore M, D'Aguanno V, Lambiase A, Artico M, et al. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation. *Autoimmun Rev*. 2020;19(10):102649.
151. Katz SM, Vickery AL, Jr. The fibrous variant of Hashimoto's thyroiditis. *Hum Pathol*. 1974;5(2):161-70.
152. Li Y, Zhou G, Ozaki T, Nishihara E, Matsuzuka F, Bai Y, et al. Distinct histopathological features of Hashimoto's thyroiditis with respect to IgG4-related disease. *Mod Pathol*. 2012;25(8):1086-97.
153. Lee JH, Anzai Y. Imaging of thyroid and parathyroid glands. *Semin Roentgenol*. 2013;48(1):87-104.
154. Topliss DJ. Clinical Update in Aspects of the Management of Autoimmune Thyroid Diseases. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2016;31(4):493-9.

155. Watanabe T, Maruyama M, Ito T, Fujinaga Y, Ozaki Y, Maruyama M, et al. Clinical features of a new disease concept, IgG4-related thyroiditis. *Scand J Rheumatol*. 2013;42(4):325-30.
156. Churilov LP, Sobolevskaia PA, Stroevev YI. Thyroid gland and brain: Enigma of Hashimoto's encephalopathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2019;33(6):101364.
157. Feldt-Rasmussen U. Hashimoto's thyroiditis as a risk factor for thyroid cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2020;27(5):364-71.
158. Min Y, Wang X, Chen H, Yin G. The exploration of Hashimoto's Thyroiditis related miscarriage for better treatment modalities. *Int J Med Sci*. 2020;17(16):2402-15.
159. Weetman AP. Grave's disease 1835-2002. *Horm Res*. 2003;59 Suppl 1:114-8.
160. Antonelli A, Fallahi P, Elia G, Ragusa F, Paparo SR, Ruffilli I, et al. Graves' disease: Clinical manifestations, immune pathogenesis (cytokines and chemokines) and therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2020;34(1):101388.
161. Boelaert K, Torlinska B, Holder RL, Franklyn JA. Older subjects with hyperthyroidism present with a paucity of symptoms and signs: a large cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2715-26.
162. Bahn RS. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med*. 2010;362(8):726-38.
163. Prummel MF, Wiersinga WM. Smoking and risk of Graves' disease. *Jama*. 1993;269(4):479-82.
164. Kotwal A, Stan M. Thyrotropin Receptor Antibodies-An Overview. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 2018;34(4S Suppl 1):S20-s7.
165. Fatourech V. Thyroid dermopathy and acropachy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(4):553-65.
166. Kahaly GJ. Management of Graves Thyroidal and Extrathyroidal Disease: An Update. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(12):3704-20.
167. Goichot B, Leenhardt L, Massart C, Raverot V, Tramalloni J, Iraqi H. Diagnostic procedure in suspected Graves' disease. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2018;79(6):608-17.
168. Schiemann U, Gellner R, Riemann B, Schierbaum G, Menzel J, Domschke W, et al. Standardized grey scale ultrasonography in Graves' disease: correlation to autoimmune activity. *Eur J Endocrinol*. 1999;141(4):332-6.
169. Ralls PW, Mayekawa DS, Lee KP, Colletti PM, Radin DR, Boswell WD, et al. Color-flow Doppler sonography in Graves disease: "thyroid inferno". *AJR Am J Roentgenol*. 1988;150(4):781-4.
170. Nguyen CT, Mestman JH. Postpartum Thyroiditis. *Clin Obstet Gynecol*. 2019;62(2):359-64.
171. Naji Rad S, Deluxe L. Postpartum Thyroiditis. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
172. Mandac JC, Chaudhry S, Sherman KE, Tomer Y. The clinical and physiological spectrum of interferon-alpha induced thyroiditis: toward a new classification. *Hepatology*. 2006;43(4):661-72.
173. Kahaly GJ, Frommer L. Polyglandular autoimmune syndromes. *J Endocrinol Invest*. 2018;41(1):91-8.
174. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Pradella M, Manoni F, Vilalta D, et al. Immunoassay of anti-thyroid autoantibodies: high analytical variability in second generation methods. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(6):568-73.
175. Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Autoimmune diagnostics: the technology, the strategy and the clinical governance. *Immunol Res*. 2015;61(1-2):126-34.

