

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Kraft

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Aus der Medizinischen Tierklinik,
Lehrstuhl für Innere Krankheiten,
Dermatologie und Neurologie der kleinen
Haustiere sowie für klinische Labordiagnostik
der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann
Angefertigt unter der Leitung von Univ.- Prof. Dr. Wilfried Kraft

**Validierung und Vergleich zweier
Bestimmungsmethoden von
Schilddrüsenhormonen, Kortisol und Insulin
der Katze**

Chemitumineszenz- und Elektrochemilumineszenz-Technik

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität, München

Denise Rudolph,
Gräfelfing

München, 2004

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
Einleitung	6
Literatur	7
1. Hormone	7
1.1. Schilddrüsenhormone	7
1.2. Kortisol	9
1.3. Insulin	10
2. Pathophysiologie der Erkrankung und diagnostischer Nutzen	11
3. Immunologische Nachweisverfahren	21
3.1. Radioimmunoassay (RIA)	23
3.2. Enzymimmunoassay (EIA)	25
3.3. Lumineszenzimmunoassay	27
3.4. Fluoreszenzimmunoassay (FIA)	27
3.5. Chemilumineszenzimmunoassay	29
4. Parallelen in Diagnostik und Therapie in der Humanmedizin	31
5. Vergleiche mit anderen Studien und anderen Messverfahren	33
Eigene Untersuchungen	40
6. Material und Methodik	40
6.1. Material	40
6.2. Methodik	46
7. Referenzwertbestimmung	55
Ergebnisse	56
8. Validierung des Beckman-Coulter Access®	56
8.1. Prüfung der Präzision	56
8.2. Prüfung der Richtigkeit	63
8.3. Prüfung auf Spezifität	68
9. Validierung des Elecsys® 1010	73
9.1. Prüfung der Präzision	73
9.2. Prüfung der Richtigkeit	80
9.3. Prüfung auf Spezifität	84

10.	Referenzbereiche für T3, fT3, T4, fT4 und Kortisol bei der Katze	90
	Diskussion	91
11.	Analytische Zuverlässigkeit des Beckman-Coulter Access®	92
12.	Analytische Zuverlässigkeit des Elecsys® 1010	99
13.	Vergleich Beckman-Coulter Access® mit dem Elecsys® 1010	107
14.	Bestimmung der Referenzwerte	113
	Zusammenfassung	114
	Summary	116
	Literaturverzeichnis	118
	Danksagung	127
	Lebenslauf	128

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ACT-Test	ACTH-Stimulationstest
ANS	8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure
CLIA	Chemilumineszenzimmunoassay
CLEIA	Chemilumineszenzenzymimmunoassay
CRH	Kortikoliberin
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECLIA	Elektrochemilumineszenzimmunoassay
ELISA	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
FIA	Fluoreszenzimmunoassay
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FT3	Freies Trijodthyronin
FT4	Freies Thyroxin
HDDS	High Dose Dexamethason Suppresion
IRMA	Immunradiometrischer Assay
LDDS	Low Dose Dexamethason Suppresion
NTI	Non-Thyroidal-Illness
PH	pondus Hydrogenii
RIA	Radioimmunoassay
RT3	reverses Trijodthyronin
Ru(bpy) ₃ ²⁺	Ruthenium(II)tris(bipyridyl)
SPALT	Solide-Phase-Antigen-Lumineszenzimmunoassay
TPA	Tripropylamin, ProCell
TSH	Thyreоidea stimulierendes Hormon
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
VK	Variationskoeffizient
WHO	World Health Organization

Einleitung

Das endokrine System der Säugetiere ermöglicht mit seinen Hormonen die Kommunikation des Nervensystems und des Immunsystems mit den Organen und Zellen. Der Hypothalamus ist als Vermittler zwischen den nervalen Impulsen und den endokrinen Signalen tätig.

Hierbei handelt es sich um lebenswichtige Prozesse im Körper wie das Wachstum, die Reproduktion, die Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes und die Energieversorgung. Der Körper muss in der Lage sein, schnell auf veränderte Bedingungen des inneren oder äußeren Milieus zu reagieren und sich adäquat auf die Situation einzustellen. Demzufolge können Ausfall oder Überproduktion von Hormonen nicht nur zu schweren Erkrankungen, sondern auch zu lebensbedrohlichen Zuständen des Körpers führen.

Für die klinische Diagnostik ist die Messung von Hormonkonzentrationen im Blut sehr bedeutend. Diese Werte bleiben im lebenden Organismus nicht bei einem stabilen Basalwert, sie unterliegen einer Sekretionsdynamik. Aus diesem Grund werden in der Klinik die korrekten Funktionen dieser Hormon-Produktionsstätten mit Hilfe eines sogenannten Funktionstestes überprüft.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse ist es notwendig, Methoden dafür zu entwickeln, welche die oft sehr geringen Hormonkonzentrationen im Blut mit möglichst hoher Genauigkeit nachweisen. Die ersten Nachweisverfahren waren biologische Methoden, z. B. mit Hilfe von Versuchstieren, später traten an die Stelle der Tiere Zellkulturen. Heute basieren die Hormontests weitgehend auf immunologischen Methoden. Der quantitative Nachweis der Hormone erfolgt heute in der Regel mit Hilfe von hochspezifischen Antigen-Antikörperreaktionen.

In der vorliegenden Arbeit sollen zwei humanmedizinische labordiagnostische Messgeräte, die mit dem Chemilumineszenz- bzw. Elektrochemilumineszenz-Verfahren arbeiten, zur Bestimmung der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3), Thyroxin (T4), freies Trijodthyronin (fT3) und freies Thyroxin (fT4) sowie Kortisol und Insulin bei der Katze validiert werden. Anschließend werden die Geräte hinsichtlich ihrer veterinärmedizinischen Einsetzbarkeit und ihrer Bedienungsfreundlichkeit miteinander verglichen und die Referenzwerte bei der Katze ermittelt.

Literatur

1. Hormone

Hormone sind das Bindeglied im Organismus zwischen dem zentralen Nervensystem (ZNS) und den Organen und Geweben. Sie müssen in der Lage sein, den Organismus auch innerhalb kürzester Zeit auf veränderte innere und äußere Bedingungen einzustellen. Dabei handelt es sich sowohl um langfristig (z.B. Alterungsprozess, Sexualzyklus) als auch kurzfristig schwankende Rhythmen, wie der zirkadiane Rhythmus.

1.1. Schilddrüsenhormone

In der Schilddrüse werden die Hormone Trijodthyronin (T3) und Tetrajodthyronin (Thyroxin, T4) gebildet. T4 - bei dem es sich um ein biologisch nicht sehr aktives Hormon handelt - wird ausschließlich in der Schilddrüse synthetisiert und liegt überwiegend an Plasmaprotein gebunden vor. Extrathyreoidal entsteht aus T4 durch Deiodierung das biologisch sehr aktive T3 und das biologisch inaktive reverse T3 (rT3). Für den Transport im Blut ist vor allem T4 in proteingebundener Form als zirkulierende Speicherform vorhanden. T3 ist in wesentlich geringerem Masse an Plasmaprotein gebunden und liegt zu 80 % intrazellulär vor. Biologisch aktiv sind diese Hormone ausschließlich in ungebundener Form, den sogenannten freien T3 und freien T4 (fT3 und fT4) (VOIGT, 1996).

Die Schilddrüsenfunktion - und somit die Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone - wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse gesteuert. Aus den thyreotropen Arealen des Hypothalamus wird das Tripeptid Tyreotropin-releasing Hormon (TRH) in den hypophysären Portalkreislauf sezerniert. Das TRH wirkt auf die thyreotropen Zellen der Adenohypophyse und somit auf die Produktion des thyreotropen Hormons (TSH) (PETERSON und FERGUSON, 1989). TSH beeinflusst die Morphologie und die Funktion der Schilddrüse insofern, dass es die Blutversorgung der Schilddrüse erhöht sowie die Synthese und die Sekretion von

Trijodthyronin und Thyroxin stimuliert. TSH fördert weiterhin die Aufnahme von Jod und die Sekretion von Thyreoglobulin in das Follikellumen (VOIGT, 1996).

Die Hemmung der Schilddrüsenhormonproduktion geschieht über eine negative Rückkoppelung (negatives Feedback). Die Plasma-T3-Konzentration ist hierbei der entscheidende Faktor (EIGENMANN, 1989), da sie direkt auf die thyreotropen Zellen der Adenohypophyse wirkt. Sowohl die Synthese von TSH als auch die Produktion von TRH-Rezeptoren werden unterdrückt. Je nach Plasmakonzentration können die TSH-Synthese und die Freisetzung teilweise oder vollständig unterdrückt werden (VOIGT, 1996).

Neben dieser Regulation der Schilddrüsenfunktion existiert noch ein weiterer Regelmechanismus durch die Jodidkonzentration im Blut. Durch diese Autoregulation der Schilddrüse werden bei niedriger Jodidkonzentration die Aufnahme von Jod aus dem Magen-Darm-Trakt und die Hormonsynthese stimuliert, auch wenn TSH fehlt. Bei hohen Jodidkonzentrationen wird die Hormonproduktion durch die Schilddrüse selbst gehemmt (VOIGT, 1996).

Die TSH-Sekretion und somit auch die Produktion und Freisetzung von Trijodthyronin und Thyroxin unterliegen einem zirkadianen und einem jahreszeitlich bedingten Rhythmus. Im Winter erreicht die TSH-Konzentration ihren Maximalwert. Bei niedrigen Umgebungstemperaturen oder bei Abkühlung der Tiere erhöht sich die TSH-Sekretion, die Thyroxin-Konzentration steigt an, der Grundumsatz des Organismus wird gesteigert und dementsprechend vermehrt Wärme gebildet. Bei niedrigen Umgebungstemperaturen kann somit die physiologische Körpertemperatur aufrecht erhalten werden (BAMBERGER, 1987).

Die Schilddrüsenhormone wirken in physiologischen Mengen katabol durch ihren Einfluss auf viele metabolische Prozesse (PETERSON und FERGUSON, 1989). Sie wirken z. B. auf die Konzentration und Aktivität von einigen Enzymen und Hormonen, verändern den Stoffwechsel vieler Substrate, Vitamine und Mineralien. Ihre Wirkung ist wichtig für die fetale Entwicklung im Mutterleib und das spätere Wachstum eines Organismus, unter anderem wegen ihres Einflusses auf den Auf- und Abbau von Knochengewebe. In den Energie-, Protein-, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel greifen

sie regulierend ein und haben chronotrope und inotrope Effekte auf die Herzmuskelaktivität. Daraus wird ersichtlich, dass alle Gewebe und Organsysteme eines Organismus der veränderten Situation bei einer Über- oder Unterfunktion der Schilddrüse ausgesetzt sind (FELDMAN und NELSON, 1996).

1.2. Kortisol

Die Bildung von Kortisol in den Nebennieren unterliegt ebenfalls der Steuerung durch Hypothalamus und Hypophyse. Der Hypothalamus produziert das Kortikoliberin (CRH), das über die sekretorischen Neurone in das Pfortadersystem der Hypophyse zur Adenohypophyse gelangt. Dort führt es zur erhöhten Produktion und Sekretion des adrenokortikotropen Hormons (ACTH). ACTH gelangt über das Blut zur Nebennierenrinde und regt die Zona fasciculata zur vermehrten Synthese der Glukokortikoide an (BAMBERGER, 1987). Chronische Stimulation durch ACTH führt zu Hyperplasie und Hypertrophie der Nebennierenrinde; ein dauerhafter Mangel an ACTH hingegen führt zu einer Verminderung der Steroidogenese und einer deutlichen Atrophie der Nebenniere.

Eine Erhöhung der Blutkonzentration von Glukokortikoiden zieht eine negative Rückkopplung sowohl des Hypothalamus als auch der Hypophyse nach sich. Durch das Fehlen der, die Produktion und Sekretion fördernden Transmitter im Blut kommt es zu einem Absinken der Glukokortikoid-Konzentration (FELDMAN, 1989).

Nach der Nahrungsaufnahme sinkt sowohl beim Menschen wie auch beim Tier die ACTH-Ausschüttung (FINDLING und TYRRELL, 1991). Viele verschiedene Formen von Stress, z.B. Schmerzen, Traumen, Hypoxie, Kälteexposition und akute Hypoglykämie, stimulieren die Sekretion von ACTH aus der Hypophyse und damit auch die Kortisol-Freisetzung, unabhängig von der Kortisolkonzentration im Blut (FELDMAN und NELSON, 1996). Die ACTH-Freisetzung folgt beim Menschen einem zirkadianen Rhythmus mit seinem Maximum am Morgen, beim Hund konnte ein solcher Rhythmus nicht nachgewiesen werden (MURASE et al., 1988). Bei der Katze konnte ein dem Menschen gegenläufiger zirkadianer Rhythmus nachgewiesen werden, der

gleichbedeutend mit einem höheren Plasmakortisolspiegel bei der Katze am Abend ist (SCOTT et al., 1982).

Glukokortikoide wirken im Körper dem Insulin entgegen und erhöhen die Konzentration von Glukose, freien Aminosäuren und freien Fettsäuren im Blut. Sie haben, außer in der Leber, wo sie die Glukoneogenese fördern, auch einen katabolen Effekt. Gleichzeitig wirken sie entzündungshemmend und immunsuppressiv (BAMBERGER, 1987).

1.3. Insulin

Der endokrine Teil, der sogenannte Inselapparat (Langerhanssche Inseln), der Bauchspeicheldrüse ist Bildungsstätte für die Hormone Insulin (KLOSTERMEYER, 1966), Glukagon, Somatostatin und pankreatisches Polypeptid, während der exokrine Teil die an der Verdauung der Nahrung beteiligten Pankreasenzyme produziert und in das Duodenum freisetzt.

Die sogenannten Inselhormone werden in spezifischen Pankreaszellen synthetisiert, wobei die B-Zellen Insulin synthetisieren, während die A-Zellen für die Produktion des Glukagons verantwortlich sind (NELSON, 1989).

Insulin senkt den Blutzuckerspiegel sehr stark durch seine vielfältige Wirkung auf die Leber, die Muskulatur und das Fettgewebe. Die gesamten Stoffwechselvorgänge, sowohl im Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel, werden stimuliert. Durch eine vermehrte Aufnahme von Glukose in die Zellen wird die Synthese von Speichersubstanzen wie Glycogen, Triglyceriden und Eiweiß angeregt. Da es sich bei Insulin um ein anaboles Hormon handelt, wirkt es zusätzlich antilipolytisch im Fettstoffwechsel und antiproteolytisch im Proteinstoffwechsel. Es hat somit die wichtigste Stellung bei der Kontrolle des Metabolismus zur Speicherung von Nährstoffen (VOIGT, 1996).

Die Sekretion von Insulin in das Blut wird hauptsächlich durch die Glukosekonzentration im Blut gesteuert. Weiterhin haben aber auch gastrointestinale Hormone wie das

Gastrin und das Sekretin einen stimulierenden Einfluß auf die Ausschüttung von Insulin. Das autonome Nervensystem verfügt sowohl über stimulierende als auch hemmende Auswirkungen auf die Insulinsekretion. Sowohl β -Adrenozeptoren als auch die Aktivierung des Vagus bei Nahrungsaufnahme stimulieren die Insulinsekretion, wohingegen α -Adrenozeptoren die Insulinsekretion - z. B. bei längeren Hungerperioden oder in Stresssituationen - durch erhöhte Adrenalininspiegel drosseln (VOIGT, 1996), ebenso wie Diazoxid und Insulin selbst die Sekretion von Insulin hemmen.

Der Körper ist außerdem in der Lage, mit Hilfe der sogenannten Down-Regulation auf die Wirkung von Insulin auf die Zellen Einfluss zu nehmen, indem er die Anzahl der Insulinrezeptoren an den Zellen reduziert sowie die Affinität für Insulin bei längerer Insulineinwirkung herabsetzt. Diese Fähigkeit wird als ein möglicher pathologischer Mechanismus bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ II diskutiert (VOIGT, 1996).

Die Wirkung von Insulin in der Leber besteht in einer vermehrten Glukoseaufnahme, einer Steigerung des Glukosemetabolismus aus Pyruvat und Lactat, der Hemmung der Glykogenolyse, der Glukoneogenese aus Aminosäuren und der Oxidation von freien Fettsäuren. Dadurch ergibt sich eine antiketogene Wirkung. In der Muskulatur wird die vermehrt aufgenommene Glukose in Muskelglykogen umgewandelt und zu einem kleinen Teil als Energieträger verwendet. In den Fettzellen wird Glukose zu Triglyceriden verestert und die Lipolyse wird gehemmt (VOIGT, 1996).

2. Pathophysiologie der Erkrankung und diagnostischer Nutzen

Hyperthyreose - Thyreotoxikose

Die klinischen Symptome der Hyperthyreose sind die Folge einer exzessiven Produktion und Sekretion von Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4). Bei der Katze wird diese Überfunktion in den häufigsten Fällen durch autonome, tumoröse Prozesse in der Schilddrüse verursacht, seltener liegt die Ursache in den übergeordneten Strukturen, dem Hypothalamus oder der Hypophyse. Nicht immer müssen beide Lappen der Schilddrüse von dem Tumor betroffen sein. Bei der Katze handelt es sich in den überwiegenden Fällen um Adenome der Schilddrüse, selten um Karzinome (REESE et

al., 2002); wohingegen beim Hund die Hyperthyreose in der Regel durch Karzinome bedingt ist. Mögliche andere Ursachen für die Entstehung der Krankheit bei der Katze - insbesondere bei mittel alten bis alten Tieren (älter als acht Jahre) - sind noch nicht bekannt. Chronischer Jodmangel wird als ätiologischer Faktor für die Entstehung von nodulären Schilddrüsenveränderungen angenommen (REESE et al., 2002). Rasse- oder Geschlechtsdispositionen konnten nicht nachgewiesen werden (BROUSSARD et al., 1995).

Aufgrund dessen, dass die Schilddrüse durch ihre Hormone im Organismus alle Organe und deren Stoffwechsel beeinflusst, hat eine Überproduktion dieser Hormone entsprechende Auswirkungen. Die klinischen Symptome reichen von geringgradigen Veränderungen bis hin zu schweren Krankheitserscheinungen. Die Tiere zeigen häufig Polyphagie in Kombination mit Gewichtsverlust, Polydypsie, Polyurie, Hyperaktivität, Tachykardie und Herzgeräusche, Vomitus und zum Teil hochgradige Diarrhoe (BROUSSARD et al., 1995; BÜCHLER, 1999; KRAFT et al., 1999; BUCKNELL, 2000).

Hyperthyreose wird anhand des Thyroxinwertes im Blut, der bei der Katze 4,0 µg/dl und beim Hund 4,5 µg/dl (entsprechen 51 nmol/l bzw. 58 nmol/l) übersteigen muss (BÜCHLER, 1999; KRAFT, 2000), oder mit Hilfe des T3-Suppression-Tests bzw. des TRH-Stimulationstests diagnostiziert (BROUSSARD et al., 1995). Die Bestimmung des T3-Wertes ist hinsichtlich der Hyperthyreose der Katze nicht als diagnostisches Mittel heranzuziehen. Viele Katzen zeigen auch bei erhöhten T4-Konzentrationen im Blut eine T3-Konzentration im Referenzbereich. Im Falle einer leichten oder im Anfangsstadium befindlichen Hyperthyreose sowie bei gleichzeitigem Auftreten einer zusätzlichen systemischen Krankheit (nonthyroidal illness, NTI) kann sich auch der T4-Wert im Referenzbereich befinden (PETERSON und GAMBLE, 1990; MCLOUGHLIN, 1993). Nach PETERSON (1995) unterliegen die Schilddrüsenhormone auch einer gewissen Fluktuation, insofern ist ein, einmalig im Referenzbereich befindlicher T4-Wert für den Ausschluss einer Hyperthyreose nicht ausreichend. Zusätzlich müssen deshalb auch immer die klinischen Symptome bei der Diagnosestellung herangezogen werden (KRAFT, 2000).

Hypothyreose

Die beim Hund in ca. 96 % der Fälle vorkommende Form der Hypothyreose ist die primäre Hypothyreose mit einer pathologischen Veränderung der Schilddrüse und der Unempfindlichkeit gegenüber der Stimulation mit Hilfe von TRH und TSH. Eine der Ursachen für die primäre Hypothyreose beim Hund ist die lymphozytäre Thyreoiditis, eine Autoimmunkrankheit, bei der Auto-Antikörper sowohl gegen das Schilddrüsengewebe als auch gegen Thyreoglobulin oder T3 gebildet werden können. Die lymphozytäre Thyreoiditis ist gekennzeichnet durch diffuse Infiltrate von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen in der Schilddrüse. Die Folge davon ist eine fortschreitende Zerstörung der Follikel und eine sekundär entstehende Fibrose (GOSSELIN et al., 1981). Dieser Prozess kann sich über drei bis vier Jahre hinziehen und erst bei Zerstörung von ca. 75 % der Drüse kommt es zu den Symptomen der Hypothyreose wie Gewichtszunahme, symmetrische Allopezie am Rumpf, Hyperpigmentation, Verdickung der Haut und Unterhaut, Apathie und Bardykardie (PETERSON und FERGUSON, 1989; KRAFT, 2000). Eine weitere Ursache für die Hypothyreose beim Hund ist die idiopathische Atrophie, die histologisch durch den Verlust des Parenchyms und dessen Ersatz durch Fettgewebe gekennzeichnet ist. Eine entzündliche Komponente fehlt völlig. Der Auslöser und die Ursache dieser Form der Hypothyreose sind nicht bekannt (KRAFT, 2000).

Katzen erkranken nur sehr selten an einer Hypothyreose. Einer der Gründe für die feline Hypothyreose ist die iatrogen verursachte Unterfunktion infolge der Behandlung der Hyperthyreose der Katze. Dies ist z.B. der Fall nach chirurgischer Entfernung der Schilddrüse oder Behandlung mit radioaktivem Jod, aber auch die Verabreichung von antithyroidalen Medikamenten kann zu einer Hypothyreose führen. In diesem Fall ist der Zustand durch Absetzen der Medikamente reversibel (KINTZER, 1994).

Die ohne Fremdeinwirkung erworbene Hypothyreose der Katze kann verschiedene Ursache haben. Bei der pathologischen Untersuchung der Thyreoidea der Katze sind mannigfaltige Veränderungen festgestellt worden. Da die untersuchten Tiere nicht auf Grund eines Hypothyreoseverdachtes seziert wurden, liegen aber parallel keine entsprechenden Daten aus der klinischen und labordiagnostischen Untersuchung vor. Insofern ist ein Vergleich der gefundenen, pathologischen Veränderungen mit

entsprechenden klinischen Daten nicht möglich. Aufgrund dessen ist auch der Zusammenhang der pathologischen Veränderungen der Schilddrüse mit einer klinisch manifesten Hypothyreose nicht belegbar. Zu diesen Veränderungen gehören u.a. ein dokumentierter Fall einer lymphozellulären Thyreoiditis (RAND et al., 1993), Atrophie der Schilddrüse, lymphozelluläre Thyreoiditis, Amyloidose, zystisch veränderte Follikel und Kropf (FELDMAN und NELSON, 1996).

Bei der tertiären und sekundären Hypothyreose ist die Schilddrüse, im Gegensatz zur primären Hypothyreose, selbst nicht betroffen und somit in der Lage, ihre Hormone zu produzieren. Sie erhält aber von den übergeordneten Steuerungsorganen, Hypothalamus oder Hypophyse, keine stimulierenden Reize in Form von TRH oder TSH. Die Folge ist eine verminderte bis fehlende T3- und T4-Konzentration im Blut und die Atrophie der beiden Schilddrüsenlappen mit den entsprechenden Symptomen. Diese Formen der Hypothyreose treten in der Tiermedizin überhaupt nicht (TRH), bzw. sehr selten (TSH) auf (FELDMAN und NELSON, 1996; KRAFT, 2000).

Angeborene Hypothyreosen kommen sowohl beim Hund als auch bei der Katze - häufiger als die erworbene Form der erwachsenen Katze - vor, häufig jedoch sterben die betroffenen Tiere frühzeitig, so dass die Krankheit in der Regel somit nicht diagnostiziert wird (PETERSON und FERGUSON, 1989). Bei den überlebenden Tieren zeigt sich das Bild des Kretinismus. Der Mangel an Schilddrüsenhormonen führt zu einer unzureichenden Skelettbildung, verzögertem Wachstum, Muskelschwäche und verspätetem Eintritt der Pubertät. Sowohl beim Hund wie auch bei der Katze wird ein genetischer Defekt, der zu diesem Unvermögen der Synthese von Trijodthyronin und Thyroxin führt, diskutiert (CHASTAIN et al., 1983; JONES, 1992).

Da die Hypothyreose, wie bereits erwähnt, bei der Katze eine sehr selten auftretende Krankheit ist, existieren wenig Studien, aus denen entsprechende Daten zu entnehmen sind. Auch die beim Hund gründlich untersuchten und in den Routineablauf eingeführten Tests zur Diagnose sind für die Katze bisher nur im Zusammenhang mit der Diagnose der feline Hyperthyreose untersucht worden (PARADIS, 1996).

Hyperadrenokortizismus

Beim Hyperadrenokortizismus oder Hyperkortisolismus handelt es sich um eine chronische Erhöhung der Kortisolkonzentration im Blut. Bei erkrankten Tieren sind häufig Plasmakortisolwerte im Referenzbereich festzustellen. Die Ursachen, die zu einem chronisch erhöhten Plasmakortisolspiegel führen können, sind vielfältig.