176. Tozzoli R, D'Aurizio F, Villalta D, Bizzaro N. Automation, consolidation, and integration in autoimmune diagnostics. *Auto Immun Highlights*. 2015;6(1-2):1-6.
177. D'Aurizio F, Metus P, Polizzi Anselmo A, Villalta D, Ferrari A, Castello R, et al. Establishment of the upper reference limit for thyroid peroxidase autoantibodies according to the guidelines proposed by the National Academy of Clinical Biochemistry: comparison of five different automated methods. *Auto Immun Highlights*. 2015;6(3):31-7.
178. 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.
179. Jensen EA, Petersen PH, Blaabjerg O, Hansen PS, Brix TH, Hegedüs L. Establishment of reference distributions and decision values for thyroid antibodies against thyroid peroxidase (TPOAb), thyroglobulin (TgAb) and the thyrotropin receptor (TRAb). *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(8):991-8.
180. Nielsen CH, Brix TH, Gardas A, Banga JP, Hegedüs L. Epitope recognition patterns of thyroid peroxidase autoantibodies in healthy individuals and patients with Hashimoto's thyroiditis*. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69(4):664-8.
181. GmbH RD. Elecsys Anti-TPO, Method Sheet. 2018.
182. GmbH RD. Reference Intervals for Children and Adults. 2009.
183. Roche. Cobas 4000 analyzer series [Available from: <https://www.roche.de/diagnostik/produkte-loesungen/systeme/cobas-4000-analyzer-series>].
184. Immunodiagnosticsystems. Anti-TPO [Available from: <https://www.idsplc.com/products/anti-tpo/>].
185. GmbH IIS. IDS Anti-TPO Method sheet. 2022.
186. IDS. IDS-isys [Available from: <https://www.idsplc.com/idsisysystem/>].
187. Products SHD. Immulite 2000 - Anti-TPO Ab.
188. Healthineers S. Immulite 2000 - Immunoassay Systems [Available from: <https://www.siemens-healthineers.com/nl-be/immunoassay/systems/immulite-2000-immunoassay-ystem>].
189. Held L, Rufibach K, Seifert B. *Medizinische Statistik: Konzepte, Methoden, Anwendungen*: Pearson Studium; 2013.
190. Weiß C. *Basiswissen Medizinische Statistik*: Springer Berlin Heidelberg; 2019.
191. Kim TK, Park JH. More about the basic assumptions of t-test: normality and sample size. *Korean J Anesthesiol*. 2019;72(4):331-5.
192. Hazra A, Gogtay N. Biostatistics Series Module 3: Comparing Groups: Numerical Variables. *Indian J Dermatol*. 2016;61(3):251-60.
193. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1(8476):307-10.
194. Bland JM, Altman DG. Comparing two methods of clinical measurement: a personal history. *Int J Epidemiol*. 1995;24 Suppl 1:S7-14.
195. Sheskin DJ. Parametric Versus Nonparametric Tests. In: Lovric M, editor. *International Encyclopedia of Statistical Science*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 1051-2.
196. Hollander M, Wolfe DA, Chicken E. *Nonparametric Statistical Methods*: Wiley; 2013.
197. Hyslop NP, White WH. Estimating precision using duplicate measurements. *J Air Waste Manag Assoc*. 2009;59(9):1032-9.
198. Bland M. How should I calculate a within-subject coefficient of variation? [Available from: <https://www-users.york.ac.uk/~mb55/meas/cv.htm>].

199. Zar JH. Biostatistical Analysis: Prentice Hall; 1996.
200. Euser AM, Dekker FW, le Cessie S. A practical approach to Bland-Altman plots and variation coefficients for log transformed variables. *J Clin Epidemiol.* 2008;61(10):978-82.
201. Lin LI. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics.* 1989;45(1):255-68.
202. Chinchilli VM, Martel JK, Kumanyika S, Lloyd T. A weighted concordance correlation coefficient for repeated measurement designs. *Biometrics.* 1996;52(1):341-53.
203. Atkinson G, Nevill A. Comment on the Use of Concordance Correlation to Assess the Agreement between Two Variables. *Biometrics.* 1997;53(2):775-7.
204. Koch R, Spoerl E. Statistische Verfahren zum Vergleich zweier Messmethoden und zur Kalibrierung: Konkordanz-, Korrelations- und Regressionsanalyse am Beispiel der Augeninnendruckmessung. *Klinische Monatsblätter Für Augenheilkunde - KLIN MONATSBL AUGENHEILK.* 2007;224:52-7.
205. McBride G. A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's concordance correlation coefficient. NIWA client report: HAM2005-062. 2005;45:307-10.
206. Hedderich J, Sachs L. *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R*: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
207. Leonhart DR. Fishers Z-Transformation 2020 [Available from: <https://dorsch.hogrefe.com/stichwort/fishers-z-transformation>].
208. Grouven U, Bender R, Ziegler A, Lange S. Vergleich von Messmethoden. *Deutsche Medizinische Wochenschrift - DEUT MED WOCHENSCHR.* 2007;132.
209. Buderer NM. Statistical methodology: I. Incorporating the prevalence of disease into the sample size calculation for sensitivity and specificity. *Acad Emerg Med.* 1996;3(9):895-900.
210. Nahm FS. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. *Korean J Anesthesiol.* 2022;75(1):25-36.
211. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*: Taylor & Francis; 2013.
212. Männistö T, Surcel HM, Bloigu A, Ruokonen A, Hartikainen AL, Järvelin MR, et al. The effect of freezing, thawing, and short- and long-term storage on serum thyrotropin, thyroid hormones, and thyroid autoantibodies: implications for analyzing samples stored in serum banks. *Clin Chem.* 2007;53(11):1986-7.
213. Bohuslavizki KH, vom Baur E, Weger B, Krebs C, Saller B, Wetlitzky O, et al. Evaluation of chemiluminescence immunoassays for detecting thyroglobulin (Tg) and thyroid peroxidase (TPO) autoantibodies using the IMMULITE 2000 system. *Clin Lab.* 2000;46(1-2):23-31.
214. Samsudin I, Thambiah S, P H, B N, Mohd. Hussain B. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF ANTI- THYROID PEROXIDASE AND ANTI- THYROGLOBULIN ASSAYS ON ROCHE COBAS E411 IMMUNOASSAY SYSTEM. *International Journal of Public Health and Clinical Sciences.* 2014;1:2289-7577.