Im Fall des Cushing-Syndroms liegt die Ursache in Tumoren der Nebennieren selbst (Primärer Hyperadrenokortizismus), wobei es sich hier wiederum um Adenome oder Karzinome handeln kann, die unabhängig von der Steuerung durch höhere Ebenen (Hypothalamus, Hypophyse) autonom Kortisol produzieren und sezernieren. Dementsprechend lassen sie sich nicht durch negative Rückkopplung steuern. Durch die von ihnen verursachte Überproduktion an Kortisol werden jedoch Hypothalamus und Hypophyse in der Produktion und Sekretion von CRH und ACTH gehemmt, mit der Folge, dass solche Patienten sehr niedrige Plasma-ACTH-Konzentrationen aufweisen. Aufgrund dieses negativen Feedbacks atrophiert die gesunde Nebenniere vollständig, ebenso die verbleibenden gesunden Zellen der tumorös entarteten Nebenniere (FELDMAN und NELSON, 1996). Tumoröse Entartung beider Nebennieren gleichzeitig konnte bisher nur in sehr wenigen Fällen beim Hund nachgewiesen werden (FORD, 1993).

Die zweite Ursache chronisch überhöhter Kortisolwerte liegt in den übergeordneten Steuerungszentren (Morbus Cushing) Hypothalamus oder Hypophyse (sekundärer Hyperadrenokortizismus). Die Pathologie der Erkrankung ist darin begründet, dass die Häufigkeit und die Menge des sezernierten ACTH zu hoch ist, wodurch eine dauerhaft hohe Stimulation der Nebennierenrinde erfolgt, die zu einer chronisch überhöhten Kortisolkonzentration im Vergleich zu der Konzentration bei gesunden Tieren führt. Die Kontrolle über das negative Feedback funktioniert in solchen Fällen nicht mehr, da es sich um Tumore der Hypophyse (Hypophysenadenom oder Karzinom) handelt, die auf die üblichen Kontrollmechanismen nicht ansprechen (FELDMAN und NELSON, 1996). Dieser chronisch überhöhte Blutwert führt nach einiger Zeit zu den typischen klinischen Symptomen des Morbus Cushing. Einige dieser Symptome, die nicht alle gleichzeitig auftreten müssen, sind Polydypsie, Polyurie, Polyphagie, Adipositas, Allopezie (besonders am Rumpf), Hyperpigmentation der Haut, Calcinosis cutis, Lethargie und

Muskelschwäche. Diese Symptome sind die Folge der Glukoneogenese, Lipolyse, des katabolen Proteinstoffwechsels, antiinflammatorischer und immunsuppressiver Effekte der Glukokortikoide auf den Organismus. Sie entstehen langsam, sind fortschreitend und fallen somit dem Besitzer nicht sofort auf (FELDMAN, 1989).

Eine dritte Ursache für einen Hyperadrenokortizismus ist die exogene Zufuhr von zu hohen Dosen an Glukokortikoiden über einen längeren Zeitraum (iatrogener Cushing). In diesem Fall funktioniert das negative Feedback, die Nebennieren stellen ihre Produktion und Sekretion ein aufgrund des ausreichend hohen Glukokortikoidspiegels und atrophieren (KAUFMAN, 1984).

Bei der Katze ist der Hyperadrenokortizismus im Gegensatz zum Hund eine sehr selten vorkommende Krankheit. Auch der iatrogen induzierte Morbus Cushing tritt bei Katzen seltener auf, vermutlich wegen der Tatsache, dass Katzen weniger empfindlich auf die exogene Substitution von Glukokortikoiden reagieren als Hunde (SCOTT et al., 1982; KAUFMAN, 1984). Sehr häufig leiden Katzen gleichzeitig noch an einem Diabetes mellitus, der gelegentlich die Symptome des Hyperadrenokortizismus überdeckt (PETERSON und STEELE, 1986). Die Ursachen für die Krankheit bei der Katze sind jedoch denen des Hundes vergleichbar. Bei der Katze ist eines der auffälligsten Symptome die sehr dünne und vor allem leicht zu verletzende Haut. Die diagnostischen Möglichkeiten (ACTH-Test, LDDS-Test, HDDS-Test, siehe unten), um die Krankheit zu erkennen und eventuell auch die genauen Ursachen zu differenzieren, unterscheiden sich bei Hund und Katze nicht von denen beim Menschen (VOIGT, 1996; FELDMAN und NELSON, 1996).

Da die Plasmabasalkonzentration von Kortisol zur Diagnosestellung allein nicht ausreicht, bedient man sich in der Medizin sogenannter Funktionstests. Die verschiedenen Tests, um einen Hyperadrenokortizismus zu diagnostizieren, beruhen auf dem Prinzip, die Nebennieren zu stimulieren oder sie durch das negative Feedback in ihrer Funktion zu supprimieren. Beim ACTH-Stimulationstest werden durch Injektion eines synthetisch hergestellten ACTH die Nebennieren stimuliert. 30 und 60 Minuten nach der intravenösen Injektion von ACTH werden der Katze Blutproben entnommen und die Kortisolkonzentrationen der Proben mit dem Basalwert vor Stimulation verglichen. Im Falle eines Hyperadrenokortizismus liegen die Werte post injectionem

deutlich über dem Basalwert und nicht mehr im Referenzbereich (KEMPPAINEN et al., 1984).

Durch Injektion unterschiedlicher Mengen an Dexamethason sollen beim low-dose-dexamethason-Test (LDDS-Test) und beim high-dose-dexamethason-Test (HDDS-Test) die Produktion von Kortisol in den Nebennieren über das negative Feedback supprimiert werden. Als Folge der Injektion liegen die vier und acht Stunden post injectionem gemessenen Plasmakortisolwerte beim gesunden Tier unter dem Basalwert (MEDLEAU et al., 1987).

Durch die Kombination beider Testverfahren und einer Ultraschalluntersuchung der Nebennieren kann häufig ein hypophysärer Hyperadrenokortizismus von einem adrenalen unterschieden werden, da autonome Nebenierenrindentumoren sich nicht durch das negative Feedback beeinflussen lassen.

Hypoadrenokortizismus

Die Symptome des Hypoadrenokortizismus entstehen als Folge der pathologischen Unterfunktion beider Nebennierenrinden. Erst wenn 85 - 90 % der Zellen der Nebennierenrinde außer Funktion sind, werden klinische Symptome des Glukokortikoid- und Mineralokortikoidmangels erkennbar (FELDMAN und NELSON, 1996).

Die häufigste Ursache beim Menschen für einen primären Hypoadrenokortizismus liegt in einer immun-mediierten Zerstörung der Nebennierenrinden. Wahrscheinlich ist dies auch die Ursache für den Hypoadrenokortizismus bei Hund und Katze (SCHAER et al., 1986). Andere Ursachen einer Unterfunktion der Nebennierenrinden können granulomatöse Veränderungen der Nebennieren wie Histoplasmose, Blastomykose oder Tuberkulose sein, aber auch hämorrhagische Infarkte nach Traumen oder bei einer Cumarinvergiftung sowie Tumormetastasen oder Amyloidose der Nebennieren (FELDMAN und NELSON, 1996). Nicht zu vergessen ist natürlich auch der iatrogene Morbus Addison, verursacht zum Teil durch die Therapie mit hoch potenten Glukokortikoiden oder durch plötzliches Absetzen von über längere Zeit in höheren Dosierungen gegebenen Glukokortikoiden. Bei der Initialtherapie des Cushing-

Syndroms des Hundes mit Lysodren® (α,β -DDD) kann es gelegentlich dazu kommen, dass die Nebennieren kurzzeitig, in vereinzelten Fällen sogar dauerhaft, nicht mehr in der Lage sind, Kortisol zu produzieren. Bei Katzen kann mit Megestrolacetat diese Form des Morbus Addison ausgelöst werden (CHAISTAIN et al., 1982).

Der sekundäre Hypoadrenokortizismus ist bedingt durch einen Mangel an CRH, was wiederum einen ACTH-Mangel verursacht oder direkt durch die fehlende Produktion und Sekretion von ACTH. Beide Mangelzustände kommen selten vor und sind in der Mehrzahl der Fälle durch Tumore verursacht. Seltener sind Entzündungen oder Traumen für die Dysfunktion der hormonellen Steuerung verantwortlich (FELDMAN und NELSON, 1996).

Die Unterversorgung des Körpers mit Kortikosteroiden hat die unterschiedlichsten Auswirkungen. Es kommt zu gastrointestinalen Störungen in Form von Anorexie, Vomitus und Gewichtsverlust. Der Energiestoffwechsel ist beeinträchtigt aufgrund der verminderten Glukoneogenese, die Glykogenspeicher in der Leber werden aufgebraucht (FELDMAN und NELSON, 1996). Die Tiere werden lethargisch und kraftlos. In Stresssituationen verschlimmert sich dieser Zustand zunehmend, die Tiere können unter Umständen während einer Addison-Krise sterben. Zu diesem Mangel an Glukokortikoiden kommt gleichzeitig der Mangel an Mineralokortikoiden, die für die Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes verantwortlich sind. Fehlen diese Mineralokortikoide, führt das zur vermehrten Wasser- und Natriumausscheidung über die Niere. Gleichzeitig wird Kalium im Körper zurückgehalten. Dadurch entstehen lebensbedrohliche Elektrolytverschiebungen und es kommt zu einer Hämokonzentration.

Diabetes mellitus

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine chronische Stoffwechselerkrankung, die durch Insulinmangel oder durch eine herabgesetzte Insulinwirkung bedingt ist. Das primäre Symptom des Diabetes mellitus ist eine dauerhafte Hyperglykämie, die mit dem Überschreiten der Nierenschwelle für Glukose einhergeht (PETERSON, 1995). Bei längeranhaltender Hyperglykämie kann es, aufgrund der dabei wegen der fehlenden

antiketogenen Aktivität des Insulins, häufig entstehenden Ketoazidose und Elektrolytverschiebungen zu lebensbedrohlichen Zuständen kommen. Durch die Schädigung kleiner und mittlerer Gefäße (diabetische Mikroangiopathien) kommt es zu bleibenden und folgenschweren Erkrankungen im Bereich des Auges (Katarakt), der Niere (Glomerulopathien) und des peripheren Nervensystems.

In der Humanmedizin werden von der WHO (1980) zwei Formen des Diabetes mellitus unterschieden, die auch für Hund und Katze Gültigkeit haben (KRAFT, 2000). Auch FELDMAN und NELSON (1996) unterscheiden den klinischen Erfordernissen entsprechend den Typ-I-Diabetes (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) oder auch juveniler Diabetes genannt, da er häufiger im jugendlichen Alter auftritt, und den Diabetes Typ II (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM). Beim Typ-I-Diabetes sind die B-Zellen des Patienten nicht in der Lage, Insulin in ausreichender Menge zu produzieren, so dass der Patient lebenslang von exogener Insulinzuführung abhängig ist (IDDM). Beim Menschen handelt es sich um einen autoimmunen Prozess, bei dem die B-Zellen des Pankreas durch Antikörper zerstört werden. Bei der Katze ist diese klassische Form des Typ I Diabetes bisher nicht beschrieben. Sie scheint zumindest häufiger beim Hund als bei der Katze die Ursache des Diabetes mellitus zu sein (LUTZ und RAND, 1995).

Der Diabetes Typ II (NIDDM) ist vermutlich auf eine Resistenz der Insulinrezeptoren zurückzuführen. Durch die von der körpereigenen Blutglukose unabhängige Down-Regulation wird die Anzahl der Insulinrezeptoren an den Zellen reduziert und gleichzeitig ihre Affinität für Insulin herabgesetzt. Diese Fähigkeit wird als ein möglicher Mechanismus bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ II diskutiert. Zusätzlich wurde eine deutlich verzögerte oder fehlende Insulinsekretion als Reaktion auf einen Blutzuckeranstieg nachgewiesen. Der Typ-II-Diabetes tritt in der Regel bei adipösen Patienten auf. Eine genetische Disposition beim Menschen scheint zusätzlich eine Rolle bei der Entstehung zu spielen, während eine genetische Disposition bei der Katze bisher nicht nachgewiesen werden konnte (LUTZ und RAND, 1995). Im Allgemeinen ist es bei dieser Form des Diabetes ausreichend, das Körpergewicht zu reduzieren, eine Diät einzuhalten und in einigen Fällen noch zusätzlich orale Antidiabetika einzusetzen (VOIGT, 1996). Der Typ-II-Diabetes ist wohl die bei der Katze häufiger auftretende

Form, wobei betroffene Katzen im Gegensatz zum Menschen in der Regel von einer exogenen Insulinzufluhr abhängig sind (LUTZ und RAND, 1995).

In beiden Fällen kann die Krankheit im Laufe der Zeit schwere Begleiterkrankungen nach sich ziehen, die überwiegend bedingt sind durch die von der Hyperglykämie hervorgerufenen Mikro- und Makroangiopathien. Entstehende Folgeschäden können z.B. Erblindung durch Katarakt oder chronische Niereninsuffizienz sein. Insbesondere beim Typ-I-Diabetes wird versucht, durch möglichst exakte Einstellung des Blutzuckerspiegels über 24 Stunden im Referenzbereich, diese Folgeschäden hinauszuzögern oder zu verhindern (VOIGT, 1996).

Hyperinsulinismus

Eine andere Form der Entgleisung im Insulinstoffwechsel stellt der sogenannte Hyperinsulinismus dar. Hier wird der Insulinspiegel wesentlich häufiger gemessen, da es sich bei dieser Krankheit um das entscheidende Diagnostikum handelt.

Bei adipösen Patienten wird sehr häufig ein Hyperinsulinismus beobachtet und man vermutet, dass dadurch die Resistenz der Insulinrezeptoren hervorgerufen wird. In seltenen Fällen tritt ein Hyperinsulinismus auch bei insulinproduzierenden Tumoren (Insulinome) auf. Durch die laufend erhöhte Insulinkonzentration im Blut fällt der Blutzuckerspiegel drastisch ab und die Patienten kommen in einen pathologisch-hypoglykämischen Zustand, der bis zum hypoglykämischen Schock und sogar zum Tode führen kann (VOIGT, 1996).

Die Beta-Zellen des Pankreas sind für die Regulation des Blutzuckerspiegels verantwortlich. Steigt die Blutglukose über 110 mg/dl, wird Insulin in das Blut freigesetzt und der Blutzuckerspiegel sinkt. Fällt dieser unter den Wert von 60 mg/dl, wird die Sekretion von Insulin gestoppt und der Glukosewert kann wieder in den Referenzbereich von 80 - 110 mg/dl steigen (FELDMAN und NELSON, 1996).

Hyperinsulinismus und als dessen Folge Hypoglykämie mit ihren Auswirkungen auf den Organismus sind in der Regel die Folge von Insulin produzierenden Beta-Zelltumoren.

Diese sind unabhängig von der Beeinflussung durch das negative Feedback, ausgelöst durch die Hypoglykämie. Insulinome sind sehr häufig maligne und metastasieren früh in die regionären Lymphknoten, die Leber, das Mesenterium und das große Netz.

Glukose ist ein wesentlicher Nährstoff für das ZNS. Bei Blutkonzentrationen, die unter einen bestimmten Wert fallen, beginnen die durch Mangelernährung bedingten Funktionsstörungen des Gehirns. Die zuerst betroffene Region des ZNS ist die Großhirnrinde, während der Hirnstamm erst bei weiter fallenden Glukosewerten Ausfälle zeigt. Anscheinend gibt es eine Art Anpassung an niedrige Blutglukosekonzentrationen sowohl beim Menschen als auch beim Tier, wobei der Mechanismus, der zu dieser Adaptation führt, noch nicht geklärt ist. Tiere, die an chronischer oder rezidivierender Hypoglykämie leiden, zeigen häufig erst sehr spät klinische Symptome oder erst dann, wenn der Glukosespiegel rapide abfällt. Insulinome sind beim Hund selten, bei der Katze sehr selten (FELDMAN und NELSON, 1996).

3. Immunologische Nachweisverfahren

Die Immunoassay-Technik ist eine Analysenmethode, bei der mittels einer immunologischen Reaktion der qualitative oder quantitative Nachweis einer Substanz geführt wird. Immunoassays sind heutzutage in großer Vielzahl und mit einem Modifikationsspektrum für eine so hohe Zahl völlig unterschiedlicher Substanzen entwickelt, kommerzialisiert und fest etabliert wie kaum eine andere Analysenmethode (JOHN, 1999). Immuntests basieren auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Sie können nur aufgrund der Leistung des Immunsystems und dessen Fähigkeit zur Produktion einer unendlichen Vielfalt an Antikörpern funktionieren. Die Antikörper ihrerseits besitzen eine hohe Affinität für spezifische Antigene und gehen mit ihnen eine Bindung ein. Dadurch ist es möglich, entweder das Antigen oder den Antikörper *in vitro* zu bestimmen.

ANTIGEN (Ag) + ANTIKÖRPER (Ak) = ANTIGEN-ANTIKÖRPER-KOMPLEX

Die hohe Antikörper-bedingte Substanzselektivität, die niedrigen Nachweisgrenzen und die vergleichsweise kurzen Analysezeiten begründen u.a. den weitgefächerten

diagnostischen und forschungsorientierten Einsatzbereich (JOHN, 1999). Unter dem Oberbegriff Immunoassay sind die verschiedenen Nachweisverfahren zusammengefasst:

- Radioimmunoassay;
- Enzymimmunoassay;
- Fluoreszenzimmunoassay;
- Lumineszenzimmunoassay;
- Immunoassay unter Verwendung von Gelpräzipitationstechnik;
- Immunoassay unter Verwendung von Präzipitationen in Lösungen
- Turbidimetrische Immunoassay
- Nephelometrische Immunoassay;
- Immunologische Agglutinationsassay.

Es gibt zudem eine große Vielfalt in der Wahl der Marker und der Trennungsverfahren (KUNKEL, 1991). Man unterscheidet grundsätzlich zwei Typen von Immunoassay-Methoden: Kompetitive und nicht kompetitive Immunoassays. Der kompetitive Assay arbeitet mit einer definierten und limitierten Anzahl an Bindungsstellen eines Proteinmoleküls (Antikörpers) und einer begrenzten Menge eines markierten Liganden (Antigen) (GIRAUDI et al., 1999). Das Prinzip beruht auf der kompetitiven Wechselwirkung des markierten und daher messbaren Liganden und eines unmarkierten Liganden aus der Patientenprobe um dieselbe Bindungsstelle an einem in limitierter und bekannter Menge vorhandenen Antikörper. Gemessen wird die Konzentration des markierten Komplexes, sie ist umgekehrt proportional der Konzentration der zu bestimmenden Substanz.

Bei den verschiedenen existierenden Methoden des nicht kompetitiven Assays handelt es sich immer um Festphasenassays (FRIEMEL, 1991), wobei das Sandwich-Prinzip das verbreitetste ist (PORSTMANN, 1991), bei dem ein Proteinmolekül (Fängerantikörper, Capture-Antikörper) an die Festphase gebunden ist. Durch Zugabe und Inkubation der Patientenprobe kann die zu messende Substanz an das Proteinmolekül binden. Nach Entfernung von ungebundenem Substrat durch Waschung wird ein weiteres markiertes Proteinmolekül (Detektionsantikörper) zugegeben. Dieses bindet wiederum an andere freie Epitope der gesuchten Substanz (GIRAUDI et al., 1999). Der

entscheidende Unterschied dieser beiden Methoden liegt in der Messung der Antikörperbesetzung. Beim kompetitiven Assay werden die freien Bindungsstellen gemessen, d. h. die Menge der Bindungsstellen, die nicht durch den Analyten besetzt sind. Somit ist das gemessene Ergebnis umgekehrt proportional zur vorhandenen Analytenmenge, während beim nicht kompetitiven Assay die vom Analyten besetzten Bindungsstellen gemessen werden und das Ergebnis damit direkt proportional zur Antigenkonzentration ist (GIRAUDI et al., 1999). Daraus ergibt sich, dass beim kompetitiven Assay sich eine sehr geringe Analytenmenge nicht gut vom Nullstandard unterscheiden lässt; wodurch die Messung von sehr geringen Mengen ungenau bis unmöglich wird. Die nicht kompetitive Methode hat sich demzufolge als das weitaus sensitivere Nachweisverfahren erwiesen (GIRAUDI et al., 1999). Darüber hinaus besitzt die nicht kompetitive Methode eine höhere Spezifität, bedingt durch die doppelte Bindung des Analyten an zwei spezifische Antikörper; ferner verkürzt sich die Inkubationszeit aufgrund der unbegrenzten Anzahl an Reaktanten (EKINS, 1985).

Im Rahmen dieser Arbeit werden nur der Radioimmunoassay, der Enzymimmunoassay, der Fluoreszenzimmunoassay und der Lumineszenzimmunoassay näher besprochen.

3.1. Radioimmunoassay (RIA)

Seit der Entwicklung des ersten Radioimmunoassays für Insulin (BERSON und YALOW, 1968) nahm die Anwendung radiometrischer Verfahren für analytische Untersuchungen und Bestimmungen biologisch wichtiger Substanzen wie Enzyme, Hormone, Steroide und Vitamine in Blut, Urin, Speichel oder anderen Körperflüssigkeiten einen enormen Aufschwung. Die Vorteile der Verwendung von radioaktiven Isotopen als Marker (Tracer) sind die geringe Größe und dadurch keine oder nur eine unwesentliche Beeinflussung der Immunreaktion, die Nachweisbarkeit der Isotope bereits in geringsten Mengen und die zu vernachlässigende Störanfälligkeit durch biologische Substanzen in der Testflüssigkeit. Aufgrund des hohen Probenanfalls wurden für die Routinediagnostik automatisierte Strahlenmessplätze und rechnergestützte Auswertungssysteme entwickelt. Die bei radiometrischen Verfahren

gesammelten Erfahrungen kommen zunehmend den anderen Tracerverfahren (Enzym-, Fluoreszenz-, Chemilumineszenz-Immunoassay) zugute.

Den radiometrischen Verfahren ist die auf einer spezifischen Bindungsreaktion beruhende Analytik gemeinsam, bei der mindestens ein Reaktionspartner radioaktiv markiert und durch die Messung der Radioaktivität des Reaktionsprodukts der Rückschluss auf die Menge oder Konzentration der zu bestimmenden Substanz möglich ist. Bei der direkten Methode reagiert die zu bestimmende Substanz A mit einem markierten Bindungsprotein P* zum Komplex A-P*. Zu dieser Radioreagenzmethode gehört der Immunradiometrische Assay (IRMA), bei dem ein markierter Antikörper eingesetzt wird. Indirekte Methoden nutzen die Konkurrenz zwischen markiertem A* (Tracer) und unmarkierter Substanz A (Probe) um die begrenzten Bindungskapazitäten des Bindungsproteins P. Zu dieser Gruppe der kompetitiven Radioassays zählen kompetitiver Proteinbindungsassay (CPBA), Radioimmunoassay (RIA) und Radiorezeptorassay (RRA) (FRIEMEL, 1991).

Die verbreitetste Methode der nuklearmedizinischen In-vitro-Verfahren stellt der Radioimmunoassay (RIA) dar. Grundlage bildet die quantitative Erfassung der Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen Antigen aus der Probe und Antikörper unter Verwendung des markierten Liganden (radioaktiv markiertes Antigen) (KUNKEL, 1991). Bei dieser indirekten immunologischen Reaktion konkurrieren das Antigen aus der Probe mit dem in konstanter Konzentration vorhandenen radioaktiv markierten Liganden um die ebenfalls in konstanter Anzahl vorhandenen Bindungsstellen des Antikörpers. Je höher die Antigen-Konzentration in der Probe ist, umso geringer ist die zu messende Radioaktivität. Die Bestimmung der absoluten Antigenmenge erfolgt durch Vergleich mit einer Standardkurve.

Als Tracer im Radioimmunoassay sind gammastrahlenemittierende Isotope besonders geeignet. Die Messung der Radioaktivität ist relativ einfach und es ist keine spezielle Probenvorbereitung notwendig. Allerdings sind diese Verbindungen nur kurzzeitig lagerfähig (2 - 4 Wochen). Betastrahlenemittierende Isotope sind wesentlich stabiler und benötigen zur Messung ein Flüssigkeitsszintillationssystem. Dies erfordert eine zeitaufwändige Probenvorbereitung und zusätzlich ist eine längere Messzeit wegen der geringeren spezifischen Aktivität (Radioaktivität pro Gewichtseinheit) notwendig.

Radioaktives Jod ist für die Herstellung von Proteintracer besonders geeignet (KUNKEL, 1991). Dabei sind ^{125}J und ^{131}J die am besten zugänglichen Isotope. In fast allen jodmarkierten Verbindungen ist das Jod ein Fremdatom, außer bei den Schilddrüsenhormonen T3 und T4 und deren jodhaltigen Vorstufen. Daraus folgt, dass jodmarkierte Substanzen andere chemische und physikalische Eigenschaften haben als unmarkierte, was jedoch keinen Einfluss auf den Radioimmunoassay hat.

Je mehr radioaktives Jod während der Markierungsreaktion in eine Substanz eingebaut wird, desto höher ist die spezifische Aktivität, wodurch beim RIA die Messdauer verkürzt werden kann. Allerdings sind solche hochmarkierten Verbindungen weniger stabil und können zur Zerstörung der molekularen Struktur und damit zum Verlust des Bindungsvermögens am spezifischen Antikörper führen (FRIEMEIJ, 1991). Aufgrund der sich aus dem Aktivitätsverlust und der Radiolyse und somit der nur geringen Haltbarkeit ergebenden Nachteile - zusätzlich zu den Gefahren im Umgang mit radioaktivem Material und der Problematik der Entsorgung - wurde intensiv nach anderen Markierungssystemen gesucht.

Als Ersatz für die relativ gefährlichen radioaktiven Marker hat man u. a. die nachfolgend beschriebenen Marker etabliert.

3.2. Enzymimmunoassay (EIA)

Der Enzymimmunoassay hat zunehmend eine wichtige Rolle in medizinischen Labors eingenommen. Durch das Erreichen der annähernd gleichen Sensitivität wie der Radioimmunoassay hat er in vielen Labors den Radioimmunoassay ersetzt. Ferner entstehen nicht die gleichen Probleme wie die Entsorgung des radioaktiven Abfalls, die nur sehr kurze Lagerungsfähigkeit, die Notwendigkeit von speziell geschultem Personal oder die potentielle Gefahr für die Gesundheit (CARPENTER, 1997). Gleichzeitig wurde eine hohe Spezifität, eine hohe Aktivität und eine leichte Nachweisbarkeit erreicht.

Der Enzymimmunoassay unterscheidet sich vom Radioimmunoassay durch den Einsatz von enzymmarkierten Markern im Gegensatz zu den radioaktiven Isotopen (Tracer).

Trotz einer relativ großen Auswahl an Markerenzymen haben sich nur einige wenige durchsetzen können. Die Enzyme setzen über ein Intermediärprodukt ein Substrat zu einem Produkt um. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um ein chromogenes Produkt (FRIEMEL, 1991). Die Enzyme müssen verschiedene Kriterien erfüllen:

- Hohe Enzymaktivität (hohe Wechselzahlen)
- Verfügbarkeit in hoher spezifischer Aktivität
- Empfindlicher Nachweis des Reaktionsproduktes
- Kein Vorhandensein im Probenmaterial
- Keine Interferenzen mit dem Probenmaterial
- Löslichkeit des Enzyms
- Vorhandensein von reaktiven Gruppen zur Koppelung an andere Moleküle
- Keine Beeinflussung der Enzymaktivität durch Koppelung an andere Moleküle
- Stabilität als freies Enzym und als Konjugat
- Gesundheitliche Unbedenklichkeit der notwendigen Substrate.

Auch beim Enzymimmunoassay gibt es die zwei Grundtypen, den kompetitiven und nicht kompetitiven Assay. Weiterhin lässt sich der Test nach der Ablauffolge von immunologischer Komplexbildung und enzymatischer Reaktion in homogene und heterogene Enzymimmunoassays untergliedern:

Homogene Enzymimmunoassays sind dadurch gekennzeichnet, dass die Menge an gebildetem Produkt bei der enzymatischen Reaktion vom Ausmaß der Immunkomplexbildung abhängt. Dies bedeutet, dass die enzymatische Reaktion ein Teil der immunologischen Reaktion ist (CARPENTER, 1997). Durch die Bindung des enzymmarkierten Liganden an den Antikörper verändert sich die Aktivität des Enzyms. Damit können beide Reaktionen in homogener Lösung ablaufen. Die Trennung ungebundener Substanzen durch Waschung (Bound-Free-Trennung, BF-Trennung), wie es bei dem heterogenen Enzymimmunoassay notwendig ist, wird überflüssig (FRIEMEL, 1991). Die Technik des homogenen Assays hat sich in der Bestimmung von Medikamenten, Haptenen und zum Teil auch von Antigenen bewährt. Allerdings haben sie keine große Anwendung in immunologischen Labors gefunden, da sie häufig spezielle Probleme bei der Messung von Proteinen aufweisen (CARPENTER, 1997).

Im Gegensatz dazu sind heterogene Enzymimmunoassays in der Immunologie weit verbreitet. Bei dieser Art des Assays ist die enzymatische Aktivität des markierten Reaktanden nicht direkt mit der immunologischen Reaktion gekoppelt. Die freien und gebundenen Reaktanden müssen mit Hilfe der BF-Trennung voneinander getrennt werden. Trotz dieses zusätzlichen Trennungsschrittes hat die heterogene einige Vorteile gegenüber der homogenen Technik. Große und kleine Moleküle sind messbar, störende Substanzen werden vor der Quantifizierung aus dem Probenmaterial entfernt, wodurch eine höhere Sensitivität erreicht wird. Diese Form des Assays findet seine Anwendung hauptsächlich in dem Nachweis von Antikörpern und wird daher auch als Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet (PORSTMANN und PORSTMANN, 1991).

3.3. Lumineszenzimmunoassay

Als Lumineszenz wird die Lichtemission bezeichnet, die als Ergebnis der Energiefreisetzung einer angeregten Substanz entsteht. Die durch Anregung auf ein höheres Energieniveau gebrachten Elektronen des lumineszenten Moleküls strahlen bei der Rückkehr in ihre energetische Ausgangsposition die Energie als Licht ab. Es gibt verschiedene Arten der natürlichen Lumineszenz (DUDLEY, 1990):

- Photolumineszenz oder Fluoreszenz: Durch Photonen ausgelöste Reaktion.
- Biolumineszenz: Enzym vermittelte chemische Reaktion im lebenden Organismus (z. B. Glühwürmchen).
- Chemolumineszenz: Ergebnis spezifisch chemischer Reaktion (BECKMAN COULTER, 1999).

3.4. Fluoreszenzimmunoassay (FIA)

Fluoreszenz entsteht, wenn ein fluoreszierendes Molekül von kurzer Wellenlänge Licht absorbiert. Dadurch werden Elektronen für eine sehr kurze Zeit (Nanosekunden) auf ein höheres Energieniveau gehoben. Bei der Rückkehr in den Grundzustand emittieren sie

fluoreszierendes Licht von einer längeren als der ursprünglichen Wellenlänge. Die Differenz zwischen der ursprünglichen und der emittierten Wellenlänge wird Stoke's Shift (Wellenlängen Differenz) genannt und liegt im Bereich von 30 bis 50 nm (NAKAMURA und BYLUND, 1997).

Fluoreszenzmarkierte Antikörper werden für Labortests bereits seit 1941 verwendet (COONS et al., 1941). Fluoreszenzmunoassays finden Anwendung im Nachweis von Komponenten, die vom Immunsystem produziert werden, wobei ein fluoreszein-markierter Antikörper auf ein Gewebe oder in eine Flüssigkeit gegeben wird, um dort vorhandene Antigene zu binden. Das bei dieser immunologischen Reaktion entstehende und emittierte Licht wird gemessen (COONS et al., 1941).

Heute haben auch Fluoreszenzmunoassays weite Verbreitung in den klinischen Labors gefunden. Sie dienen zum Nachweis und zur Quantifizierung von Medikamenten, Hormonen, Proteinen und Peptiden in biologischen Flüssigkeiten und Geweben. Die Sensitivität der heutigen Fluoreszenzmunoassays ist vergleichbar mit der von Radioimmunoassays (NAKAMURA und BYLUND, 1997).

Als fluoreszierende Marker dienen hauptsächlich:

- Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC): Hat einen kurzen Stoke's shift, d. h. die emittierte Wellenlänge ist sehr nahe der Ausgangswellenlänge.
- Rhodamin-Fluorochrom: Emittiert Licht von einer längeren Wellenlänge als Fluoreszein. Wird oft in Kombination mit Fluoreszein angewendet.
- Phycobiliproteine: Lichtsammelnde Proteine in Algen, die für die Photosynthese notwendig sind. Ihr emittiertes Licht hat einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten, weshalb sie die Fluoreszenzmarker der Wahl bei einer großen Zahl von Immunoassays sind.

Allerdings ergeben sich einige Komplikationen im Gebrauch der Fluoreszenzmunoassays: Bei einigen Flüssigkeiten, die hohe Konzentrationen an Proteinen oder kolloidalen Partikeln aufweisen, kann es zu einer Zerstreuung des emittierten Lichts kommen. Organische Bestandteile und Unreinheiten in der Probe führen zu einer zusätzlichen, unerwünschten Fluoreszenz. Sie verursacht falsch hohe

Ergebnisse und macht dadurch eine Trennung der gebundenen von den ungebundenen Bestandteilen vor der Messung notwendig (DUDLEY, 1990). Schließlich entsteht eine Dämpfung der spezifischen Fluoreszenz aufgrund unspezifischer Bindungen, eine pH-Wert Änderungen oder eine Einwirkung von chemischen Bestandteilen. Diesen Störfaktoren könnte mit Hilfe einer vorangehenden Bearbeitung oder Reinigung der zu untersuchenden Probe oder eines heterogenen Trennungsschrittes entgegengewirkt werden (NAKAMURA und BYLUND, 1997).

3.5. Chemilumineszenzimmunoassay

Chemilumineszenz bedeutet, dass bei einer chemischen Reaktion Licht entsteht, das emittiert und somit gemessen werden kann (DUDLEY, 1990). Der Unterschied zur Fluoreszenz besteht in der Energiequelle, die die Moleküle energetisch anregt. Im Falle der Chemilumineszenz werden die Moleküle durch eine chemische Reaktion auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Verlassen dieser Stufe wird die vorher aufgenommene Energie in Form von Licht freigesetzt (KRICKA, 1991; 1997). Dieses emittierte Licht hat im Gegensatz zur ausgesandten Lichtenergie bei der Fluoreszenz eine wesentlich längere „Haltbarkeit“, wodurch es auch bei sensiblen Methoden, die mit Membranen oder durch Belichtung von Fotofilmen oder Röntgenfilmen arbeiten, angewendet werden kann (KRICKA, 1991).

Die Sensitivität von Chemilumineszenzassays ist, unabhängig von der Größe der Moleküle, um ein Vielfaches höher als bei den bisher verwendeten Assaymethoden (DUDLEY, 1990). Häufig messen sie noch in extrem niedrigen Konzentrationen und haben gleichzeitig eine sehr breite Messspanne (KNIGHT, 1999). Die meisten Assays benötigen keine Trenn- oder Waschschrifte, wodurch die Testdauer deutlich weniger Zeit in Anspruch nimmt als bei anderen Verfahren. Oft besitzen sie eine hohe Spezifität, sind einfach in der Handhabung, das benötigte Material ist nicht sehr teuer (KNIGHT, 1999) und - wie erwähnt - ist die Haltbarkeit des emittierten Lichts länger (z. T. hält die Leuchtkraft über Tage). Dadurch kommt es zu einer Vereinfachung der Handhabung der Tests. Außerdem ist bisher nicht bekannt, dass von den Reagenzien eine Gefahr für die Gesundheit ausgeht. Somit ist der Umgang mit diesen Testreagenzien vereinfacht

und erfordert keine besondere Qualifikation (KRICKA, 1991; 1997). Bei der Validierung für die Humanmedizin konnte eine ebenso gute oder zum Teil sogar bessere Wiederfindungsrate wie mit den bisher verwendeten radioaktiven Messverfahren festgestellt werden (DUDLEY, 1990; BABSON et al., 1991).

Auch bei dieser Technik gibt es zwei verschiedene Verfahren, den heterogenen und homogenen Chemilumineszenzassay, wobei wiederum auch hier beim homogenen Assay die Bindung des Antikörpers an das Lumineszenz markierte Antigen dieses so verändert, dass Licht emittiert wird, ohne dass ein Zwischenschritt zur Trennung von gebundenen und ungebundenen Liganden notwendig wird.

Es gibt unterschiedliche Stoffe, die in der Lage sind, eine Lumineszenz-Reaktion durchzuführen, z. B. Luminol, Lucigenin, Peroxyoxalates, Acridinester, tris(2,2'-bipyridyl)Ruthenium (II) ($\text{Ru}(\text{bpy})^{2+}_3$) und andere Metalle. Luminol und seine Derivate sind klassische Substrate bei der Chemilumineszenzreaktion und haben auch in Immunoassays Anwendung gefunden. Für ihre Reaktion benötigen sie Katalysatoren, wodurch der Testablauf komplizierter und außerdem die Grundlage für Störfaktoren geschaffen wird. Zusätzlich sind diese Reaktionen pH-Wert abhängig, was eine besonders sorgfältige Handhabung voraussetzt. Der größte limitierende Faktor bei der Verwendung von Luminol als Marker für Immunoassays ist die Beeinflussung der Lichtemission durch Bindung an Proteine oder Polypeptide (DUDLEY, 1990).

Weitere brauchbare Marker für Immunoassays stellen Acridinester dar. Sie benötigen keinen Katalysator, um zu reagieren, die Lichtreaktion ist schnell und es gibt wenige Störfaktoren. Die markierten Reagenzien sind sehr stabil und somit länger lagerungsfähig (DUDLEY, 1990).

Unter den Chemiluminesenzsystemen ist die elektronisch provozierte (induzierte) Ruthenium ($\text{Ru}(\text{bpy})^{2+}_3$)-Chemilumineszenz einzigartig. Sie hat zusätzlich zu den Vorteilen der Chemilumineszenzassays hinsichtlich Sensitivität und Spezifität als analytische Technik weitere Vorzüge. Bei der Elektrochemilumineszenz ist die Chemilumineszenz das direkte oder indirekte Ergebnis einer elektrochemischen Reaktion (LEE, 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Gerät, das auf Basis der enzyminduzierten Chemilumineszenz arbeitet, validiert. Die Chemilumineszenz-Reaktion wird ausgelöst durch Zugabe des Chemilumineszenzsubstrates Lumino-Phos 530, basierend auf Dioxetan, das durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert wird; dies hat die Emission von Licht zur Folge (BECKMAN COULTER, 1999).

Das zweite der Validierung unterzogene Gerät arbeitet mit der Elektro-Chemilumineszenz-Technologie (ECL-Technologie). Um die Lumineszenz-Reaktion auszulösen, wird eine positive Spannung an einer Platinelektrode angelegt (NICHOLAS et al., 1996), durch die entstehende Spannung werden sowohl der Ruthenium-Komplex als auch Tripropylamin (TPA, ProCell) oxidiert. TPA wirkt in diesem Zustand als starkes Reduktionsmittel und gibt ein weiteres Elektron an den Ruthenium-Komplex ab. Dadurch gelangt Ruthenium in einen angeregten Zustand, aus dem es durch Abgabe von Lichtenergie wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Dieser Vorgang ist für den Ruthenium-Komplex unendlich wiederholbar. Das einzige, was in dieser Reaktion verbraucht wird, ist Tripropylamin (ROCHE DIAGNOSTICS, 1999).

Durch ihr extrem niedriges Molekulargewicht (ca. 1000 Dalton) sind die Elektrochemilumineszenz-Marker wie auch das Ruthenium vielfältig einsetzbar, da sie die Antigen-Antikörper-Reaktion nicht beeinflussen und auch keinen Effekt auf die Löslichkeit oder auf sonstige Eigenschaften der Moleküle haben (BLACKBURN et al., 1991, HOYLE et al. 1996).

4. Parallelen in Diagnostik und Therapie in der Humanmedizin

Viele der Erkenntnisse im Zusammenhang mit den hier besprochenen Hormonen und den jeweils aus ihrer Über- bzw. Unterproduktion entstehenden Krankheiten stammen aus der Humanmedizin oder wurden zuerst beim Menschen festgestellt. Während der Erforschung der Ursachen und Folgen von Krankheiten bei Tieren stieß man auf die große Ähnlichkeit bei Mensch und Tier sowohl hinsichtlich deren Funktion als auch hinsichtlich der Steuerung der Produktion und Sekretion der beschriebenen Hormone. Daraus ergibt sich auch die Vergleichbarkeit im Hinblick auf die beschriebenen Krankheitsbilder in der Human- und Veterinärmedizin, wenn auch z.T. nicht immer die

gleichen Ursachen für die Entstehung der einzelnen Krankheiten verantwortlich gemacht werden können: Beispielsweise konnte der Morbus Basedow des Menschen bisher nicht bei der Katze als Ursache für eine Hyperthyreose nachgewiesen werden (FELDMAN und NELSON, 1996).

Die aus der Dysfunktion der jeweiligen Hormondrüse oder ihrer Regulationsmechanismen sich ergebenden Krankheiten werden in der Humanmedizin ebenso wie in der Veterinärmedizin über die Bestimmung der dazugehörigen Hormone auch in Verbindung mit entsprechenden Funktionstests diagnostiziert (TOMSA et al., 2001). In der Humanmedizin bedient man sich unterschiedlicher Testverfahren zur Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Blut, wie bereits oben beschrieben (VOIGT, 1996). Die Forschung ist dementsprechend, auch um den steigenden Anforderungen entsprechen zu können, fortwährend damit beschäftigt, modernere Geräte und Testverfahren zu entwickeln. Diese sollen präziser, schneller, in der Handhabung einfacher und mit weniger Personalaufwand einsetzbar sein. Auch gesundheitlich unbedenkliche Testverfahren zu entwickeln liegt im Interesse der Hersteller und der Anwender (JOHN, 1999). Gleichzeitig liegt das Interesse der Laboratorien auch darin, die Anzahl der Geräte, die für die Diagnostik notwendig sind, zu verringern. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, Messinstrumente zu entwickeln, die mit einem Messverfahren möglichst viele Substanzen gleichzeitig bestimmen können (VAN LENTE, 1997). Die Geräte finden ihren Einsatz hauptsächlich in der Früherkennung und Behandlung von Krankheiten, zur Sicherung der Diagnosestellung und zur besseren Einschätzung der Prognose (JOHN, 1999).

Entsprechend dem deutlich geringeren wirtschaftlichen Einfluß der Veterinärmedizin auf die Medizintechnik, werden die Geräte zur Messung der einzelnen Hormone primär für den Einsatz in der Humanmedizin konzipiert. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, Geräte vor dem Einsatz in der Veterinärmedizin auf ihre Brauchbarkeit bezüglich der Messung von Tierproben zu überprüfen (REIMERS et al., 1981).

5. Vergleiche mit anderen Studien und anderen Messverfahren

Im Vergleich zur Tiermedizin existieren in der Literatur der Humanmedizin deutlich mehr Veröffentlichungen im Hinblick auf die Anwendbarkeit und Vergleichbarkeit von Chemilumineszenzenzym-Immunoassays und Elektrochemilumineszenz-Immunoassays. In der tiermedizinischen Literatur finden sich hauptsächlich Studien über die Validierung von ELISA- und RIA-Methoden, die sich jedoch zu einem großen Teil auf die Anwendung beim Hund beziehen; eine sehr geringe Anzahl der Studien beschäftigt sich mit dem Einsatz dieser Methoden bei der Katze.

Bei der Validierung von immunologischen Assays treten in der Regel bei niedermolekularen Antigenen (z.B. Trijodthyronin, Thyroxin oder Kortisol) weniger Schwierigkeiten hinsichtlich der Spezifität als bei großen Proteinmolekülen (z.B. TSH oder Gonadotropine) auf. Im Gegensatz zu den niedermolekularen Hormonen weisen diese Hormone speziesspezifische Unterschiede in ihrem Aufbau und ihrer Struktur auf (REIMERS et al., 1981).

Schilddrüsenhormone T3, fT3, T4 und fT4

Thyreoglobulin, ein Glykoprotein, ist der Grundbaustein für die beiden Schilddrüsenhormone Trijodthyronin und Tetrajodthyronin (Thyroxin). Thyreoglobulin wird jodiert, wodurch Monojod- und Dijodtyrosylreste entstehen. Diese wiederum kondensieren miteinander zu Trijodthyronin oder Tetrajodthyronin. Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch nicht näher bekannt (VOIGT, 1996). Bei Bedarf werden dann in den Epithelzellen T3 und T4 enzymatisch aus dem Thyreoglobulin freigesetzt (BAMBERG, 1987). Die entstandenen Hormone sind sowohl bei den einzelnen Tierarten als auch beim Menschen strukturell gleich aufgebaut.

In der Arbeit von ANDERSON und BROWN (1979) wurde ein humanmedizinischer RIA zur Bestimmung von T3 und T4 der Katze getestet. Es konnte eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse und somit eine Übertragbarkeit der RIA-Methode mit den entsprechenden hoch spezifischen Antikörpern von Humanproben auf Katzenproben festgestellt werden.

REIMERS et al. (1981) fanden ebenfalls in ihrer Validierung eines Radioimmunoassays für T3, T4 und Kortisol von Hunden, Katzen und Pferden eine hervorragende Übereinstimmung der Ergebnisse. Sie kamen zu dem Schluß, dass der humanmedizinische Assay auch in der Veterinärmedizin Anwendung finden kann, da er mit sehr hoher Spezifität die einzelnen Parameter auch in Tiersera mißt.

DONNE und WILDGOOSE (1984) untersuchten die Anwendbarkeit von Immunoassays zur Bestimmung von T3 und T4 in Hunde- und Katzenseren, deren Antikörper kovalent an magnetische Partikel gebunden sind. Der Test zur Thyroxinbestimmung wurde geringgradig modifiziert, da der T4-Wert des Menschen deutlich höher liegt als der von Hund und Katze. Mit Hilfe der Erweiterung der Eichkurve wurde eine höhere Genauigkeit und eine verbesserte Präzision erreicht. Die Tests erwiesen sich in dieser Studie als ebenso sicher in der Veterinärmedizin einsetzbar wie bereits etablierte Test mit anderen Festphasen. Auch konnten keine Affinitätsunterschiede der T3- und T4-Antikörper (vom Schaf) hinsichtlich der von verschiedenen Spezies stammenden Antigene (T3 und T4) festgestellt werden (DONNE und WILDGOOSE, 1984).

Verschiedene Autoren haben bereits Studien hinsichtlich der Verwendbarkeit von Chemilumineszenz-Verfahren zur Bestimmung der einzelnen Schilddrüsenhormone bei Hund und Katze durchgeführt.

1988 evaluierten BOUNAUD et al. einen Chemilumineszenzimmunoassay für fT4 und verglichen ihn mit einem Radioimmunoassay. Die Variationskoeffizienten für die Präzisionsprüfung lagen unter 10 % und auch die Korrelation der Ergebnisse der beiden Verfahren wurde als gut bewertet.

PUILLE et al. (2000) konnten in ihrer Arbeit mit dem Chemilumineszenz-Verfahren die Kompatibilität dieser Methode aus der Humanmedizin für die Messung der Schilddrüsenhormone bei der Katze nachweisen. Sie fanden eine sehr gute Reproduzierbarkeit für die nicht proteingebundenen Hormone fT3 und fT4 und eine noch gute Reproduzierbarkeit für die gebundenen Hormone T3 und T4. Da mit humanenmedizinischen Assays gemessen wurde, verglichen sie die Korrelation der einzelnen Parameter untereinander und erhielten Korrelationskoeffizienten von 0,85 bis 0,97.

In der Studie von SINGH et al. (1997) wurde ein nichtradioaktiver Chemilumineszimmunoassay (CLIA) und ein nicht radioaktiver Chemilumineszenz-enzymimmunoassay (CLEIA) für T4 bei Hunden, Katzen, Pferden und Menschen mit Hilfe eines bereits für die Veterinärmedizin validierten Radioimmunoassay evaluiert. In dieser Studie konnten für das Humanserum eine sehr gute Wiederfindung, Linearität und Präzision nachgewiesen werden und die Ergebnisse der drei Methoden wurden als vergleichbar angesehen. In den Serumproben der einzelnen Tierarten lagen die Werte, die mit Hilfe des Chemilumineszimmunoassays bestimmt worden waren, im Vergleich zum RIA deutlich niedriger bei guter Linearität zu den Vergleichsmethoden. SINGH et al. (1997) vermuten, dass diese geringere Wiederfindungsrate im Zusammenhang mit den verwendeten T4-Antikörpern steht. Die Affinität des verwendeten Antikörpers ist gegenüber dem menschlichen T4 höher als gegenüber dem tierischen T4. Bedingt auch dadurch, dass ein auf Humanblut basierender Kalibrator verwendet wurde, liegen die gemessenen Werte dementsprechend im niedrigeren Bereich. SINGH et al. (1997) schließen aus ihrer Studie, dass die bei RIA und CEIA verwendeten Antikörper eine vergleichbar gute Bindung für humanes Hormon wie für Hormone tierischen Ursprungs aufweisen.

PARADIS und PAGÉ (1996) verglichen die Chemilumineszenz-Technik zur Bestimmung von fT4 bei der Katze mit dem „Golden Standard“, der Gleichgewichtsdialyse. In dieser Studie konnte eine gute Übereinstimmung der beiden Verfahren nachgewiesen werden, allerdings lag der gemessene fT4-Wert bei dem Chemilumineszenz-Verfahren - aus den Autoren unbekannten Gründen - immer unter dem durch Dialyse bestimmten Wert. Für den Hund und den Menschen wurde eine hervorragende Übereinstimmung der beiden Verfahren zur fT4-Messung nachgewiesen (PARADIS und PAGÉ, 1996).

In der humanmedizinischen Studie von PATTERSON et al. (1994) zur Validierung von Geräten, die mit der Chemilumineszenz-Technik arbeiten, wurde ebenfalls festgestellt, dass die gemessenen Werte bestimmter Hormone unter den Werten der Vergleichsmethode (ELISA oder RIA) lagen. Die Ursache für diese Unterschätzung der Konzentrationen geht aus der Studie nicht hervor.

SÁNCHEZ-CARBAYO et al. (1999) evaluierten in ihrer Studie den Elektro-chemilumineszenz-Immunoassay Elecsys® 2010 auf seine analytische und klinische Anwendbarkeit zur Messung von TSH und der Schilddrüsenhormone T3 und fT4 beim Menschen. Die Methode wurde verglichen mit T3- und fT4-Werten, die mit Hilfe eines RIA gemessen, sowie mit TSH-Konzentrationen, die mit Hilfe eines IRMA bestimmt wurden. Die schlechte Korrelation zwischen den Ergebnissen für fT4 des RIA und des Elecsys® 2010 schreiben die Autoren eher den Mängeln der RIA-Methode zu. Um diese Annahme zu bestätigen, wäre es notwendig, die Validierung mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse, dem „Golden Standard“, für die Messung von fT4 durchzuführen. Dies war den Autoren im Rahmen ihrer Studie nicht möglich. Die Ergebnisse der T3-Messung korrelierten hervorragend mit den Ergebnissen des RIA. Abschließend kamen SÁNCHEZ-CARBAYO et al. (1999) zu dem Schluß, dass das Elecsys®-System hervorragend zur Messung der Schilddrüsenhormone inklusive TSH des Menschen geeignet ist und als Ersatz für die arbeitsaufwändigere und gesundheitlich bedenklichere RIA-Methode angewendet werden kann.