8 Danksagung

Vielen Dank an Professor _____ und sein Team des molekularen Schilddrüsenlabors für die Überlassung des Themas und die stetige Ansprechbarkeit und Betreuung.

Bei Fragen zur Statistik war Herr _____ immer schnell erreichbar und konnte mit seiner Fachkenntnis und ruhigen Art alle meine Anliegen schnell lösen. Vielen Dank für die angenehme Zusammenarbeit.

Ein riesiger Dank geht auch an meinen Eltern, ohne die dieses Unterfangen weder zeitlich noch finanziell noch in Hinblick auf die Motivation möglich gewesen wäre! Außerdem möchte ich mich für die Selbstverständlichkeit bedanken, die all diesen Aspekten immer grundlegend war und mich nachhaltig beeindruckt und glücklich macht.

Auch _____, die mit mir durch die guten sowie die anstrengenden Phasen dieser Arbeit gegangen ist kommt ein riesiges Dankeschön zu! Ihre ermutigenden Worte, Erinnerungen an vergessene Teetassen, stundenlanges Korrekturlesen und klugen Fragen haben das Schreiben ungemein erleichtert und diese Arbeit geprägt.

Vielen Dank auch an _____ und _____, die mich ermutigt haben die Arbeit anzugehen und diese mit guten Tipps und Fachkenntnis bereichert haben.

Außerdem geht ein großes Dankeschön an die weitere Familie und alle Freunde, die mich in dieser intensiven Zeit unterstützt und motiviert haben mich immer wieder auf die Arbeit zu fokussieren.

9 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Paul Jakob Ruf
Geburtstag und Ort: 17.11.1992, Emmendingen

Schulbildung

2002- 2012 Abitur am Goethe Gymnasium Emmendingen
2010 Jan- Jul Auslandsaufenthalt in Paris



Beruflicher Werdegang

2012 Okt- 2015 Sept Ausbildung zum Physiotherapeuten an der GSSW Emmendingen
2016 Jun Beginn der Ausbildung zum Osteopathen am AVT College Nagold
2017 Apr Beginn Humanmedizin- Studium an der JGU Mainz
2019 Mär 1. Staatsexamen Humanmedizin
2022 Apr 2. Staatsexamen Humanmedizin
2023 Nov 3. Staatsexamen Humanmedizin + Abschluss des Studiums
2024 Mär Abschluss der Osteopathieausbildung

Famulaturen

2019 Aug Orthopädie- Vulpius Klinik Bad-Rappenau
2020 Mär Ambulanz für Endokrinologie Universitätsklinikum Mainz
2021 Mär Allgemeinmedizin- Hausarztpraxis in Freiburg
2021 Aug Kardiologie- Kempten im Allgäu

Praktisches Jahr

2022 Nov- 2023 Mär Innere Medizin am GPR Rüsselsheim
2023 Mär- Jul Anästhesiologie und Intensivmedizin am KKH Wolgast
2023 Jul- Okt Chirurgie am GPR Rüsselsheim

Promotion

Nov 2022	Beginn der Promotionsarbeit in der Endokrinologie der JGU Mainz
Sep 2025	Abschluss der Promotion an der JGU Mainz

Berufliche Erfahrung

2015 Nov- 2016 Mai	Anstellung als Physiotherapeut bei Physio Kuhn in Stuttgart
2017 Feb- April	Anstellung als Physiotherapeut bei Physio Tuttas in Stuttgart
2018 Okt- 2019 Jan	Hiwi im Anatomischen Institut der JGU Mainz
2024 Mai- laufend	Assistenzarzt für Orthopädie und Unfallchirurgie am Malteser Waldkrankenhaus Erlangen

Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache), Englisch + Französisch: sehr gute Kenntnisse in Sprache + Schrift

Bamberg, den 03.10.2025

Paul Jakob Ruf