Kortisol

Bei Kortisol handelt es sich um ein Steroidhormon, das bei Mensch und Tier über verschiedene Zwischenstufen aus Cholesterin synthetisiert wird. Cholesterin ist Vorstufe für alle Kortikoide: Mineralokortikoide, Glukokortikoide und Androgene (BAMBERGER, 1987; VOIGT, 1996;). Dementsprechend unterscheidet sich die Struktur des Kortisols von Hund und Katze nicht von der des menschlichen Kortisol.

Aufgrund der Entstehung von Kortisol aus Cholesterin - entsprechend vielen anderen Steroiden - sind sich diese in ihrer Struktur sehr ähnlich, was bei der Messung der Kortisolkonzentration, z. B. mit fluorometrischen Methoden, häufig zu Ungenauigkeiten führen kann. Unterschiedliche Steroide werden mitgemessen, was wiederum zu einer fälschlich zu hohen Kortisolkonzentration führt. Zusätzlich zeigen fluorometrische Methoden eine schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Messtechniken, die mit kompetetiver Proteinbindung arbeiten, wie RIA, ELISA und Chemilumineszenz, weisen eine wesentlich höhere Affinität für Kortisol auf, woraus sich ein spezifischer Test mit einer guten Genauigkeit und Präzision ergibt (JOHNSTON und MATHER, 1978).

In der bereits oben erwähnten Studie von REIMERS et al. (1981) wurde neben den Schilddrüsenhormonen T3 und T4 auch die Anwendbarkeit von drei mit Anti-Kortisol-Antikörpern von Ratten arbeitenden RIA getestet. Die Variationskoeffizienten für die Präzisionsprüfung betrugen für die Intraassay-Präzision im Mittel 4,7 %, für die Interassay-Präzision im Mittel 13,0 %.

SINGH et al. (1997) haben die Chemilumineszenz-Technologie hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit bei der Messung von Kortisol im Serum von Hunden, Katzen und Pferden im Vergleich zum Humanserum getestet. Für Kortisol zeigte sich sowohl beim Chemilumineszenzimmunoassay als auch beim Chemilumineszenzenzymimmunoassay eine sehr gute Übereinstimmung hinsichtlich Wiederfindung, Linearität und Präzision der gemessenen Kortisolwerte aller Tierseren mit den Vergleichswerten aus der Messung mit einem Radioimmunoassay. Die verwendeten Antikörper zeigten eine vergleichbare Hormonbindung sowohl bei den Humanproben als auch bei den Tierproben.

Insulin

Hinsichtlich der Validierung von humanmedizinischen Immunoassays für die Tiermedizin zur Bestimmung von Insulin steht nur sehr wenig Literatur zur Verfügung. Häufiger finden sich Studien zur Validierung im Hundeserum, Studien mit Proben von Katzen werden in der Literatur nur vereinzelt erwähnt.

Möglicherweise liegt dieses Phänomen in der Tatsache begründet, dass sich die Insulinmoleküle der einzelnen Tierarten und das Insulin des Menschen strukturell unterscheiden. Das Insulin der Katze unterscheidet sich vom Insulin des Hundes in vier Aminosäuren, während das Hundeinsulin lediglich in einer Aminosäure von der Struktur des menschlichen Insulin abweicht (PETERSON, 1995). Insulin ist ein Polypeptid und besteht aus zwei Ketten (A- und B-Kette), die wiederum aus insgesamt 51 Aminosäuren zusammengesetzt und über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (KLOSTERMEYER, 1966). Brechen die Brücken auf, verliert Insulin seine biologische Aktivität. In der A-Kette finden sich speziesspezifische Unterschiede in den Positionen 8 und 10, in der B-Kette in Position 30. Dies kann eine Kreuzreaktivität der Antikörper

gegenüber fremdem Insulin bedingen oder speziespezifische Antikörper werden in den Immunoassays benötigt, um verwertbare Messergebnisse zu erhalten.

In der Studie von NELSON et al. (1990) wurde ein zur Messung von Humaninsulin hergestellter RIA zur Anwendung bei der Katze validiert. Die Messungen ergaben eine Sensitivität von 5 µU/ml, die Intraassay-Präzision lag mit einem Variationskoeffizienten von 3,7 % - 4,5 % unter 10,0 %. Der Interassay-Variationskoeffizient schneidet mit 5,4 % - 17,0 % deutlich schlechter ab, ist aber noch im akzeptablen Bereich. Die Wiederfindungsrate liegt bei 94,0 % – 109,0 %. Nelson et al. (1990) verwendeten zur Aufstockung des Serum felines und nicht humanes Insulin, welches sie aus felinem Pankreas extrahierten. Dies war für die vorliegende Studie nicht möglich und zur Zeit ist kein felines Insulin erhältlich, daher wurde das bei den Tests mitgelieferte humane Insulin verwendet. Beim Glukosetoleranztest konnte bei den gesunden Katzen ein Anstieg der Insulinkonzentration von 9 µU/ml und 13 µU/ml auf > 25 µU/ml bzw. >30 µU/ml gemessen werden.

Bei Vergleichen von verschiedenen Radioimmunoassays zur Messung von Insulin wurden bei der Messung von menschlichem Serum oder Plasma unterschiedliche Insulinkonzentrationen in der gleichen Probe festgestellt, je nachdem mit welchem Messprinzip und welcher Trennungsmethode der jeweilige RIA arbeitet (STOCKHAM et al., 1983). Die Autoren stellten in ihrer Studie auch unterschiedliche Insulinkonzentrationen bei der Messung von caninen Blutproben fest. Diese Differenzen führen sie auf verschiedene Gründe zurück: Unterschiedliche Insulinantikörper (Rind, Schwein), Effektivität des Waschschrifftes und auch Unterschiede hinsichtlich der Kalibration von Standardserien. Aus dieser Studie ergibt sich die Notwendigkeit, jeden Test einzeln zu validieren und vor allem für jeden Insulin-RIA die eigenen Referenzbereiche festzulegen (STOCKHAM et al., 1983).

WOOD und FRICKE (1982) verglichen in ihrer Studie zur Validierung eines Solide-Phase-Antigen-Lumineszenzmimmunoassays (SPALT) die Ergebnisse der Insulinbestimmung im menschlichen Serum mit Werten, die mit der herkömmlichen Radioimmunoassay-Methode gemessen wurden. Das Messprinzip beruhte ebenfalls auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion und ist sowohl in Spezifität als auch in der Reproduzierbarkeit gut vergleichbar mit der RIA-Methode. Die Nachweisgrenze lag mit

0,25 µU niedriger als beim RIA und die Variationskoeffizienten lagen deutlich unter 10,0 % (WOOD und FRICKE, 1982).

Kreuzreaktivität mit chemisch ähnlichen Verbindungen

Kreuzreaktivitäten in Bezug auf chemisch ähnliche Verbindungen der jeweiligen Assays (z. B.: TT4 - L-Thyroxin, TT3 - D-Trijodthyronin, Kortisol - Kortikosteron, Insulin von Rind und Schwein, usw.) sind in Studien der beiden Gerätehersteller bereits ausgeschlossen worden. Nähere Informationen dazu sind den jeweiligen Testbeschreibungen zu entnehmen und wurden im Rahmen dieser Studie nicht nochmals untersucht (ROCHE DIAGNOSTICS, 1999; BECKMAN COULTER, 1999).

Eigene Untersuchungen

6. Material und Methodik

6.1. Material

Zur Validierung der beiden Geräte, die der I. Medizinischen Tierklinik der LMU München zu diesem Zwecke in der Zeit März bis Oktober 2000 zur Verfügung gestellt wurden, - Beckman-Coulter Access® und Elecsys® 1010, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim - kamen Blutproben von gesunden und kranken Tieren zum Einsatz. Bei allen Tieren handelte es sich um Patienten der I. Medizinischen Tierklinik, die poliklinisch oder stationär behandelt wurden. Die Blutwerte sowohl kranker als auch gesunder Tiere wurden für die Gerätevalidierung verwendet. Zur Referenzwertbestimmung wurden ausschließlich Blutproben gesunder Tiere gemessen.

6.1.1. Tiere

Katzen zur Gerätevalidierung

Die Auswahl der Tiere basierte auf deren zugrundeliegender Krankheit, wobei es sich überwiegend um Katzen mit Hyperthyreose, Hepato- oder Nephropathien, sowie um Tumorpatienten handelte. Es gingen weiterhin auch Patienten in die Studie ein, die wegen Apathie und Anorexie vorgestellt wurden, um damit eine breite Messspanne der jeweiligen Hormone zu erreichen.

Bei den Tieren wurde eine klinische Allgemeinuntersuchung und eine labordiagnostische Untersuchung durchgeführt. Bei den kranken Tieren wurden zusätzlich noch krankheitsspezifische Spezialuntersuchungen wie Röntgen, Ultraschall oder Computertomographie durchgeführt.

Katzen zur Referenzwertbestimmung

Zur Ermittlung der Referenzwerte für die Schilddrüsenhormone und für Kortisol wurden Blutproben von 118 Katzen getestet. Für Insulin standen nur 115 Blutproben von gesunden Katzen zur Verfügung. Es handelte sich entweder um Tiere, die in der Poliklinik der I. Medizinischen Tierklinik der LMU München zur Impfung vorgestellt oder um Katzen, die von Privatpersonen zur Verfügung gestellt wurden. Entsprechend dem Vorbericht hatte keines der Tiere in den vier Wochen vor der Blutentnahme Medikamente, insbesondere Glukokortikoide, Phenobarbital oder Sulfonamide verabreicht bekommen.

Auch bei diesen Tieren wurde sowohl eine klinische Allgemeinuntersuchung wie auch eine labordiagnostische Untersuchung durchgeführt, um anhand dieser Untersuchungen den Gesundheitszustand der Tiere zu ermitteln. Die labordiagnostische Untersuchung umfasste die Anfertigung eines roten und weißen Blutbildes einschließlich Thrombozytenzählung. Klinisch-chemische Analysen beinhalteten die Konzentrationsbestimmung von Gesamtprotein, Albumin, Harnstoff, Kreatinin, Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Phosphor, Triglyceride, Cholesterin und Glucose sowie die Aktivitätsbestimmung von AST, ALT, AP, Lipase und CK.

In diese Studie wurden ausschließlich Tiere aufgenommen, die aufgrund dieser Untersuchungen als gesund eingestuft werden konnten.

6.1.2. Blutproben

Gewinnung

Das Blut wurde in allen Fällen aus der Vena cephalica antebrachii entnommen. Die Vene wurde dafür erst kurz vor der Punktionsstelle gestaut und die Punktionsstelle desinfiziert. Die Punktionsstelle erfolgte mit sterilen Einmalkanülen (Sterican® 0,9*40 mm, Firma B. Braun Melsungen AG), aus denen das Blut frei in die entsprechenden Probengefäße abfließt.

Für die Vollblutsammlung wurden EDTA-beschichtete Röhrchen (Firma Sarstedt) mit 2-ml-Probenvolumen verwendet. Das Blut wurde sofort im Anschluss an die Entnahme im Labor der hämatologischen Auswertung unterzogen.

Die Serumgewinnung erfolgte in 5-ml-unbeschichteten Probengefäßen (Firma Sarstedt). Nach der Entnahme kamen alle Blutproben sofort in das hausinternen Labor. Das Blut blieb vor der Zentrifugation (4000 U/min für fünf Minuten) ca. 20 min zur Koagulation bei Raumtemperatur unbehandelt stehen. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert. Soweit das Serum nicht sofort untersucht werden konnte, wurden die Proben entsprechend dem späteren Untersuchungszweck portioniert und bei -18° C eingefroren. Zur Messung notwendiger Serumparameter hinsichtlich des Gesundheitszustandes der Tiere behielt sich das Kliniklabor einen entsprechenden Teil zur Bearbeitung zurück.

Aufbereitung

Mindestens eine Stunde vor Beginn der Messungen zur Validierung der Geräte oder zur Referenzwertbestimmung wurden die tiefgefrorenen Proben bei Zimmertemperatur aufgetaut. Durch Bewegen auf einem Taumler ergab sich eine optimale Durchmischung der Proben bis zur endgültigen Beschickung der Geräte.

6.1.3. Testhormone und exogen zugeführte Testsubstanzen

Synacthen®

Zur Durchführung des ACTH-Stimulationstests wurde das humanmedizinische Präparat Synacthen® Injektionslösung mit dem Wirkstoff Tetracosactid der Firma Novartis Pharma verwendet.

Eine Ampulle (1 ml) enthält 0,25 mg (= 25 IU ACTH) dieses synthetischen Polypeptides mit adrenokortikotroper Wirkung. Die Lagerung des Präparats erfolgt

nicht über +8°C und vor Licht geschützt. Es ist zur intravenösen oder besonders beim Hund auch zur intramuskulären Applikation geeignet.

Für den Stimulationstest werden 0,125 mg pro Katze injiziert. Dreißig Minuten nach Injektion ist eine erhöhte Kortisolkonzentration messbar (KEMPPAINEN et al., 1984).

Carbimazol

Carbimazol findet Anwendung bei der Therapie der Hyperthyreose des Menschen und der Katze. In der Humanmedizin wird der Wirkstoff hauptsächlich als Kurzzeittherapeutikum vor anderen therapeutischen Maßnahmen zur Behandlung der Schilddrüsenüberfunktion eingesetzt.

Carbimazol wird im Körper zu Methimazol verstoffwechselt und erhält damit seinen antithyreoidalen Effekt, indem es die Umwandlung von anorganischem zu organischem Jod und die Kondensation von Monojodthyronin und Dijodthyronin zu Tri- und Tetrajodthyronin verhindert (FRANKLYN, 1994)

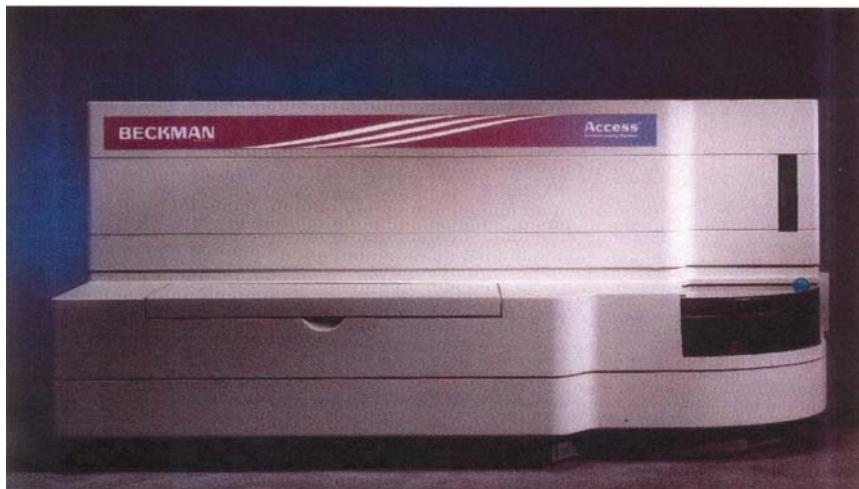
In der Tiermedizin ist Carbimazol häufig bei guter Verträglichkeit als Dauertherapeutikum, insbesondere bei Katzen mit gleichzeitiger Niereninsuffizienz (BUCKNELL, 2000), im Einsatz. Die Vorteile des Medikaments liegen in der Verabreichung durch den Besitzer, es kann auch der ältesten Katze gegeben werden (im Gegensatz zum chirurgischen Eingriff) und Effekte, die durch die Medikamentengabe entstehen, sind nach dem Absetzen wieder reversibel. Dementsprechend ist Carbimazol auch nicht in der Lage, die Hyperthyreose zu heilen (KINTZER, 1994). In einigen Fällen dient es allerdings auch nur als vorbereitende Behandlung zum Erreichen der Euthyreose vor der chirurgischen Entfernung der Schilddrüse oder der Behandlung mit radioaktivem Jod.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Katzen mit Hyperthyreose Carbimazol 5 mg der Firma Henning Berlin GmbH & Co. OHG als Initialdosis zweimal täglich verabreicht. Zur Therapiekontrolle wurde nach zwei Wochen neben der klinischen Untersuchung auch eine Kontrolle der Schilddrüsenhormon-Konzentrationen durchgeführt.

6.1.4. Geräte

6.1.4.1 Beckman Coulter Access®

Der Beckman Coulter Access® ist ein, für die Humanmedizin konzipiertes, vollautomatisches Immunoassay-System zur Durchführung von Chemilumineszenz-Tests der Firma Beckman-Coulter, Inc.. Zur Validierung dieses Gerätes wurden die Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone T3, fT3, T4 und fT4 sowie Kortisol und Insulin im Katzenserum gemessen.



Beckman Coulter Access®

Durch die Fähigkeit des Gerätes zum Random-Access-Betrieb besteht die Möglichkeit, gleichzeitig mehrere Proben in verschachtelter Abarbeitung zu untersuchen. Nach Beladung des Gerätes mit den vorgegebenen Probenmengen erfolgt der Ablauf der Probenbearbeitung und –messung vom Pipetieren der Proben über die Inkubation mit den Reagenzien bis zur Messung der entstandenen Lichtsignale im Luminometer vollautomatisch. Die erzeugte Lichtintensität, Extinktion, wird in Form eines elektronischen Signals an die Elektronik-Einheit weitergeleitet. Die Umrechnung erfolgt anhand einer Kalibrationskurve in die entsprechende Einheit. Die Kalibration wird in assayspezifischen Abständen sowie bei Verwendung neuer Reagenzien-Chargen und bei unbefriedigenden Ergebnissen im Rahmen der Qualitätskontrolle durchgeführt und mit Hilfe eines Kontrollserums vor jedem Lauf überprüft.

6.1.4.2 Elecsys® 1010

Der Elecsys® 1010 ist ein vollautomatisches Multibatch-Analysensystem zur Bestimmung von immunologischen Tests nach der Electrochemilumineszenz-Technologie der Firma Roche Diagnostics, Mannheim. An diesem Gerät wurden ebenfalls die Messungen der Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone T3, FT3, T4 und FT4 sowie von Kortisol und Insulin zur Validierung vorgenommen. Ferner wurden an diesem Gerät 118 Blutproben von Katzen zur Referenzwertbestimmung der Schilddrüsenhormone T3, FT3, T4, FT4, Kortisol und 115 Blutproben zur Referenzwertbestimmung von Insulin gemessen.



Roche, 1999

Auch bei diesem Gerät erfolgt das Pipetieren, Inkubieren und Messen der Proben, mit denen das Gerät zuvor beschickt wurde, vollautomatisch. Im Photomultiplier wird das bei der Elektrochemilumineszenz-Reaktion emittierte Licht erfasst und in Messsignale umgewandelt, die dann ebenfalls anhand einer bestehenden Kalibrationskurve entsprechend umgerechnet werden.

6.1.4.3 Sonstige Geräte

Alle weiteren Blut- und Serumparameter wurden im Labor der I. Medizinischen Tierklinik im Rahmen der Routinemessungen bestimmt.

Die hämatologischen Parameter, einschließlich der Thrombozytenzählung, wurden mit Hilfe des CELL-DYN® 3500 (CD 3500, Abbott Diagnostics Division, Abbott Park, Illinois 60064, USA) erstellt.

Die Analyse der chemischen Parameter aus dem Serum wurde mit dem vollautomatischen Analysegerät Hitachi 912® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) vorgenommen.

6.2. Methodik

6.2.1. Validierung des Beckman Coulter Access® und des Elecsys® 1010

Die für die Validierung verwendeten Serumproben wurden nach der Gewinnung aus den Blutproben in entsprechende Portionen aufgeteilt und tiefgefroren, um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden.

6.2.2. Qualitätskontrolle

Die statistische Qualitätskontrolle gewährleistet die Zuverlässigkeit bei der Ermittlung von Analysenergebnissen. „Zuverlässigkeit“ fasst als Oberbegriff im Rahmen der Qualitätskontrolle die Begriffe Präzision und Richtigkeit zusammen. Weitere Kriterien für die analytische Zuverlässigkeit sind die Spezifität und die Sensitivität.

6.2.2.1 Präzision

Präzision ist das Ausmaß der Übereinstimmungen von Ergebnissen wiederholter Messungen. Sie wird durch zufällige Fehler sowie die methodische Streuung eingeschränkt, die proben-, sach- und personenbedingt sind. Präzision in der Serie

ist das unter identischen Bedingungen gewonnenen Analysenergebnis innerhalb eines Testlaufes. „Präzision von Tag zu Tag“ wird mit gleicher Methodik am gleichen Probenmaterial unter gleichen Bedingungen in unterschiedlichen Messungsläufen ermittelt.

Bei der Prüfung der Präzision von medizinischen Messmethoden wird die Intraassaypräzision durch mehrfache Messungen der gleichen Probe innerhalb eines Laufes getestet. Die erhaltenen Ergebnisse der einzelnen Messungen sollten möglichst nah beieinander liegen.

Mit Hilfe des Interassay wird die Präzision eines Gerätes in verschiedenen Läufen und an verschiedenen Tagen mit dem selben Probenmaterial unter den gleichen Bedingungen bestimmt. Auch in diesem Fall wird erwartet, dass die Ergebnisse nah beieinander liegen.

Als Maß für die Präzision gilt der Variationskoeffizient (VK) als Ausdruck für die Intra- und Interassay-Abweichungen. Der Variationskoeffizient gibt an, wieviel Prozent des Mittelwertes (x) die Standardabweichung (s) beträgt:

$$\text{VK (in \%)} = (s \times 100)/x$$

6.2.2.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit ist das Ausmaß der Übereinstimmung zwischen dem Messergebnis und dem Sollwert. Systematische Fehler begrenzen die Richtigkeit einer Methode.

Zur Prüfung der Richtigkeit eines Gerätes dient die Wiederfindungsrate. Dabei wird zu einer Serumprobe, deren Ausgangskonzentration bestimmt wurde, ein Standardserum mit bekannter Konzentration zugefügt. Durch Addition der Ausgangskonzentration der Serumprobe zu der Konzentration des Standardserums ergibt sich rechnerisch der „Sollwert“. Dieser wird mit dem vom Gerät gemessenen

„Istwert“ verglichen. Die Wiederfindungsrate ergibt sich rechnerisch als Dreisatz aus dem Sollwert, der hundert Prozent darstellt, und dem dazu errechneten Prozentsatz für den gemessenen Istwert. Im Idealfall beträgt die Wiederfindungsrate 100 %.

Über Stimulation oder Suppression kann die biologische Richtigkeit des jeweiligen Hormons getestet werden. Die biologische Richtigkeit bezüglich der Schilddrüsenhormone T3, FT3, T4 und FT4 wurde an hyperthyreoten Katzen getestet, indem Schilddrüsenwerte gemessen und archiviert wurden. Anschließend erhielten die Katzen Carbimazol 5 mg Tabletten zur Therapie der Hyperthyreose. Nach einem Zeitraum von zwei Wochen erfolgte eine Therapiekontrolle, bei der den Katzen erneut Blut abgenommen und die Schilddrüsenwerte bestimmt wurden.

Der ACTH-Stimulationstest dient zur Prüfung der biologischen Richtigkeit von Kortisol an gesunden Katzen. Nach Entnahme der Blutprobe für die Bestimmung des Ausgangswertes wurde den Katzen 0,5 ml Synacthen® intravenös injiziert. 30 und 60 Minuten später wurden weitere Blutproben zur Kortisolbestimmung entnommen.

Bei der Prüfung der biologischen Richtigkeit von Insulin nahmen Katzen an der Studie teil, die mindestens 24 Stunden nüchtern waren und auch in dieser Zeit keine Infusionstherapie bekommen hatten. Waren diese Voraussetzungen erfüllt, wurde den Tieren Blut abgenommen. Anschließend erhielten sie Futter. Eine halbe Stunde nach Futteraufnahme wurden den Tieren nochmals Blut entnommen. Wie auch beim ACTH-Stimulationstest handelte es sich bei diesen Probanden um gesunde Tiere, die für diese Studie von Privatpersonen zur Verfügung gestellt wurden.

6.2.2.3 Spezifität

Spezifität definiert die Eignung einer analytischen Methode zur Erfassung des deklarierten Analyten bei gleichzeitiger Unempfindlichkeit gegenüber dem Einfluss anderer Komponenten. Die Spezifität ist ein wichtiges und sehr aufwändiges Kriterium der Validierung.

Zur Prüfung der Spezifität der Geräte hinsichtlich der Schilddrüsenhormone wurden aus dem Katzenserum durch 24-stündige Inkubation des Serums mit Aktivkohle auf einem Taumler die Schilddrüsenhormone extrahiert. Anschließend wurde das Serum durch Filtration von den Kohleresten gereinigt. Das auf diese Weise vorbereitete Serum wurde im Vergleich zu einem vom Hersteller mitgelieferten Nullstandard gemessen. Im Serum befindliche Stoffe, die auch mit den Antikörpern gegen die Schilddrüsenhormone reagieren, würden bei der Messung des Serums nach der Extraktion der Schilddrüsehormone eine Extinktion ergeben.

Für die zusätzlich getesteten Hormone Kortisol und Insulin wurde wegen des extrem hohen Aufwandes auf die bereits vom Hersteller durchgeführten Untersuchungen Bezug genommen.

Als ein weiteres Kriterium für die Spezifität der Tests kann die Linearität von Verdünnungsreihen herangezogen werden. Dafür werden die Katzenseren, bei denen zuvor der Ausgangswert gemessen wurde, mit entsprechenden Nullstandards in bestimmten Verhältnissen verdünnt und anschließend erneut die Hormonkonzentration gemessen. Die Ergebnisse werden mit dem rechnerisch ermittelten Sollwert verglichen und hinsichtlich der Linearität des Konzentrationsabfalls bewertet.

6.2.2.4 Sensitivität

Die Sensitivität ist definiert als die niedrigste messbare Konzentration, die vom Leerwert noch sicher unterschieden werden kann; es handelt sich um die untere Nachweisgrenze. Sie ist berechnet als die Konzentration, die zwei Standardabweichungen oberhalb des niedrigsten Standards liegt.

6.2.3. Testbeschreibung

6.2.3.1 Beckman Coulter Access®

Messung von Gesamt T4

Bei diesem kompetitiven Enzymimmunoassay wird die Probe zusammen mit einem Thyroxin-Antikörper, dem Konjugat und an Antikörper gekoppelte paramagnetische Partikel in ein Reaktionsgefäß gegeben. Thyroxin aus der Probe konkurriert mit dem Konjugat um die Bindungsstellen an, in limitierter Anzahl vorliegenden, Thyroxinantikörpern. Die entstandenen Antigen-Antikörperkomplexe binden an den Antikörper der Festphase. Ungebundenes Material wird durch Trennung im Magnetfeld und anschließendes Waschen entfernt. Durch Zugabe des Chemilumineszenz-Substrates Lumi-Phos® 530 entsteht bei der Dephosphorylierung Licht, dessen Intensität umgekehrt proportional zur Analytenmenge ist. Diese Menge wird anhand der gespeicherten Kalibrationskurve errechnet.

Messung von freien T4

Auch in diesem Fall handelt es sich um ein Zwei-Schritt-Enzymimmunoassay. Während der ersten Inkubation bindet der an Biotin gebundene Anti-T4-Antikörper an die mit Streptavidin beschichtete Festphase über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen und an das freie T4 aus der Probe. Überschüssiges Material wird mit Hilfe der Magnetfeldtrennung und Waschung aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Das in bekannter Menge zugefügte T4-alkalische-Phosphatase-Konjugat reagiert mit den noch freien Bindungsstellen des Anti-T4-Antikörpers. Nach erneutem Trennen und Waschen ergibt die Zugabe des Chemilumineszenz-Substrates Lumi-Phos® 530 eine Lichtemission. Die Intensität des freigesetzten Lichts verhält sich umgekehrt proportional zur Menge des freien T4 in der Probe. Die Bezugskurve wird wieder zur Berechnung der Analytenmenge herangezogen.

Messung von Gesamt T3

Access® Total T3 ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. T3 aus der Serumprobe konkurriert mit in bekannter Menge dem Reaktionsgefäß zugefügtem, an Biotin gekoppeltem Substrat (T3-Analog) um ein Anti-T3-Antikörper-Konjugat mit alkalischer Phosphatase. Die T3-Analog-Antikörperkomplexe binden über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen an die Streptavidin beschichtete Festphase, während Antigen-Antikörperkomplexe mit T3 aus der Serumprobe und andere nicht an die Festphase gebundenen Stoffe durch Magnetfeldtrennung und Waschung aus dem Reaktionsgefäß entfernt werden. Das Chemilumineszenz-Substrat Lumi-Phos® 530 wird dem Reaktionsgefäß zugefügt und das bei der Dephosphorylierung des Substrats gebildete Licht im Luminometer gemessen. Die Intensität des gemessenen Lichts verhält sich umgekehrt proportional zu der Menge des in der Probe enthaltenen Gesamt T3. Die Extinktion wird anhand einer Kalibrationskurve in die entsprechende Einheit umgerechnet.

Messung von freiem T3

Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven Zwei-Schritt-Enzymimmunoassay. Eine Probe wird zusammen mit einem Antikörper gegen Trijodthyronin und paramagnetischen Partikeln, die mit einem Captureantikörper beschichtet sind, in ein Reaktionsgefäß gegeben. Während der ersten Inkubation reagiert das freie T3 der Probe mit dem Trijodthyronin-Antikörper zu einem Komplex, der sich an den Captureantikörper anlagert. Nicht gebundenes Material wird durch Trennung im Magnetfeld und Waschung entfernt. Im zweiten Inkubationsschritt lagert sich mit alkalischer Phosphatase markiertes Trijodthyronin an die noch freien Bindungsstellen des Trijodthyronin-Antikörpers. Nicht gebundenes Material wird wieder entfernt und nach Zugabe des Chemilumineszenz-Substrates Lumi-Phos® 530 wird das bei dieser Reaktion entsandte Licht mit dem Luminometer gemessen. Es ist umgekehrt proportional der Menge an freiem T3 in der Probe. Die Umrechnung erfolgt wieder anhand der Kalibrationskurve.

Messung von Kortisol

Bei diesem kompetitiven, enzymatischen Immunoassay wird die zu messende Probe, Kaninchenantikörper gegen Kortisol, ein Kortisol-alkalische-Phosphatase-Konjugat und mit Ziege-anti-Kaninchenantikörper gekoppelte paramagnetische Partikel in ein Reaktionsgefäß gegeben. Das Kortisol aus der Probe und das Kortisol-alkalische-Phosphatase-Konjugat konkurrieren um die limitierten Bindungsstellen des Kaninchen-Anti-Kortisolantikörpers. Die entstandenen Antigen-Antikörperkomplexe binden an die paramagnetischen Ziegenantikörper. Durch Anlegen einer Spannung werden die an die paramagnetischen Antikörper gebundenen Komplexe im Magnetfeld fixiert und durch Waschung wird ungebundenes Material aus dem Reaktiongefäß entfernt. Die Lichtreaktion entsteht durch Zugabe des Chemilumineszenz-Substrates Lumi-Phos® 530. Die Intensität des emittierten Lichts ist umgekehrt proportional zur Menge des Kortisols der analysierten Probe. Die Berechnung erfolgt anhand der gespeicherten Bezugskurve.

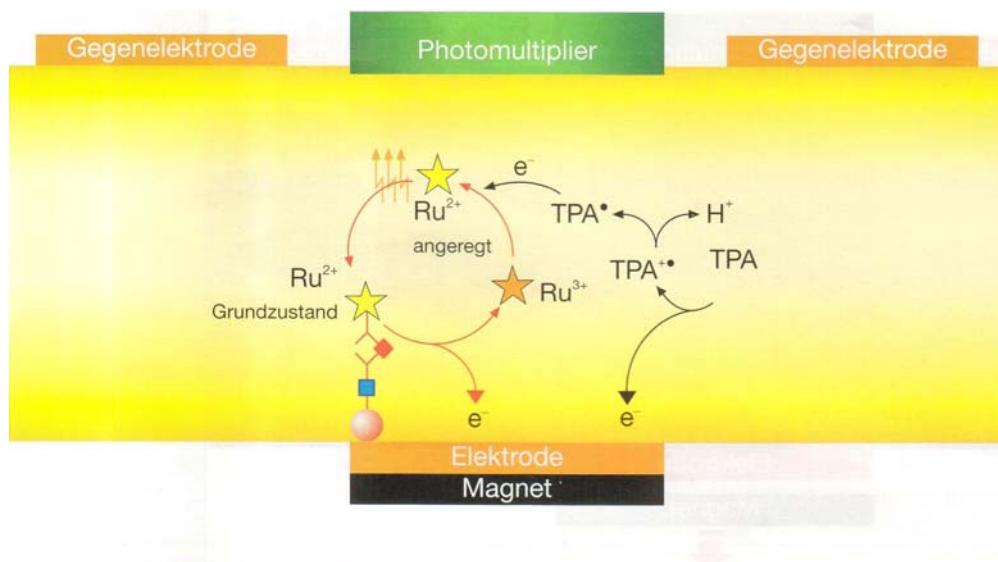
Messung von Insulin

Der Access® Ultrasensitive-Insulin-Test ist ein Einschritt-Enzymimmunoassay vom Sandwich-Typ. Die zu messende Probe wird zusammen mit zwei monoklonalen Mausantikörpern gegen Insulin, einer mit alkalischer Phosphatase, der andere mit paramagnetischen Partikeln gekoppelt, in ein Reaktionsgefäß gegeben. Vorhandenes Insulin wird vom paramagnetischen Antikörper, der als Festphase dient, eingefangen, während der mit alkalischer Phosphatase markierte Antikörper an einem anderen Antigenepitop des Insulinmoleküls reagiert. Ungebundenes Material wird durch Trennung im Magnetfeld und durch Waschung entfernt. Bei der enzymatischen Reaktion des Konjugats mit dem Chemilumineszenz-Substrat Lumi-Phos® 530 entsteht Licht, dessen Intensität mit dem Luminometer gemessen wird. Die gemessene Lichtintensität ist direkt proportional zur Menge des Insulins aus der Probe. Die Extinktion wird mit Hilfe der Kalibrationskurve umgerechnet.

6.2.3.2 Elecsys® 1010

Messung von Gesamt T3, freies T3, Gesamt T4 und freies T4

Es handelt sich bei allen Test zur Bestimmung der Schilddrüsenhormone um einen kompetitiven Immunoassay. Die Hormone aus den Patientenproben konkurrieren mit dem jeweiligen an Biotin gekoppelten Schilddrüsenhormon um die Bindungsstellen an einem mit Ruthenium-Komplex markierten spezifischen Antikörper. Die so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe mit den biotinmarkierten Hormonen werden mit Hilfe von mit Streptavidin beschichteten, paramagnetischen Mikropartikeln über die Wechselwirkung von Biotin mit Streptavidin gebunden. Dieses Gemisch wird in die Messzelle überführt, die paramagnetischen Mikropartikel werden durch magnetische Wirkung auf der Elektrode fixiert und die ungebundenen Substanzen durch Waschung entfernt.



Arbeitsprinzip des Elecsys 1010, Roche, 1999.

Durch Anlegen einer positiven Spannung wird die Chemilumineszenz-Emission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Die Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt.

Zur Bestimmung von Gesamt T3 und Gesamt T4 wird zur Freisetzung des gebundenen T3 bzw. T4 der Probe 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS) zugefügt. Die eingesetzte Menge Antikörper ist so gering, dass das Gleichgewicht

zwischen gebundenem und ungebundenem T3 bzw. T4 bei der Messung des freien T3 und des freien T4 weitgehend ungestört bleibt.

Messung von Kortisol

Die Probe wird mit einem Kortisol-spezifischen biotinylierten Antikörper und einem mit Ruthenium-Komplex markierten Kortisolderivat inkubiert. Entsprechend der Analytenkonzentration wird auch bei diesem kompetitiven Immunoassay ein Teil der Bindungsstellen des Antikörpers mit Kortisol aus der Patientenprobe und zum anderen Teil von dem ruthenylierten Hapten besetzt. Nach Zugabe von mit Streptavidin beschichteten, paramagnetischen Mikropartikeln wird der biotinylierte Komplex über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt. Dort werden die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf der Elektrode fixiert und die ungebundenen Substanzen durch Waschung entfernt. Die Chemilumineszenz-Emission wird durch Anlegen einer Spannung induziert und mit Hilfe des Fotomultipllers gemessen. Die Ergebnisse werden anhand einer gespeicherten Zwei-Punkt-Kalibrationskurve ermittelt.

Messung von Insulin

Hierbei handelt es sich um einen Immunoassay nach dem Sandwichprinzip. Insulin aus der Probe bildet mit einem biotinylierten monoklonalen Insulin spezifischen Antikörper und einem mit dem Ruthenium-Komplex markierten monoklonalen Insulin spezifischen Antikörper einen Komplex. Durch Zugabe von mit Streptavidin beschichteten paramagnetischen Mikropartikeln wird der Komplex über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt, in der die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf der Elektrode fixiert werden. Im Anschluss an die Waschung, um ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird durch Anlegen einer Spannung die Chemilumineszenz-Emission induziert. Sie wird vom Photomultipler gemessen und die Ergebnisse anhand der Kalibrationskurve ermittelt.

7. Referenzwertbestimmung

Nach Abschluss der Validierung der beiden Geräte wurden im Rahmen dieser Arbeit die Referenzwerte für die Schilddrüsenhormone TT4, fT4, TT3 und fT3, Kortisol und Insulin bei der Katze mit dem Gerät Elecsys® 1010 (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim) bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde von 118 gesunden Katzen Blut entnommen und dieses im Routinelauf für die Schilddrüsenhormone und Kortisol gemessen. Für Insulin konnten nur 115 Blutproben im Routinelauf im Labor gemessen werden.

Die Referenzwerte wurden speziell für dieses der I. Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellten Gerätes bestimmt und daher nicht mit Zweitmessungen an einem anderen Gerät verglichen.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem PC-Programm SPSS (Statistical Package for the Social Science) für Windows, Version 11.0, 2001.

Ergebnisse

8. Validierung des Beckman-Coulter Access®

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Access-Immunoassay® System für folgende Parameter für Katzenseren validiert: Gesamt T4, freies T4, Gesamt T3, freies T3, Kortisol, Insulin.

8.1. Prüfung der Präzision

8.1.1. Intraassay-Präzision

Prüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse anhand von zehn Messungen in Serie von jeweils sechs Katzenseren.

Tabelle 1: Intraassay-Präzision von TT4 im Katzen serum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	242,2	7,5	3,1
Katze 2	10	170,3	14,9	8,8
Katze 3	10	28,5	5,4	18,9
Katze 4	10	24,7	1,7	6,7
Katze 5	10	26,4	4,2	16,0
Katze 6	10	11,4	2,9	23,6
Mittelwert			6,1	12,8

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Bei der Intraassay-Messung von TT4 aus den sechs Katzenseren ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 12,8 %.

Tabelle 2: Intraassay-Präzision von fT4 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in pmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	19,6	0,7	3,7
Katze 2	10	75,2	0,0	0,0
Katze 3	10	75,2	0,0	0,0
Katze 4	10	15,4	0,4	2,9
Katze 5	10	14,6	0,4	2,8
Katze 6	10	4,9	0,5	9,7
Mittelwert			0,3	3,2

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Die sechs Katzenseren ergaben bei der Messung der Intraassay-Präzision von fT4 einen durchschnittlichen Variationskoeffizient von 3,2 %.

Tabelle 3: Intraassay-Präzision von TT3 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	0,3	0,09	28,1
Katze 2	10	1,9	0,05	2,6
Katze 3	10	0,8	0,07	8,4
Katze 4	10	0,3	0,04	12,1
Katze 5	10	0,6	0,03	5,5
Katze 6	10	0,2	0,08	36,4
Mittelwert			0,06	15,5

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Aus den sechs Katzenseren ergab sich für die Intraassay-Präzision von TT3 ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 15,5 %.

Tabelle 4: Intraassay-Präzision von fT3 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in pmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	5,3	0,3	6,3
Katze 2	10	6,6	0,3	3,8
Katze 3	10	8,9	1,1	11,8
Katze 4	10	15,3	0,3	2,2
Katze 5	10	9,9	2,1	20,9
Katze 6	10	5,2	1,6	30,5
Mittelwert			0,9	12,6

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Die sechs Katzenseren ergaben einen durchschnittlichen Variationskoeffizient von 12,6 % für den Intraassay von fT3.

Tabelle 5: Intraassay-Präzision von Kortisol im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	298,6	10,5	3,5
Katze 2	10	274,2	14,1	5,1
Katze 3	10	19,9	2,9	14,8
Katze 4	10	234,1	20,2	8,6
Katze 5	10	363,1	20,2	5,6
Katze 6	10	118,9	13,5	11,4
Mittelwert			13,6	8,2

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Die Intraassay-Messung aus den sechs Katzenseren ergaben einen durchschnittlichen Variationskoeffizient von 8,2 % für Kortisol.

Tabelle 6: Intraassay-Präzision von Insulin im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in µU/ml	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	1,4	0,02	1,4
Katze 2	10	0,2	0,01	5,0
Katze 3	10	0,9	0,01	1,1
Katze 4	10	1,4	0,08	5,7
Katze 5	10	3,8	0,17	4,5
Katze 6	10	0,5	0,02	4,2
Mittelwert			0,05	3,6

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Für Insulin ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 3,6 % bei der Messung der sechs Katzenseren.

Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der einzelnen Hormone und Seren sind den jeweiligen Tabellen zu entnehmen.

1.2. Interassay-Präzision

Prüfung der Wiederholungsgenauigkeit von Ergebnissen durch die Messung an aufeinanderfolgenden Tagen von jeweils sechs portionierten Katzenseren in zehn verschiedenen Läufen.

Tabelle 7: Interassay-Präzision von TT4 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	39,8	12,5	31,4
Katze 2	10	22,9	5,6	24,3
Katze 3	10	21,9	4,2	19,3
Katze 4	10	19,1	2,0	10,4
Katze 5	10	32,1	3,7	11,4
Katze 6	10	22,2	2,0	9,2
Mittelwert			5,0	17,7

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Die Interassay-Präzision für TT4 ergab aus den sechs Katzenseren ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 17,7 %.

Tabelle 8: Interassay-Präzision von fT4 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in pmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	23,1	2,1	9,1
Katze 2	10	13,9	1,0	7,1
Katze 3	10	12,4	0,7	5,6
Katze 4	10	22,2	1,3	5,9
Katze 5	10	15,4	0,7	4,7
Katze 6	10	13,9	0,8	5,4
Mittelwert			1,1	6,3

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Für fT4 konnte ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 6,3 % aus den sechs Katzenseren ermittelt werden.

Tabelle 9: Interassay-Präzision von TT3 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	0,7	0,16	23,9
Katze 2	10	0,2	0,09	56,3
Katze 3	10	0,5	0,10	22,2
Katze 4	10	0,3	0,06	21,4
Katze 5	10	0,6	0,06	10,2
Katze 6	10	0,6	0,05	8,2
Mittelwert			0,09	23,7

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Die sechs Katzenseren ergaben für TT3 ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 23,7 % im Interassay.

Tabelle 10: Interassay-Präzision von fT3 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in pmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	5,3	0,3	6,3
Katze 2	10	6,6	0,3	3,8
Katze 3	10	8,9	1,1	11,8
Katze 4	10	15,3	0,3	2,2
Katze 5	10	9,9	2,1	20,9
Katze 6	10	5,2	1,6	30,5
Mittelwert			0,9	12,6

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Für den Interassay von fT3 erreichte der Access® in den sechs Katzenseren einen durchschnittlichen Variationskoeffizienten von 12,6 %.

Tabelle 11: Interassay-Präzision von Kortisol im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	298,6	10,5	3,5
Katze 2	10	274,2	14,1	5,1
Katze 3	10	19,9	2,9	14,8
Katze 4	10	234,1	20,2	8,7
Katze 5	10	363,1	20,2	5,6
Katze 6	10	118,9	13,5	11,4
Mittelwert			13,6	8,2

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Bei der Messung der Interassay-Präzision von Kortisol aus den sechs Katzenseren ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 8,2 %.

Tabelle 12: Interassay-Präzision von Insulin im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in µU/ml	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	0,8	0,1	10,1
Katze 2	10	3,5	0,5	13,9
Katze 3	10	0,5	0,1	24,0
Katze 4	10	0,1	0,0	28,6
Katze 5	10	1,3	0,1	7,7
Katze 6	10	1,4	0,1	10,2
Mittelwert			0,2	15,8

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Die Interassay-Präzision von Insulin lag im Durchschnitt bei einem Variationskoeffizienten von 15,8 %.

Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der einzelnen Seren lassen sich aus den jeweiligen Tabellen entnehmen.

8.2. Prüfung der Richtigkeit

8.2.1. Wiederfindung

Zur Prüfung der Richtigkeit wurden fünf Katzenseren mit bekannten Mengen an TT4, TT3, Kortisol, Insulin und Digoxin in Form von Standards aufgestockt. Die Wiederfindungsrate errechnet sich nach Abzug der Ausgangskonzentration des jeweiligen Parameters im Katzenserum als Prozent der zugesetzten Menge aus den Standards, wobei der rechnerisch ermittelte Sollwert 100,0 % entspricht.

Tabelle 13: Wiederfindung von TT4 im Katzenserum

Katze	Ausgangswert in nmol/l	Aufstockung in nmol/l	Istwert in nmol/l	Sollwert in nmol/l	Wiederfindung in %
Katze 1	107,8	26,0	65,3	66,9	98,0
Katze 2	41,5	51,0	53,4	46,2	115,0
Katze 3	2,9	51,0	29,7	26,9	110,0
Katze 4	107,8	206,0	183,8	156,9	117,0
Katze 5	41,5	206,0	164,8	123,7	133,0
Mittelwert					115,0

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate der fünf Katzenseren lag bei 115,0 %.

Tabelle 14: Wiederfindung von TT3 im Katzenserum

Katze	Ausgangswert in nmol/l	Aufstockung in nmol/l	Istwert in nmol/l	Sollwert in nmol/l	Wiederfindung in %
Katze 1	0,4	1,5	0,8	0,9	81,0
Katze 2	0,4	6,1	2,3	3,2	72,0
Katze 3	0,1	1,5	0,8	0,8	99,0
Katze 4	0,1	6,1	2,9	3,1	94,0
Katze 5	0,6	12,3	4,2	6,4	65,0
Mittelwert					82,0

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate der fünf Katzenseren lag bei 82,0 %.

Tabelle 15: Wiederfindung von Kortisol im Katzenserum

Katze	Ausgangswert in nmol/l	Aufstockung in nmol/l	Istwert in nmol/l	Sollwert in nmol/l	Wiederfindung in %
Katze 1	31,3	138,0	90,9	84,7	107,0
Katze 2	31,3	690,0	397,6	360,7	110,0
Katze 3	190,7	55,0	102,0	122,8	83,0
Katze 4	190,7	138,0	151,0	164,3	92,0
Katze 5	728,3	276,0	535,4	502,2	107,0
Mittelwert					100,0

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate der fünf Katzenseren lag bei 100,0 %.

Tabelle 16: Wiederfindung von Insulin im Katzenserum

Katze	Ausgangswert in µU/ml	Aufstockung in µU/ml	Istwert in µU/ml	Sollwert in µU/ml	Wiederfindung in %
Katze 1	1,2	150,0	63,5	75,6	84,0
Katze 2	2,59	70,0	6,4	36,3	18,0
Katze 3	1,7	7,0	1,2	4,4	27,0
Katze 4	2,5	350,0	25,6	176,3	15,0
Katze 5	0,1	350,0	21,9	175,0	13,0
Mittelwert					31,0

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate der fünf Katzenseren lag bei 31,0 %.

8.2.2. Bestimmung in Kontrollseren

Ein weiteres Kriterium für die Richtigkeit bei der Validierung des Beckman-Coulter Access® ist die Übereinstimmung der Messergebnisse des vom Hersteller empfohlenen Kontrollserums mit den für das Gerät angegebenen Sollwerten. Die Testläufe zur Validierung mit Katzenseren erfolgten stets erst dann, wenn die Messergebnisse der Kontrollseren im Sollbereich lagen.

8.2.3. Biologische Richtigkeit

Die biologische Richtigkeit wurde für die Schilddrüsenhormone anhand der Suppression von hyperthyreoten Katzen getestet. Hyperthyreoten Katzen wurde das Serum für den ersten Wert entnommen. Nach mehrtägiger Behandlung mit Carbimazol wurde der zweite Wert bestimmt.

Tabelle 17: Biologische Richtigkeit von TT4, fT4, TT3, fT3 im Katzenserum

Katze	TT4 Ausgangswert in nmol/l	TT4 nach Therapie in nmol/l	fT4 Ausgangswert in pmol/l	fT4 nach Therapie in pmol/l
Katze 1	170,3	117,5	>75,2	65,5
Katze 2	242,2	45,5	>75,2	20,7
Katze 3	109,8	56,4	57,0	26,9

Katze	TT3 Ausgangswert in nmol/l	TT3 nach Therapie in nmol/l	fT3 Ausgangswert in pmol/l	fT3 nach Therapie in pmol/l
Katze 1	0,8	0,6	8,9	4,5
Katze 2	1,9	0,5	15,3	3,2
Katze 3	2,3	1,9	32,2	22,5

Die Ergebnisse der Schilddrüsenhormon-Suppression unter Therapie ergeben sich aus den beiden vorstehenden Tabellen. Bei allen drei Katzen ist ein deutlicher Rückgang aller Schilddrüsenhormone zu erkennen, wobei der Rückgang der Serumkonzentration von TT3 in allen drei Fällen am geringsten ist.

Bei der Kortisolbestimmung wurden die Nebennieren der Patienten mit Hilfe des ACTH-Tests stimuliert. Jeweils vor sowie 30 und 60 Minuten nach Injektion von Synacthen® wurde den Tieren Blut entnommen und die Kortisolkonzentration bestimmt.

Tabelle 18: Biologische Richtigkeit von Kortisol im Katzenserum

Katze	Kortisol Ausgangswert in nmol/l	Kortisol nach ACTH in nmol/l
Katze 1	224,4	271,8
Katze 2	270,2	407,4
Katze 3	210,7	256,5

Zwei von drei Fällen zeigen einen leichten Anstieg des Kortisols nach Stimulation. Beim dritten Fall ist ein deutlicher Anstieg der Konzentration nach Applikation des Medikaments zu erkennen.

Für die Messung eines Insulinanstieges wurde sowohl nach 24-stündiger Nahrungskarenz als auch eine halbe Stunde nach Futteraufnahme bei den Tieren Blut entnommen. Für jedes Hormon wurden jeweils drei Probenpaare gemessen.

Tabelle 19: Biologische Richtigkeit von Insulin im Katzenserum

Katze	Insulin Ausgangswert in µU/ml	Insulin nach Futter in µU/ml
Katze 1	0,21	1,2
Katze 2	< 0,1	0,2
Katze 3	0,3	1,1

Bei allen drei Katzen zeigt sich ein postprandialer Anstieg der Insulinkonzentration. In einem Fall handelt es sich um einen sehr geringen Anstieg des Wertes.

8.3. Prüfung auf Spezifität

8.3.1. Extraktion der Schilddrüsenhormone

Zur Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum wird dieses mit 30 % Aktivkohle (Carbo activatus) versetzt und 24 Stunden auf einem Taumler gemischt. Anschließend wird das Serum filtriert um die Kohlerückstände wieder zu entfernen.

Tabelle 20: Schilddrüsenhormone im Katzen serum nach Extraktion

Katze	TT4 in nmol/l	fT4 in pmol/l	TT3 in nmol/l	fT3 in pmol/l
Katze 1	0,0	0,5	0,0	0,0
Katze 2	0,7	1,3	0,1	0,0
Katze 3	0,0	1,2	0,2	0,0
Katze 4	0,4	1,3	0,1	0,0

Mit Hilfe der in der vorstehenden Tabelle angegebenen Ergebnisse lässt sich erkennen, dass keine Kreuzreaktion mit anderen Substanzen besteht. Erwartungsgemäß liegen alle Konzentrationen der mit Hilfe von Aktivkohle extrahierten Schilddrüsenhormone unterhalb der unteren Nachweisgrenze des Beckman-Coulter Access®.

8.3.2. Verdünnungsreihen der einzelnen Parameter

Die nachfolgend aufgeführten Grafiken stellen die Ergebnisse der Verdünnungsreihen gemessen mit dem Beckman-Coulter Access® der Schilddrüsenhormone Gesamt T4 und Gesamt T3 sowie von Kortisol und Insulin dar. Es wurden je Parameter vier verschiedene Proben verdünnt und gemessen.

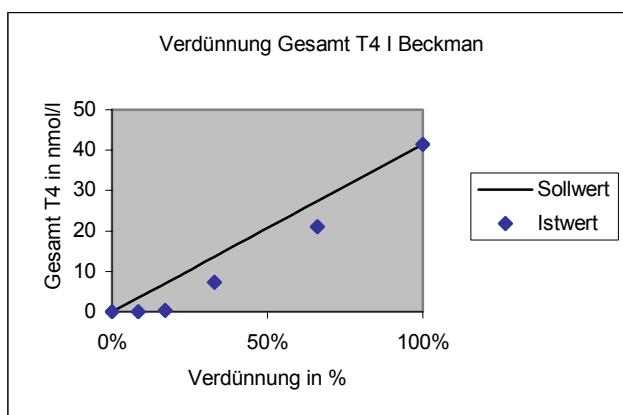


Abbildung 1: Verdünnungsreihe TT4 nach Beckman-Coulter Access®

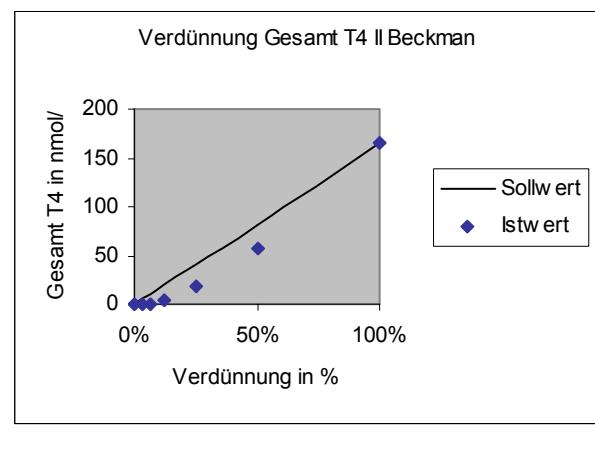


Abbildung 2: Verdünnungsreihe TT4 nach Beckman-Coulter Access®

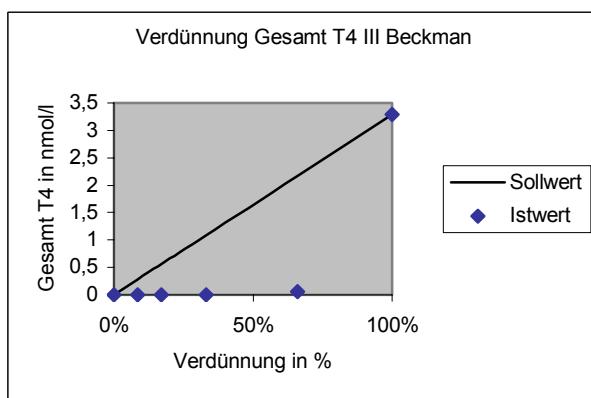


Abbildung 3: Verdünnungsreihe TT4 nach Beckman-Coulter Access®

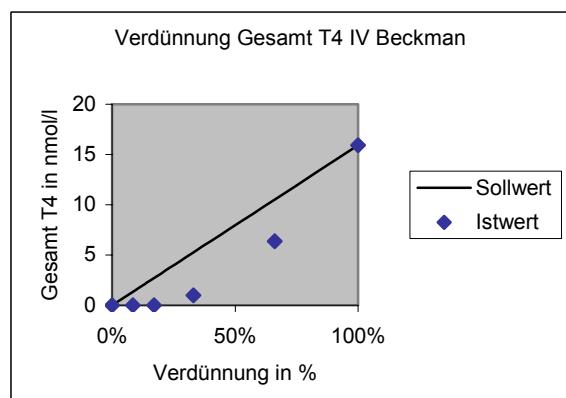


Abbildung 4: Verdünnungsreihe TT4 nach Beckman-Coulter Access®

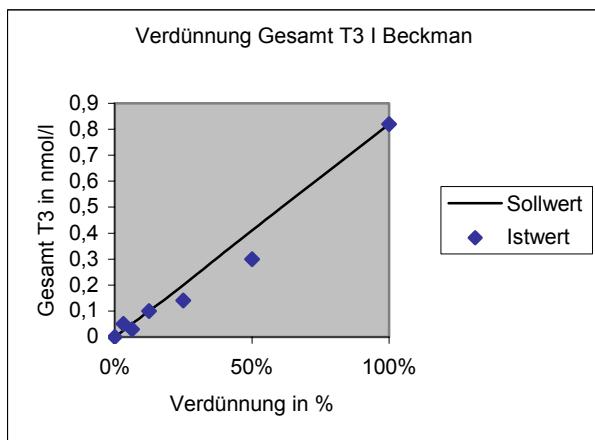


Abbildung 5: Verdünnungsreihe TT3
nach Beckman-Coulter Access®

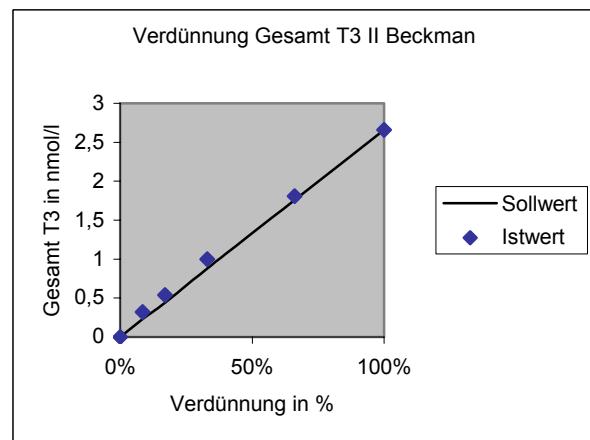


Abbildung 6: Verdünnungsreihe TT3
nach Beckman-Coulter Access®

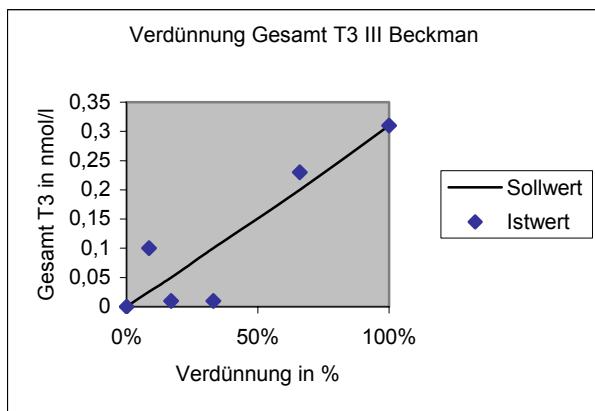


Abbildung 7: Verdünnungsreihe TT3
nach Beckman-Coulter Access®

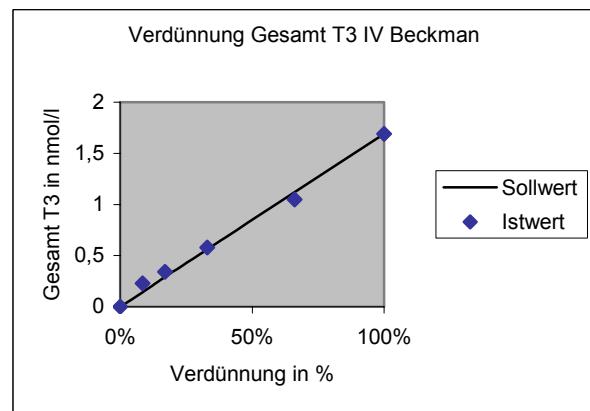


Abbildung 8: Verdünnungsreihe TT3
nach Beckman-Coulter Access®

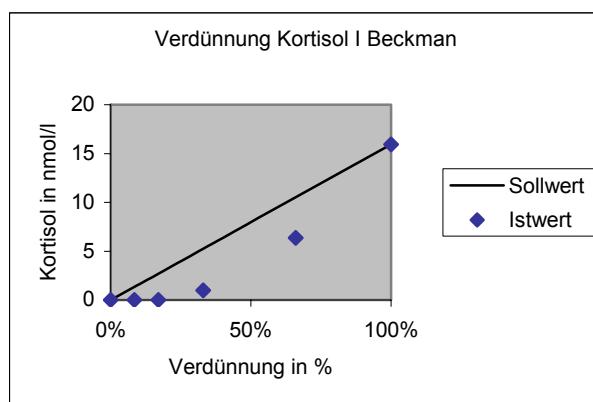


Abbildung 9: Verdünnungsreihe Kortisol nach Beckman-Coulter Access®

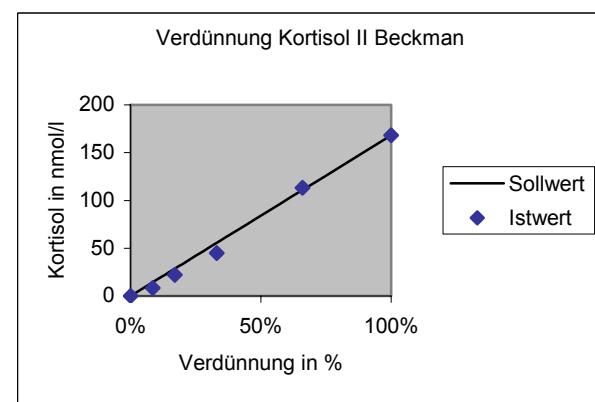


Abbildung 10: Verdünnungsreihe Kortisol nach Beckman-Coulter Access®

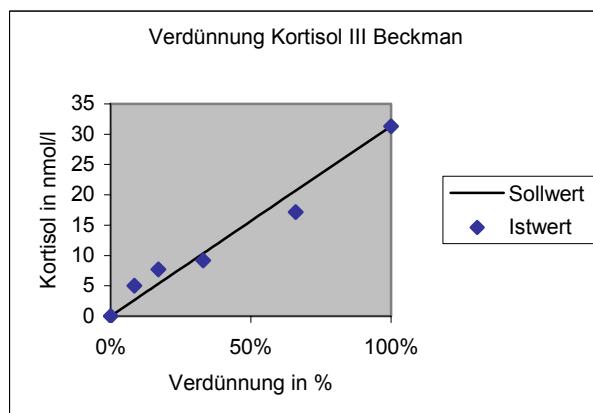


Abbildung 11: Verdünnungsreihe Kortisol nach Beckman-Coulter Access®

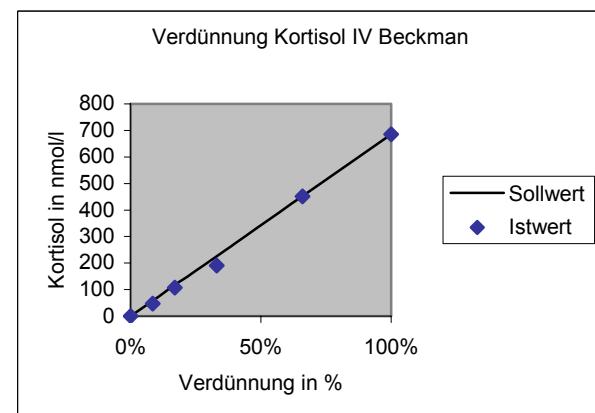


Abbildung 12: Verdünnungsreihe Kortisol nach Beckman-Coulter Access®

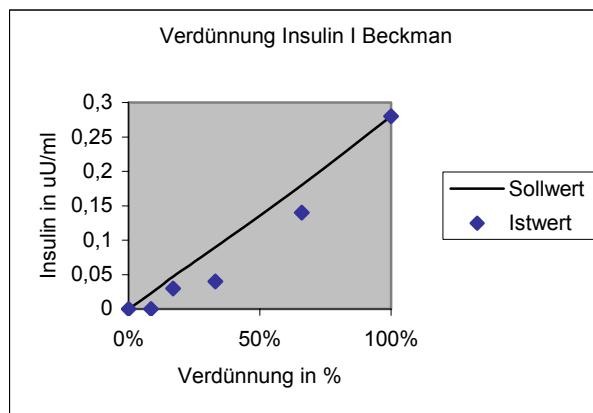


Abbildung 13: Verdünnungsreihe Insulin nach Beckman-Coulter Access[®]

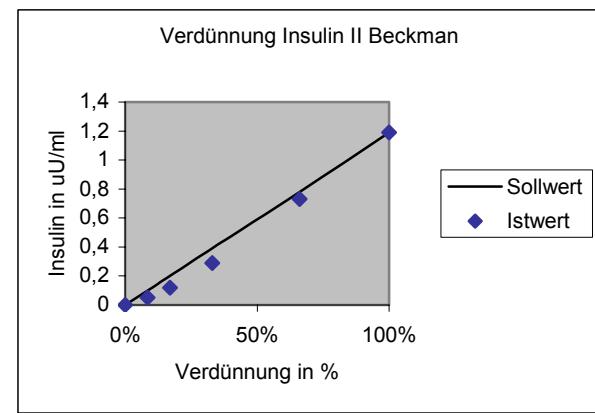


Abbildung 14: Verdünnungsreihe Insulin nach Beckman-Coulter Access[®]

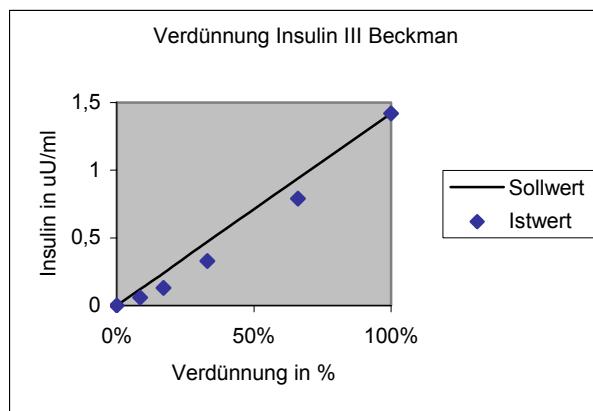


Abbildung 15: Verdünnungsreihe Insulin nach Beckman-Coulter Access[®]

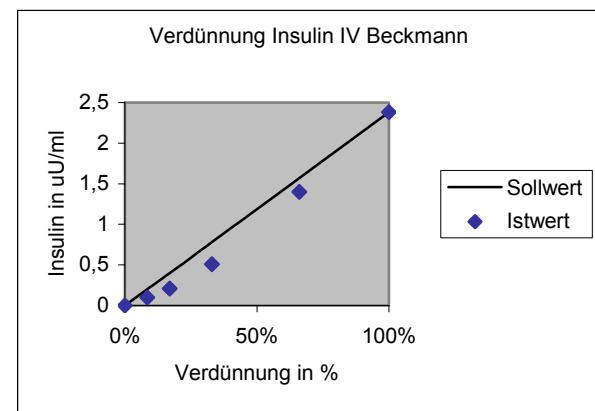


Abbildung 16: Verdünnungsreihe Insulin nach Beckman-Coulter Access[®]

9. Validierung des Elecsys® 1010

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Elecsys® 1010 für folgende Parameter im Katzenserum validiert: Gesamt T4, fT4, Gesamt T3, fT3, Kortisol, Insulin.

9.1. Prüfung der Präzision

9.1.1. Intraassay-Präzision

Prüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse anhand von zehn Messungen in Serie von jeweils sechs Katzenseren.

Tabelle 21: Intraassay-Präzision von TT4 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	153,9	5,1	3,3
Katze 2	10	22,5	0,1	0,6
Katze 3	10	24,1	0,3	1,1
Katze 4	10	44,8	0,6	1,2
Katze 5	10	24,7	0,3	1,1
Katze 6	10	72,8	0,9	1,2
Mittelwert			1,1	1,4

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Die sechs Katzenseren ergaben einen durchschnittlichen Variationskoeffizient von 1,4 % für die Intraassay-Präzision von TT4.

Tabelle 22: Intraassay-Präzision von fT4 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in pmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	100,0	0,0	0,0
Katze 2	10	19,0	0,2	1,0
Katze 3	10	18,8	0,2	1,0
Katze 4	10	34,4	0,5	1,1
Katze 5	10	19,4	0,1	1,0
Katze 6	10	44,9	0,9	2,0
Mittelwert			0,2	1,0

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Der durchschnittliche Variationskoeffizient für die Messung des Intraassays von fT4 aus sechs Katzenseren lag bei 1,0 %.

Tabelle 23: Intraassay-Präzision von TT3 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	2,8	0,08	2,8
Katze 2	10	0,8	0,01	1,2
Katze 3	10	1,0	0,02	2,0
Katze 4	10	0,8	0,04	5,0
Katze 5	10	1,9	0,02	1,0
Katze 6	10	1,7	0,03	1,8
Mittelwert			0,04	2,3

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Für TT3 ergaben die sechs Intraassay-Messungen einen durchschnittliche Variationskoeffizient von 2,3 %.

Tabelle 24: Intraassay-Präzision von fT3 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in pmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient In %
Katze 1	10	6,4	0,1	1,6
Katze 2	10	11,5	0,3	2,8
Katze 3	10	2,3	0,1	3,5
Katze 4	10	2,0	0,1	3,9
Katze 5	10	2,2	0,2	8,7
Katze 6	10	3,1	0,2	6,4
Mittelwert			1,0	4,5

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Im Durchschnitt lag der Variationskoeffizient für die Messung von fT3 bei 4,5 %.

Tabelle 25: Intraassay-Präzision von Kortisol im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient In %
Katze 1	10	160,6	4,4	2,7
Katze 2	10	190,7	60,7	31,9
Katze 3	10	40,9	10,4	25,3
Katze 4	10	231,1	17,8	7,7
Katze 5	10	106,5	3,8	3,5
Katze 6	10	35,4	3,7	10,5
Mittelwert			17,5	13,6

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Die sechs Katzenseren ergaben im Intraassay für Kortisol einen durchschnittlichen Variationskoeffizient von 13,6 %.

Tabelle 26: Intraassay-Präzision von Insulin im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in µU/ml	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	2,1	0,1	5,1
Katze 2	10	2,4	0,2	6,5
Katze 3	10	2,8	0,2	5,6
Katze 4	10	5,3	0,3	5,3
Katze 5	10	4,9	0,1	2,0
Katze 6	10	0,1	0,2	313
Mittelwert				56,3

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Bei den sechs Katzenseren ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 56,3 %. Berechnet man nur den Variationskoeffizienten der fünf Katzen, deren Serumkonzentrationen sich im Messbereich des Gerätes befanden, so erhält man einen Mittelwert von 4,9 %. Bei Katze Nummer sechs lag die Insulinkonzentration unterhalb der unteren Nachweisgrenze des Gerätes.

Die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der einzelnen Seren sind den jeweiligen Tabellen zu entnehmen.

9.1.2. Interassay-Präzision

Prüfung der Wiederholungsgenauigkeit von Ergebnissen durch die Messung an aufeinanderfolgenden Tagen von jeweils sechs portionierten Katzenseren in zehn verschiedenen Läufen.

Tabelle 27: Interassay-Präzision von TT4 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	25,0	2,5	9,9
Katze 2	10	82,7	8,6	10,4
Katze 3	10	21,9	0,9	3,9
Katze 4	10	12,3	1,2	10,1
Katze 5	10	22,3	1,9	8,6
Katze 6	10	72,9	2,6	3,5
Mittelwert			2,9	7,7

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Der durchschnittliche Variationskoeffizient der sechs Katzenseren lag für den Intraassay von TT4 bei 7,7 %.

Tabelle 28: Interassay-Präzision von fT4 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in pmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	15,8	2,0	12,5
Katze 2	10	4,9	0,2	4,9
Katze 3	10	72,8	12,3	16,9
Katze 4	10	19,2	0,9	4,7
Katze 5	10	16,2	1,2	7,3
Katze 6	10	46,5	1,4	3,1
Mittelwert			3,0	8,2

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Bei der Interassay-Präzision wurde für fT4 ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 8,2 % aus den sechs Katzenseren ermittelt.

Tabelle 29: Interassay-Präzision von TT3 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	0,6	0,08	12,8
Katze 2	10	0,9	0,03	3,7
Katze 3	10	0,8	0,05	6,4
Katze 4	10	1,7	0,06	3,6
Katze 5	10	0,8	0,09	10,9
Katze 6	10	1,8	0,11	6,2
Mittelwert			0,07	7,3

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Aus den sechs Katzenseren ergab sich für TT3 ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 7,3 %.

Tabelle 30: Interassay-Präzision von fT3 im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in pmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	4,4	0,4	9,8
Katze 2	10	0,5	0,5	107,3
Katze 3	10	1,8	0,4	19,3
Katze 4	10	2,5	0,7	26,5
Katze 5	10	2,7	0,5	18,9
Katze 6	10	6,3	1,4	22,1
Mittelwert			0,7	33,9

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Die Interassay-Präzision von fT3 liegt bei einem durchschnittlichen Variationskoeffizienten von 33,9 %.

Tabelle 31: Interassay-Präzision von Kortisol im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in nmol/l	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	22,4	4,3	19,0
Katze 2	10	114,5	10,5	9,2
Katze 3	10	131,8	10,5	8,0
Katze 4	10	169,9	37,2	21,9
Katze 5	10	189,0	19,9	10,5
Katze 6	10	78,9	5,6	7,0
Mittelwert			14,7	12,6

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Kortisol wurde mit einem durchschnittlichen Variationskoeffizienten von 12,6 % im Interassay gemessen.

Tabelle 32: Interassay-Präzision von Insulin im Katzenserum

Katze	Messung n	Mittelwert in µU/ml	Standardabweichung s	Variationskoeffizient in %
Katze 1	10	3,2	0,3	8,8
Katze 2	10	1,7	0,3	16,2
Katze 3	10	2,7	0,3	12,5
Katze 4	10	2,9	1,0	34,7
Katze 5	10	5,9	1,2	19,9
Katze 6	10	0,5	0,4	62,5
Mittelwert				25,8

n = Anzahl, s = Standardabweichung

Die sechs Messungen des Katzenserums für den Interassay von Insulin ergaben einen durchschnittlichen Variationskoeffizienten von 25,8 %.

Die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der einzelnen Seren sind den jeweiligen Tabellen zu entnehmen.

9.2. Prüfung der Richtigkeit

9.2.1. Wiederfindung

Zur Prüfung der Richtigkeit wurden fünf Katzenseren mit bekannten Mengen an TT4, TT3, Kortisol und Insulin in Form von Standards aufgestockt. Die Wiederfindungsrate errechnet sich nach Abzug der Ausgangskonzentration des jeweiligen Parameters im Katzenserum als Prozent der zugesetzten Menge aus den Standards, wobei der rechnerisch ermittelte Sollwert 100,0 % entspricht.

Tabelle 33: Wiederfindung von TT4 im Katzenserum

Katze	Ausgangswert in nmol/l	Aufstockung in nmol/l	Istwert in nmol/l	Sollwert in nmol/l	Wiederfindung in %
Katze 1	30,8	103,0	62,6	66,9	93,0
Katze 2	21,0	26,0	26,6	23,5	113,0
Katze 3	75,9	26,0	64,9	50,9	127,0
Katze 4	30,8	206,0	102,4	118,4	86,0
Katze 5	75,9	206,0	138,3	140,9	98,0
Mittelwert					103,0

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate von TT4 in den fünf Katzenseren lag bei 103,0 %.

Tabelle 34: Wiederfindung von TT3 im Katzenserum

Katze	Ausgangswert in nmol/l	Aufstockung in nmol/l	Istwert in nmol/l	Sollwert in nmol/l	Wiederfindung in %
Katze 1	0,7	1,5	1,5	1,1	137,0
Katze 2	1,7	12,3	8,9	6,7	134,0
Katze 3	1,8	0,8	1,9	1,3	142,0
Katze 4	0,7	3,1	2,3	1,9	119,0
Katze 5	1,8	12,3	9,4	7,1	133,0
Mittelwert					133,0

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate von TT3 in den fünf Katzenseren lag bei 133,0 %.

Tabelle 35: Wiederfindung von Kortisol im Katzenserum

Katze	Ausgangswert in nmol/l	Aufstockung in nmol/l	Istwert in nmol/l	Sollwert in nmol/l	Wiederfindung in %
Katze 1	233,2	55,0	120,0	144,1	83,0
Katze 2	80,4	276,0	160,6	178,2	90,0
Katze 3	80,4	690,0	311,2	385,2	80,0
Katze 4	233,2	276,0	224,1	254,6	88,0
Katze 5	80,4	55,0	61,7	67,7	91,0
Mittelwert					86,0

Für Kortisol lag die durchschnittliche Wiederfindungsrate in den fünf Katzenseren bei 86,0 %.

Tabelle 36: Wiederfindung von Insulin im Katzenserum

Katze	Ausgangswert in µU/ml	Aufstockung in µU/ml	Istwert in µU/ml	Sollwert in µU/ml	Wiederfindung in %
Katze 1	3,4	10,0	5,0	6,7	74,0
Katze 2	3,5	50,0	20,6	26,7	77,0
Katze 3	13,7	150,0	54,7	81,8	66,0
Katze 4	3,5	350,0	102,3	176,7	57,0
Katze 5	13,7	50,0	22,4	31,8	70,0
Mittelwert					69,0

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate für Insulin in den fünf Katzenseren lag bei 69,0 %.

9.2.2. Bestimmung in Kontrollseren

Ein weiteres Kriterium für die Richtigkeit bei der Validierung des Elecsys® 1010 ist die Übereinstimmung der Messergebnisse des vom Hersteller empfohlenen Kontrollserums mit den für das Gerät angegebenen Sollwerten. Die Testläufe zur Validierung mit Katzenseren erfolgten stets erst dann, wenn die Messergebnisse der Kontrollseren im Sollbereich lagen.

9.2.3. Biologische Richtigkeit

Die biologische Richtigkeit wurde für die Schilddrüsenhormone anhand der Suppression der Schilddrüsenfunktion bei hyperthyreoten Katzen getestet. Hyperthyreoten Katzen wurde das Serum für den ersten Wert entnommen. Nach mehrtagiger Behandlung mit Carbimazol wurde erneut Blut entnommen und daraus der zweite Wert bestimmt.

Bei der Kortisolbestimmung wurden die Nebennieren der Patienten mit Hilfe des ACTH-Tests stimuliert. Dafür wurde den Tieren vor Injektion von Synacthen® sowie 30 und 60 Minuten nach der Injektion Blut entnommen. Aus den jeweiligen Proben wurde die Kortisolkonzentration bestimmt.

Für die Messung eines Insulinanstieges wurde bei den Tieren sowohl nach 24-stündiger Nahrungskarenz als auch eine halbe Stunde nach Futteraufnahme Blut entnommen. Pro Parameter wurden jeweils drei Proben gemessen.

Tabelle 37: Biologische Richtigkeit von TT4, fT4, TT3, fT3 im Katzenserum

Katze	TT4 Ausgangswert in nmol/l	TT4 nach Therapie in nmol/l	fT4 Ausgangswert in pmol/l	fT4 nach Therapie in pmol/l
Katze 1	153,9	31,0	100,0	21,7
Katze 2	82,7	54,7	72,8	35,8
Katze 3	82,2	35,2	59,3	20,2

Katze	TT3 Ausgangswert in nmol/l	TT3 nach Therapie in nmol/l	fT3 Ausgangswert in pmol/l	fT3 nach Therapie in pmol/l
Katze 1	2,8	0,7	11,6	2,1
Katze 2	1,7	1,4	4,4	2,5
Katze 3	2,4	1,1	10,0	5,3

Die Ergebnisse der Schilddrüsenhormon-Suppression unter Therapie mit Carbimazol sind in den beiden voranstehenden Tabellen angegeben. Es ist bei allen drei Katzen ein deutlicher Rückgang aller Schilddrüsenhormone zu erkennen, wobei der Rückgang der Serumkonzentration von TT3 in allen drei Fällen am geringsten ist.

Tabelle 38: Biologische Richtigkeit von Kortisol im Katzenserum

Katze	Kortisol Ausgangswert in nmol/l	Kortisol nach ACTH in nmol/l
Katze 1	<1,0	21,9
Katze 2	11,0	146,8
Katze 3	177,2	336,4

Alle drei Fälle zeigen einen deutlichen Anstieg der Kortisolkonzentration nach Stimulation mit Synacthen®.

Tabelle 39: Biologische Richtigkeit von Insulin im Katzenserum

Katze	Insulin Ausgangswert in µU/ml	Insulin nach Futter in µU/ml
Katze 1	0,3	0,7
Katze 2	0,3	1,4
Katze 3	<0,2	1,1

Bei allen drei Probenpaaren zeigt sich ein postprandialer Anstieg der Insulkonzentration.

9.3. Prüfung auf Spezifität

9.3.1. Extraktion der Schilddrüsenhormone

Zur Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum wird dieses mit 30 % Aktivkohle (Carbo activatus) versetzt und 24 Stunden auf einem Taumler gemischt. Vor der Messung wird das Serum filtriert um die Kohlerückstände wieder zu entfernen.

Tabelle 40: Schilddrüsenhormone im Katzenserum nach Extraktion

Katze	TT4 in nmol/l	fT4 in pmol/l	TT3 in nmol/l	fT3 in pmol/l
Katze 1	7,0	< 0,3	0,4	0,4
Katze 2	6,5	< 0,3	< 0,3	< 0,4
Katze 3	6,9	< 0,3	0,4	< 0,4
Katze 4	6,5	< 0,3	< 0,3	< 0,4

Im Hinblick auf die in der Tabelle 40 wiedergegebenen Ergebnisse ist erkennbar, dass für fT4, TT3 und fT3 keine Kreuzreaktivität mit anderen Substanzen besteht. Gesamt T4 ist noch in sehr geringen Konzentrationen in allen vier Proben messbar. Daraus ergibt sich die Annahme dass Substanzen in Katzenserum enthalten sind, die mit den Gesamt T4-Antikörpern aus dem Testsystem kreuzreagieren. Für die anderen drei Hormone liegen alle Konzentrationen nach Extraktion mit Aktivkohle unterhalb der unteren Nachweisgrenze.

9.3.2. Verdünnungsreihen der einzelnen Parameter

Die nachfolgend dargestellten Grafiken veranschaulichen die Ergebnisse der Verdünnungsreihen der Schilddrüsenhormone Gesamt T4 und Gesamt T3 sowie von Kortisol und Insulin gemessen mit dem Elecsys® 1010. Es wurden je Parameter vier verschiedene Proben verdünnt und gemessen

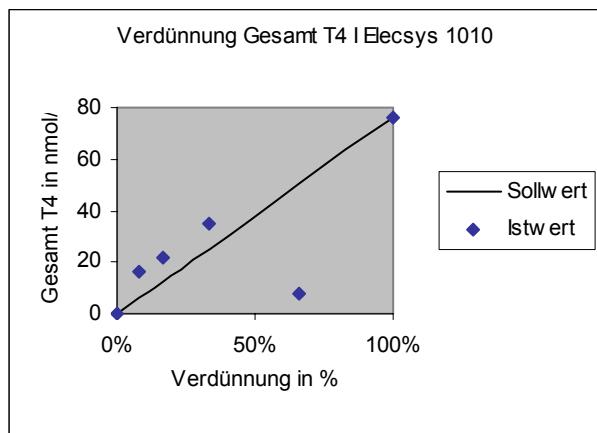


Abbildung 17: Verdünnungsreihe TT4 nach Elecsys® 1010

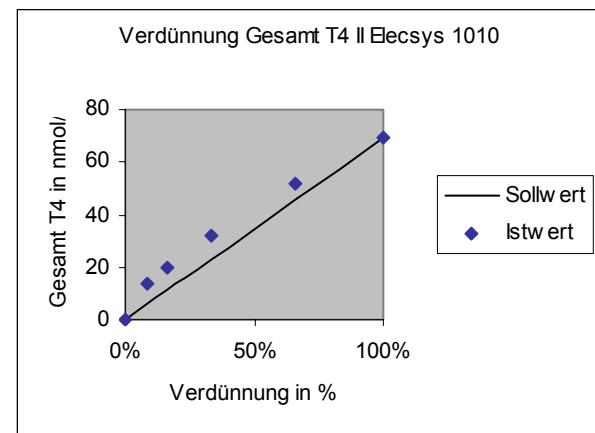


Abbildung 18: Verdünnungsreihe TT4 nach Elecsys® 1010

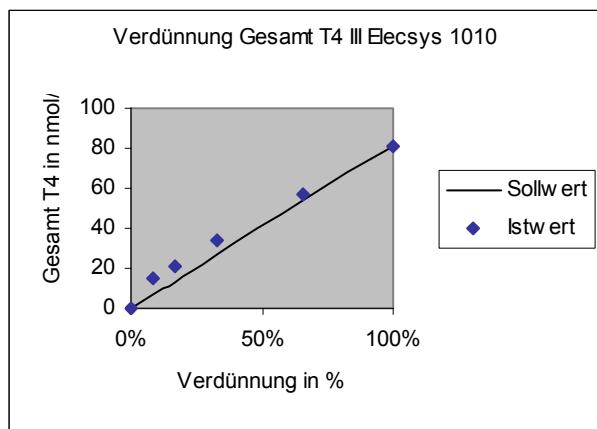


Abbildung 19: Verdünnungsreihe TT4 nach Elecsys® 1010

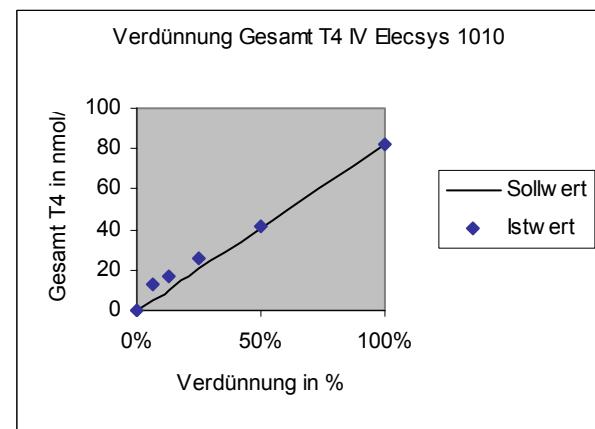


Abbildung 20: Verdünnungsreihe TT4 nach Elecsys® 1010

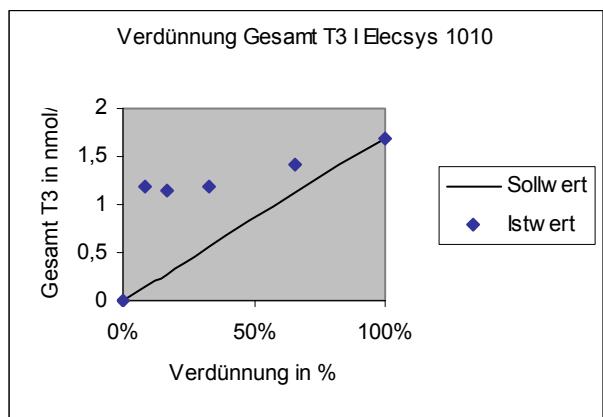


Abbildung 21: Verdünnungsreihe TT3 nach Elecsys® 1010

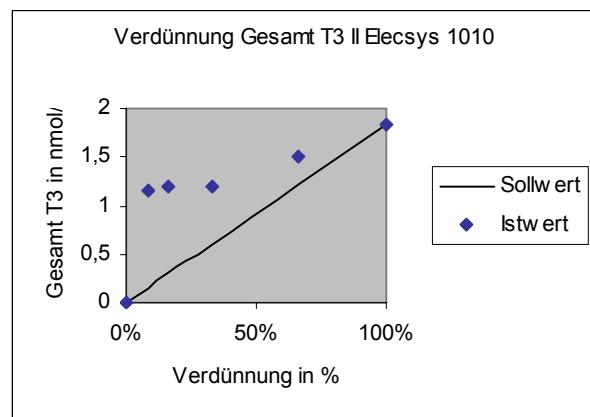


Abbildung 22: Verdünnungsreihe TT3 nach Elecsys® 1010

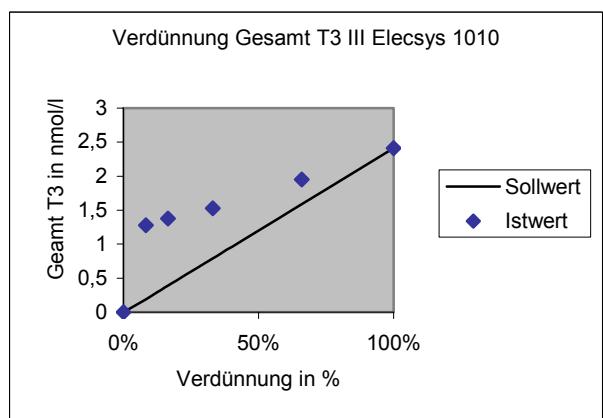


Abbildung 23: Verdünnungsreihe TT3 nach Elecsys® 1010

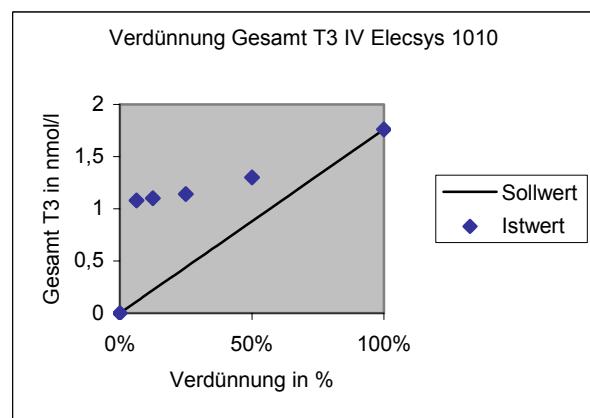


Abbildung 24: Verdünnungsreihe TT3 nach Elecsys® 1010

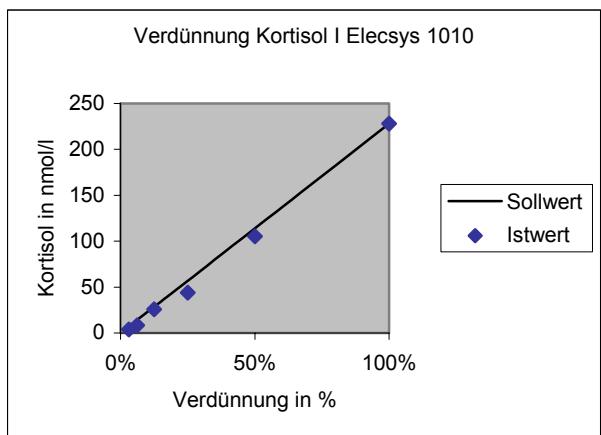


Abbildung 25: Verdünnungsreihe Kortisol nach Elecsys® 1010

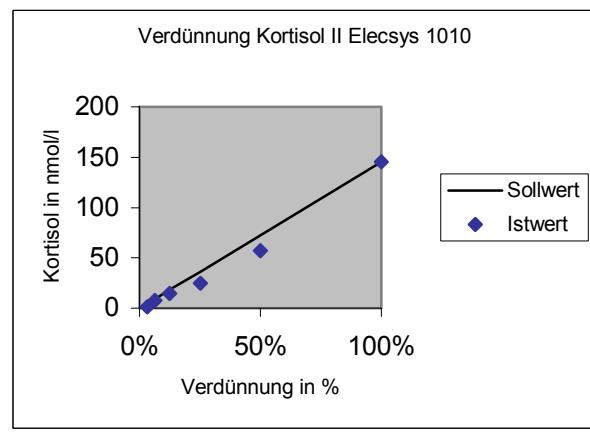


Abbildung 26: Verdünnungsreihe Kortisol nach Elecsys® 1010

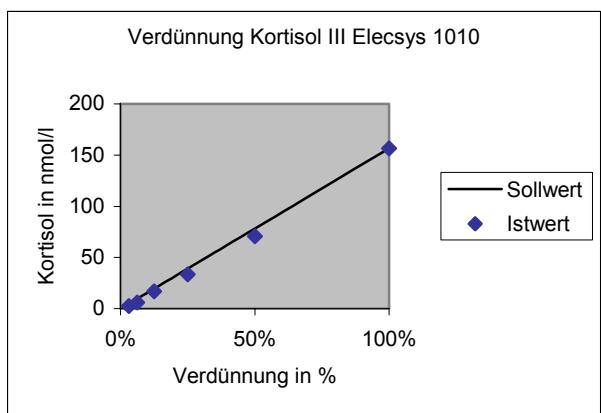


Abbildung 27: Verdünnungsreihe Kortisol nach Elecsys® 1010

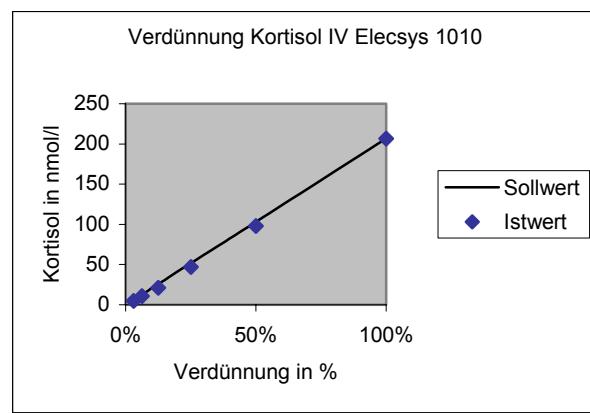


Abbildung 28: Verdünnungsreihe Kortisol nach Elecsys® 1010

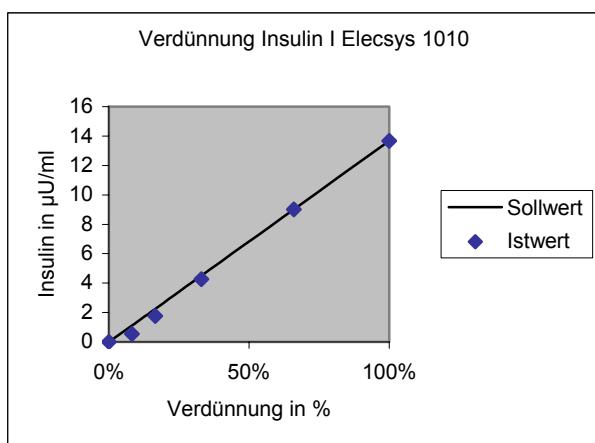


Abbildung 29: Verdünnungsreihe Insulin nach Elecsys® 1010

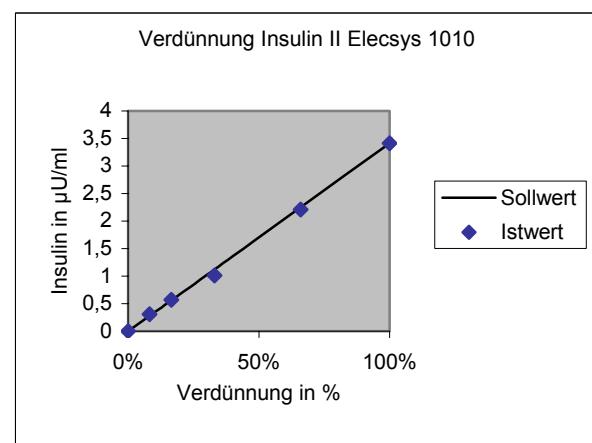


Abbildung 30: Verdünnungsreihe Insulin nach Elecsys® 1010

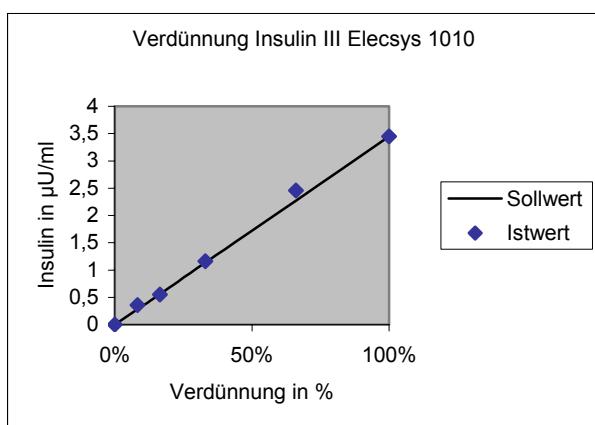


Abbildung 31: Verdünnungsreihe Insulin nach Elecsys® 1010

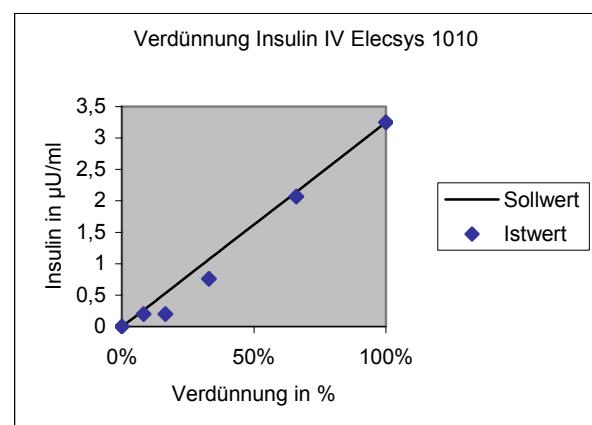


Abbildung 32: Verdünnungsreihe Insulin nach Elecsys® 1010

10. Referenzbereiche für T3, fT3, T4, fT4 und Kortisol bei der Katze

Zur Berechnung der Referenzbereiche wurden die Blutwerte von 118 gesunden Katzen, für Insulin von 115 gesunden Katzen gemessen und ausgewertet. Es wurden Mittelwert (x), Standardabweichung (s) und 95-%-Perzentilwerte errechnet.

Die Ergebnisse sind in der unten abgebildeten Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 41: Referenzwerte gemessen mit dem Elecsys® 1010

Faktoren	Mittel- wert	Standardab- weichung	Varianz	Mini- mum	Maxi- mum	X -/+ 2 s		Perzentile	
						- 2 s	+ 2 s	2,5	97,5
TT4	29,03	9,81	96,28	6,16	82,39	9,41	48,65	11,14	48,71
fT4	19,69	6,49	42,09	3,37	44,90	6,71	32,67	7,21	38,60
TT3	1,02	0,22	0,05	0,53	2,00	0,58	1,46	0,69	1,59
fT3	3,70	2,09	4,39	0,60	10,46	-0,48	7,88	1,04	9,77
Kortisol	147,25	102,55	10516,13	< 1,00	582,60	-57,85	352,35	6,89	388,42
Insulin	1,59	1,97	3,87	< 0,20	13,93	-2,35	5,53	< 0,2	7,95

Aus den oben aufgeführten Ergebnissen ergeben sich die Referenzbereiche bei der Katze für Gesamt T4 von 11,1 – 48,7 nmol/l, für freies T4 von 7,2 – 38,6 pmol/l, für Gesamt T3 von 0,7 – 1,6 nmol/l, für freies T3 von 1,0 – 9,8 pmol/l, für Kortisol von 6,9 – 388,4 nmol/l.

Diskussion

Im nachfolgenden Kapitel sollen die in der praktischen Arbeit erhaltenen Messwerte der beiden zur Validierung stehenden Geräte anhand der aus der Literatur bekannten Ergebnisse verglichen, geprüft und beurteilt werden. Unter Berücksichtigung dieser Beurteilung wird sodann ein Vergleich der beiden Geräte untereinander vorgenommen, wobei auch die Bedienerfreundlichkeit und weitere Aspekte für den Routinebetrieb im Labor berücksichtigt werden.

Soweit möglich wurden Serumproben mit niedriger, mittlerer und hoher Hormonkonzentration für die Messungen bei der Validierung der beiden Geräte verwendet. Allerdings ist die Durchführung dieses Vorhabens aufgrund des seltenen Vorkommens einzelner Krankheiten bei der Katze und durch den zeitlich begrenzten Rahmen, in der die Geräte zur Verfügung standen, nicht vollständig möglich gewesen. Außerdem wurde das Bestreben, ein möglichst breites Messspektrum abzudecken, durch die für die Katze sehr große Serummenge, die besonders bei der Messung zur Präzisionsprüfung benötigt wurde, erschwert. Insofern konnte nicht bei allen Messungen der gesamte Messbereich der Geräte getestet werden und ebenso konnten nicht immer die gleichen Patientenserien auf beiden Geräten gemessen werden. Dazu kam, dass die Geräte nicht zeitgleich der I. Medizinischen Tierklinik zur Verfügung standen. Ein weiterer limitierender Faktor war speziell in unserer Untersuchung, dass - wie bekannt - bei der Katze Blut nur in geringen Mengen zu gewinnen ist. Bei kranken Katzen reduziert sich diese Menge auch noch wegen evtl. begleitender Anämie und weitere krankheitsbedingter Faktoren.

Im Rahmen der Validierung sollte zusätzlich noch Digoxin im Serum der Katze für beide Geräte validiert werden. Bei der Katze bleiben Kardiomyopathien häufiger als beim Hund für lange Zeit unentdeckt, da die Besitzer nur in wenigen Fällen den Rückgang der körperlichen Belastbarkeit frühzeitig erkennen. Die häufigste Form der Kardiomyopathie bei der Katze ist die hypertrophe Kardiomyopathie als primäre Form oder in Verbindung mit einer Hyperthyreose als sekundäre Form. Die Therapie sowohl der hypertrophen Kardiomyopathie als auch der anderer kardiologischer Erkrankungen der Katze beinhalten nur in äußerst seltenen Fällen die Behandlung mit Digitalispräparaten. Eine Ausnahme stellt die dilatative Kardiomyopathie dar,

deren Häufigkeit in der letzten Jahren (seit ca. 1986) stark abgenommen hat, da zu dieser Zeit der erhöhte Bedarf der Katze an der Aminosäure Taurin entdeckt wurde. Diese Aminosäure ist seither in den kommerziellen Futtermitteln in ausreichender Menge enthalten (DEINERT, 2000). Der dementsprechend nur noch seltene Einsatz von Digoxin bei der Therapie der Kardiomyopathien der Katze machte es unmöglich, eine ausreichende Probenzahl zu erreichen. Aufgrund dieser Tatsachen wurde die Validierung der beiden Geräte zur Messung von Digoxin bei der Katze in dieser Arbeit nicht mehr weiter verfolgt.

11. Analytische Zuverlässigkeit des Beckman-Coulter Access®

Prüfung der Präzision

In der Intraassaypräzision für TT4 liegt der Variationskoeffizient zwischen 3,1 % und 23,6 %, woraus sich ein Mittelwert von 12,8 % ergibt. Die Interassaypräzision variiert von 9,2 % bis 31,4 %, der Mittelwert liegt bei 17,7 %. Diese Werte liegen im ähnlichen Bereich, unter 20 %, entsprechend den Variationskoeffizienten für TT4 aus der Studie von SINGH et al. (1997). Vergleicht man jedoch diese Werte mit der Studie von REIMERS et al. (1981) zur Validierung eines RIA (Variationskoeffizienten: Intraassay 4,2 % - 12,8 %, Interassay 4,0 % - 16,4 %), so ergeben sich in der vorliegenden Studie deutlich schlechtere Variationskoeffizienten sowohl im Intra- als auch im Interassay. Auch in der Arbeit von DONNE und WILDGOOSE (1984) sind die Variationskoeffizienten besser und liegen so wie auch bei BOUNAUD et al. (1988), mit einem Chemilumineszenzmunoassay, jeweils unter 10 %. Andererseits erhielten PUILLÉ et al. (2000) bei ihrer Untersuchung eines Chemilumineszenzmunoassays im Intraassay für TT4 einen noch deutlich höheren Variationskoeffizienten von 39 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass in Bezug auf die Präzision der Messungen die RIA-Methode wesentlich präziser ist, als das die Chemilumineszenz-Technik kann. Somit erreichen die radioaktiven Marker durchweg eine bessere Präzision. Die Ergebnisse aus dieser Studie und die Ergebnisse von SINGH et al. (1997) liegen im akzeptablen Bereich und bestätigen eine für die Routinemessungen ausreichende Präzision. Um das gesundheitliche Risiko und die

mit der Radioaktivität verbundenen Vorschriften zu vermeiden, kann diese geringgradig schlechtere Präzision in Kauf genommen werden.

Die Präzisionsprüfung für das fT4 fiel deutlich günstiger, im Vergleich zur Gesamt T4 Messung, für den Access® aus. Die Messungen ergaben einen mittleren Variationskoeffizienten für den Intraassay von 3,2 % (Minimum: 0,0 %, Maximum: 9,7 %) und für den Interassay von 6,3 % mit einem Minimalwert von 4,7 % und einem Maximalwert von 9,1 %. Diese Werte liegen ebenso unter 10,0 %, wie die Variationskoeffizienten für fT4, gemessen mit einem RIA in der Studie von BOUNAUD et al. (1988). Gleich gute Messungen erhielten PARADIS und PAGÉ (1996) und PUILLÉ et al. (2000) mit der Chemilumineszenz-Technik. Im Vergleich mit dem Elecsys® 2010 aus der Arbeit von SÁNCHEZ-CARBAYO et al. (1999) schneiden beide Geräte mit Variationskoeffizienten unter 10,0 % gleich gut ab.

Die Präzisionsprüfung für das Schilddrüsenhormon TT3 ergab für den Beckman-Coulter Access® Variationskoeffizienten für den Intraassay von 2,6 % bis 36,4 %; der sich aus den gesamten Werten errechnende Variationskoeffizient von 15,5 % liegt damit noch im akzeptablen Bereich. Der Variationskoeffizient für den Interassay bewegt sich im Bereich zwischen 8,2 % und 56,3 %. Der errechnete Mittelwert von 23,7 % fällt deutlich schlechter aus als die Intraassaypräzision. Damit liegen beide Variationskoeffizienten deutlich höher als die Variationskoeffizienten für den RIA, maximal 12,8 % bzw. 14,0 %, aus der Studie von REIMERS et al. (1981). Noch schlechter schneiden die Ergebnisse im Vergleich mit den Messungen von DONNE und WILDGOOSE (1984) ab, die mit Intraassay-Variationskoeffizienten von 3,8 % und Interassay-Variationskoeffizienten von 5,2 % eine hervorragende Präzision präsentieren. Auch der in der Arbeit von PUILLÉ et al. (2000) mit einem anderen Chemilumineszenzmunoassay gemessenen Variationskoeffizienten von 10,2 % und die Ergebnisse von SÁNCHEZ-CARBAYO et al. (1999) mit dem Elecsys® 2010 mit Werten von 3,1 % - 9,6 % im Intraassay und 6,6 % - 12,9 % im Interassay sind deutlich besser. Alle Messungen dieser Studie erfolgten an Proben mit sehr niedrigen TT3-Werten, wodurch sich die erkennbar schlechteren Ergebnisse erklären lassen. Im niedrigen Konzentrationsbereich ist die Präzision, mit der die Geräte messen, häufig schlechter als im mittleren oder hohen Konzentrationsbereich. In anderen Studien (ANDERSON und BROWN, 1979; REIMERS et al., 1981; DOONE und

WILDGOOSE, 1984) wurde, um die Präzision zu verbessern, der Test modifiziert. Auf eine derartige Modifikation der Tests wurde in dieser Arbeit verzichtet (siehe auch unten).

Die Variationskoeffizienten für den Intra- und Interassay für freies T3 liegen mit ihrem Mittelwert beide bei 12,6 % und sind damit doppelt so hoch wie der Variationskoeffizient für fT3 aus der Studie von PUILLE et al. (2000), der - ebenfalls gemessen mit einem Chemilumineszenzimmunoassay - bei 6,3 % liegt. Die durch den Beckman-Coulter Access® erzielten Werte liegen aber noch im akzeptablen Bereich.

Bei Kortisol liegen die Variationskoeffizienten für Intra- und Interassay zwischen 3,5 % und maximal 14,8 %, der Mittelwert entspricht 8,2 %. Diese Ergebnisse sind geringgradig schlechter als die von REIMERS et al. (1981) mit dem RIA gemessenen Werte, die 4,2 % und 5,3 % betragen. In der Interassaypräzision schneidet der Beckman-Coulter Access® besser ab als der RIA, der Variationskoeffizienten von 10,2 % - 16,5 % erreichte. Ähnlich gute Ergebnisse erhält der Beckman-Coulter Access® im Vergleich zu den Messungen von SINGH et al. (1997), bei denen der durchschnittliche Variationskoeffizient über dem des Access® liegt, aber insgesamt auch unter 20 % beibt.

Die Reihenmessungen von Insulin ergaben eine Intraassaypräzision von 1,1 % - 5,4 % mit einem Mittel von 3,6 %, während die Variationskoeffizienten für die Interassaypräzision zwischen 7,7 % und 28,6 % lagen und einen Mittelwert von 15,8 % ergaben. Die Ungenauigkeit trat bei der Messung von Proben mit sehr niedriger Insulinkonzentration auf. Hier kam der Access® im Intraassay sehr nahe an die Präzision der RIA-Methode aus der Studie von NELSON et al. (1990) heran. Beide blieben mit den Mittelwerten der Variationskoeffizienten deutlich unter 10,0 %. Die Interassaypräzision ist auch beim RIA deutlich ungenauer als beim Intraassay, dennoch lagen hier die Werte mit maximal 17,0 % noch unter 20,0 %. Dies ist beim Access® nicht der Fall.

Insgesamt fiel die Präzisionsprüfung für den Beckman-Coulter Access® zufriedenstellend aus. Bei der Intraassaypräzision lag er durchwegs unter 20,0 %, dies kann

als akzeptabel bewertet werden. Bei der Interassaypräzision lag er mit TT3 bei einem mittleren Variationskoeffizienten von 23,7 % über 20,0 % aufgrund von Patientenproben, die alle Hormonkonzentrationen im sehr niedrigen Bereich enthielten. Eine dieser Proben enthielt im Mittel 0,16 nmol/l Gesamt T3, bei einem unteren Messbereich des Gerätes von 0,30 nmol/l für Gesamt T3. Dementsprechend ergab sich bei der Interassaymessung ein Variationskoeffizient von 56,3 %, der naturgemäß die deutlich besseren Ergebnisse der anderen Messungen abwertet. Zudem ist bereits aus anderen Studien hinreichend bekannt, dass gerade im unteren Messbereich die Präzision des Hormontests schlechter ausfällt, wie oben bereits erwähnt. REIMERS et al. (1981) haben den niedrigsten Standard ihres RIA-Tests nochmals 1 : 2 verdünnt und den höchsten Standard weggelassen, um die Sensitivität des Tests hinsichtlich der niedrigeren Hormonkonzentrationen im Hunde- und Katzenserum zu erhöhen. ANDERSON und BROWN (1979) sicherten sich zusätzlich zu den erweiterten Standards noch mit der doppelten Menge an Probenmaterial ab, um eine möglichst hohe Genauigkeit der Messungen zu erreichen. Derartige Modifikationen sind bei der Messung mit dem Beckamn-Coulter Access® nicht notwendig, da der extrem große Messbereich auch die niedrigen Hormonkonzentrationen der Katze abdeckt.

Prüfung der Richtigkeit

Nach Aufstockung der Serumproben mit geeigneten Standards für die Schilddrüsenhormone ergaben sich die folgenden Wiederfindungsraten: Für Gesamt T4 lag die Wiederfindungsrate zwischen 98,0 % und 133,0 % mit einem Mittelwert von 115,0 %. Bei Gesamt T3 bewegte sich die Wiederfindungsrate im Bereich von 65,0 % bis 99,0 % und ergab einen Mittelwert von 82,0 %. Die Ergebnisse der TT4-Messungen zeigten eine deutliche Überschätzung der Konzentrationen, wie sie auch in anderen Studien, allerdings nicht in dieser Größenordnung, aufgetreten sind. DONNE und WILDGOOSE (1984) beschreiben eine Wiederfindungsrate von 93,0 % bis 107,0 % für Gesamt T4 und von 99,0 % bis 107,0 % für Gesamt T3. Unter Berücksichtigung der Empfehlungen der Bundesärztekammer hinsichtlich der akzeptablen Messabweichung bei TT4 beim Menschen in einem Bereich unter 60 nmol/l von 45,0 %, liegen die in dieser Studie gemessenen Werte noch innerhalb des akzeptablen

Bereichs. Da nachweislich im Katzenserum keine Hemmsubstanzen vorhanden sind, die hinsichtlich der Schilddrüsenhormone mit dem Testkit kreuzreagieren, muss die Ursache für die Überschätzung der Hormonkonzentration bei der Richtigkeitsprüfung im Testverfahren liegen. Die Unterschätzung der TT3-Konzentrationen bewegt sich ebenfalls in einem Bereich, der noch als akzeptabel zu bewerten ist. Die Ursache für diese Unterschätzung liegt möglicherweise in der Affinität der verwendeten Antikörper. Auch SINGH et al. (1997) haben bei der Validierung des Elecsys® 2010 festgestellt, dass es bei einigen Testverfahren zu dieser Unterschätzung der Ergebnisse kommt. Die Autoren führen dies auch auf die unterschiedliche Affinität der Antikörper hinsichtlich humaner und feline sowie anderer tierischer Hormone zurück.

Die Wiederfindungsrate von Kortisol betrug im Mittel 100,0 % mit einem Minimum von 83,0 % und einem Maximum von 110,0 %. Mit diesen Ergebnissen ist die Prüfung auf Richtigkeit beim Beckman-Coulter Access® deutlich besser ausgefallen als bei SINGH et al. (1997), die sowohl bei der Messung mit RIA wie auch mit CIA und CLEIA nur Wiederfindungsraten von > 90,0 % erreichten. Insofern liegt die Wiederfindungsrate für Kortisol im optimalen Bereich und bestätigt die Richtigkeit des Testverfahrens bei der Messung von Kortisol in Blutproben der Katze.

Insulin liegt mit seinem Mittelwert der Wiederfindungsraten bei 31,0 % und ist damit nicht mehr im akzeptablen Bereich. NELSON et al. (1990) erhielten mit dem RIA eine Wiederfindungsrate von 94,0 % bis 100,0 %. Die Ursache für die schlechte Wiederfindungsrate kann in der unterschiedlichen Struktur von humanem und felinem Insulin begründet sein. Zur Aufstockung des Katzenserums wurden humane Kontrollseren mit bekannter Hormonkonzentration verwendet. Entsprechende Sera mit felinem Insulin sind nicht erhältlich. Aufgrund der höheren Affinität der Insulinantikörper für humanes Insulin, wie auch schon STOCKHAM et al. (1983) in ihrer Studie vermuteten, kann es dadurch zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen.

Bei der Messung der Proben für die biologische Richtigkeit der Schilddrüsenhormone konnte für alle Parameter der erwartete Abfall der Hormonkonzentrationen im Serum nach Therapie bestätigt werden. Im Fall von Kortisol zeigte sich bei einer Katze ein

sehr deutlicher Anstieg von 50,0 % der Kortisolkonzentration, während die beiden anderen Probanden nur einen geringeren Anstieg von 20,0 % aufwiesen. Diese Werte werden als ausreichend zur Bestätigung der biologischen Richtigkeit angesehen. Zwei der Messungen der biologischen Richtigkeit für Insulin zeigten einen deutlichen Anstieg der Konzentration. Die dritte Messung lag bereits beim Ausgangswert sehr niedrig, zeigte aber postprandial ebenfalls einen Anstieg der Konzentration.

Insgesamt ergaben die Messungen hinsichtlich der biologischen Richtigkeit mit dem Beckman-Coulter Access® die erwarteten Ergebnisse und können als erfolgreich bewertet werden.

Prüfung der Spezifität

Zur Prüfung der Spezifität wurden die Schilddrüsenhormone mit Hilfe von Aktivkohle aus dem Serum extrahiert. Bei der Messung der so aufbereiteten Seren ergaben sich durchwegs Werte unterhalb der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze. Daraus resultiert, dass die testeigenen Nullstandards auch bei der Messung im Katzen serum Gültigkeit haben.

Die Verdünnungsreihen für das Schilddrüsenhormon TT4 verliefen - bis auf eine Fehlmessung, bei der nur die Ausgangskonzentration von TT4 gemessen wurde und die wahrscheinlich auf menschlichem Versagen beruhte - alle zufriedenstellend. Allerdings lagen die Werte geringfügig unterhalb des erwarteten Sollwertes. Diese Unterschätzung der wirklichen Hormonkonzentration bestätigen auch SINGH et al. (1997) in ihrer Studie bei einem Chemilumineszenzimmunoassay. Die geringere Affinität der humanen Antikörper gegenüber dem TT4 der Katze könnte dafür eine Erklärung sein. Bei den Verdünnungsreihen von TT3 lagen zu einem großen Teil schon die Ausgangskonzentrationen im niedrigen Bereich, wodurch sich die Werte nach Verdünnung teilweise im Bereich der unteren Nachweisgrenze bewegten. Dadurch ließen sich die als nicht messbar ausgewiesenen Werte bei zwei der Verdünnungsreihen erklären. Insgesamt waren die Ergebnisse der Verdünnungsreihen jedoch auch hier zufriedenstellend, allerdings mit der schon bei TT4

erwähnten Unterschätzung der Werte durch das Gerät. Für die freien Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 wurden in Anlehnung an die Empfehlung des Herstellers (BECKMAN-COULTER, 1999) keine Verdünnungsreihen gemessen. Entsprechend den Angaben des Herstellers und wie auch bei SÀNCHEZ-CARBAYO et al. (1999) erwähnt, ist eine Verdünnung der freien Schilddrüsenhormone wegen der sehr großen Messbreite des Gerätes nicht notwendig; gleichzeitig ist es auch nicht möglich, da durch die Verdünnung der Probe das Gleichgewicht von freien zu gebundenen Hormonen im Verhältnis zur Konzentration der Bindungsproteine verändert wird.

Vom Hersteller mitgelieferte Informationen hinsichtlich der Kreuzreakтивität der jeweiligen Antikörper zeigen eine signifikante Kreuzreaktion für TT4 mit L-Thyroxin von 100,0 %, D-Thyroxin von 72,5 %, reverse T3 von 19,9 % und für Tetrajodthyroacetat von 5,2 % (BECKMAN INSTRUMENTS, 1998). Bei TT3 sind 100,0 % Kreuzreakтивität für L-Trijodthyronin und D-Trijodthyronin zu nennen (BECKMAN INSTRUMENTS, 1998). Alle weiteren vom Hersteller getesteten Verbindungen liegen unter 3,0 % Kreuzreakтивität und sind somit nach REIMERS et al. (1981) als nicht signifikant zu bewerten.

Die Messungen der Verdünnungsreihen für Kortisol ergaben insgesamt eine gute Übereinstimmung mit den erwarteten Sollwerten sowie eine gute Linearität. Die erhaltenen Ergebnisse sind mit denen aus der Studie von REIMERS et al. (1981) vergleichbar. Anhand dieser Messungen mit der weitgehenden Parallelität der Verdünnungsreihen war erkennbar, dass im Katzenserum keine Hemmsubstanzen bezüglich Kortisol enthalten sind. Stoffe, die eine signifikante Kreuzreakтивität (über 3 %, REIMERS et al., 1981) aufweisen, wurden vom Hersteller (BECKMAN INSTRUMENTS, 1997) getestet und den Tests beigefügt. Es handelt sich hierbei um Prednisolon, 11-Desoxykortisol, Kortison, Kortikosteron und Prednison.

Die Verdünnungsreihen für Insulin ergaben hervorragende Ergebnisse mit einer ausgezeichneten Linearität innerhalb der Verdünnungsreihen. STOCKHAM et al. erhielten in ihrer Studie mit RIA (1983) entsprechend gute Ergebnisse. Der Hersteller hat auch hier die Kreuzreaktionen getestet und für Schweineinsulin 97,0 %, für Rinderinsulin 30,0 % nachgewiesen. Für Proinsulin besteht eine Kreuzreakтивität von

0,26 %. Da Katzeninsulin dem Rinderinsulin sehr ähnlich ist, kann auch hier von einer möglichen Kreuzreaktivität ausgegangen werden. Um dies vollständig ausschließen zu können, müssen hinsichtlich der Spezifität der Methode weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Das von NELSON et al. (1990) gewählte Verfahren wäre hier z. B. zu nennen. Die Autoren verwendeten bekannte Mengen von acetoneextrahiertem feline Pankreas, um damit Messungen zur Richtigkeit und Spezifität durchzuführen.

Insgesamt verlief die Prüfung auf Spezifität des Beckman-Coulter Access® zufriedenstellend. Die Linearität der Verdünnungsreihen war durchwegs akzeptabel. Die dabei geprüften testeigenen Nullstandards haben somit auch Gültigkeit im Katzenserum.

Prüfung auf Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze für TT4 lag bei 6,4 nmol/l, für fT4 bei 1,9 pmol/l, für TT3 bei 0,2 nmol/l, für fT3 bei 0,46 pmol/l, für Kortisol bei 11 nmol/l und für Insulin bei 0,21 pmol/l. Aufgrund dieser sehr niedrigen unteren Nachweisgrenzen und den aus der Literatur bekannten und innerhalb dieser Studie ermittelten Referenzwerten für diese Hormone bei der Katze ist das Testsystem des Access® auch zur Messung der beschriebenen Hormone im Katzenserum einsetzbar.

12. Analytische Zuverlässigkeit des Elecsys® 1010

Prüfung der Präzision

Beim Elecsys® 1010 lag der Mittelwert der Intraassaypräzision von TT4 bei 1,4 % und in der Interassaypräzision bei 7,7 %; damit ist er deutlich besser als der Beckman-Coulter Access®, der mit einem Mittelwert bei der Präzisionsmessung von über 10,0 % abschloss. Aufgrund dieser Ergebnisse ist der Elecsys® 1010 in der Präzisionsmessung vergleichbar den Werten aus den Studien von DOONE und WILDGOOSE (1984) und BOUNAUD et al. (1988), die ebenfalls unter 10,0 % lagen. Besser waren die Ergebnisse im Vergleich zum RIA aus der Studie von REIMERS et

al. (1981) mit Werten zwischen 4,2 % - 12,8 % und 4,0 % - 16,4 %, ebenfalls deutlich besser auch als die Ergebnisse von SINGH et al. (1997) und PUILLE et al. (2000), jeweils gemessen mit einem Chemilumineszenzimmunoassay. Der Elecsys® 1010 erreichte hier eine gleich gute oder sogar bessere Präzision als der RIA und ist damit bei der Messung von TT4 anderen Geräten, die mit Chemilumineszenz arbeiten (SINGH et al., 1997; PUILLE et al., 2000), überlegen. Daraus lässt sich schließen, dass Ruthenium als Marker in der Lage ist, eine gleich gute Präzision zu erzielen wie die wesentlich gesundheitsschädlicheren radioaktiven Marker.

Die Werte bei der Präzisionsprüfung für fT4 bewegten sich im Intraassay mit 0,0 % - 2,0 % bei einem Mittelwert von 1,0 %, im Interassay mit 3,1 % - 16,9 % bei einem Mittelwert von 8,2 % im sehr guten Messbereich. Hier lagen Elecsys® 1010 und Beckman-Coulter Access® in den Ergebnissen sehr nah beieinander. Beim Vergleich mit der Literatur entsprechen diese beiden Geräte sowohl dem von BOUNAUD et al. (1988) getesteten RIA als auch den von PARADIS und PAGÉ (1996) und PUILLE et al. (2000) validierten Chemilumineszenzimmunoassays, bei denen ebenfalls alle Variationskoeffizienten unter 10,0 % lagen.

Die Reihenmessungen für TT3 ergaben durchschnittliche Werte für den Intraassay von 2,3 %, für den Interassay von 7,3 %. Die Präzision dieses Gerätes war auch hier im Vergleich zu dem von REIMERS et al. (1981) verwendeten RIA besser (VK 12,0 % - 14,0 %). DOONE und WILDGOOSE (1984) erhielten gleiche Ergebnisse mit dem Immunoassay, der mit magnetischen Antikörpern arbeitet. Auch dem Vergleich mit dem Elecsys® 2010, der von SÀNCHEZ-CARBAYO et al. (1999) validiert wurde, kann der Elecsys® 1010 in dieser Studie ohne weiteres standhalten und ist in den Messungen der Intraassaypräzision noch deutlich besser als der Elecsys® 2010 mit Werten von 3,1 % - 9,6 %.

Die Variationskoeffizienten der Intraassaypräzision von fT3 befanden sich in einem Bereich zwischen 1,6 % und 8,7 % und bestätigten auch hier die durchaus gute Präzision des Gerätes. Dagegen fiel die Interassaypräzision deutlich schlechter aus und erreichte mit Werten zwischen 9,8 % und 107,3 % einen Mittelwert von nur 33,9 %. Bei der Intraassaymessung ist der Elecsys® 1010 dem von PUILLE et al. (2000) validierten Chemilumineszenzimmunoassay vergleichbar, allerdings schneidet

die Interassaypräzision deutlich schlechter ab. Diese signifikant schlechteren Ergebnisse erklären sich dadurch, dass die Hormonkonzentrationen der Proben, die zur Messung des Interassay verwendet wurden, deutlich niedriger waren als die Konzentrationen bei der Intraassaymessung. Die Probe, die zur Messung des Variationskoeffizienten von 107,3 % führte, lag mit ihrem Mittelwert bei einer Konzentration von 0,51 pmol/l und damit nahe an der unteren Nachweisgrenze des Gerätes von 0,4 pmol/l. Wie schon beim Beckman-Coulter Access® angesprochen, haben auch andere Autoren derartige Ungenauigkeiten bei der Messung von niedrigen Hormonkonzentrationen festgestellt und dementsprechend die Tests modifiziert (ANDERSON und BROWN, 1979; REIMERS et al., 1981). Würde man lediglich die fünf Messungen, die deutlicher von der unteren Nachweisgrenze zu unterscheiden sind, zur Berechnung heranziehen, erhielte man einen Variationskoeffizienten von 19,3 % und somit ein Ergebnis im akzeptablen Bereich.

In der Präzisionsprüfung für Kortisol lagen die Mittelwerte von Intra- und Interassay mit 13,6 % und 12,6 % sehr nahe zusammen. Die Ergebnisse beim Elecsys® 1010 waren in der Präzision schlechter als beim Beckman-Coulter Access®, der mit einem Mittelwert von 8,2 % noch unter der 10,0 %-Marke lag. Für den Elecsys® 1010 ergibt sich somit im Vergleich zum RIA aus der Studie von REIMERS et al. (1981) eine schlechtere Präzision. Vergleicht man die Ergebnisse mit dem CLIA und dem CLEIA aus der Studie von SINGH et al. (1997), liegen alle drei Geräte im akzeptablen Bereich mit Variationskoeffizienten deutlich unter 20,0 %. Hier zeigt sich wieder, dass die radioaktiven Marker beim Kortisol mit einer höheren Präzision arbeiten als die bei der Chemilumineszenz-Technik verwendeten Marker.

Die Präzisionsprüfung für Insulin fiel beim Elecsys® 1010 schlecht aus. Die Variationskoeffizienten für den Intraassay lagen zwischen 2,0 % und 313,0 %, woraus sich ein Mittelwert von nur 56,3 % ergibt. Bei der Interassaymessung ergaben sich Werte zwischen 8,8 % und 62,5 % mit einem Mittelwert von 25,8 %. Diese Ergebnisse liegen nicht mehr im akzeptablen Bereich. Beide Messungen, die deutlich aus der Reihe fallen, sind einfach erklärbar und sollten in der Bewertung keine Beachtung finden, da eine Probe gemessen wurde, deren Konzentration unterhalb der unteren Nachweisgrenze (1,39 pmol/l) des Gerätes lag. Insofern kann nicht auf einen Fehler beim Gerät abgestellt werden, sondern man hätte mit der

Messung einer neuen, in der Konzentration höheren Probe, das Ergebnis überprüfen müssen. Legt man lediglich die durchgeführten fünf Messungen zur Berechnung der Variationskoeffizienten zugrunde, so erhält man Mittelwerte für den Intraassay von 4,9 % und für den Interassay von 18,4 %. Damit liegen die Ergebnisse unter 10,0 % bzw. unter 20,0 % und können als gut bzw. noch ausreichend für die Präzision bewertet werden.

Prüfung der Richtigkeit

Die Serumproben mit bekannten Konzentrationen an Schilddrüsenhormonen TT4 und TT3 wurden mit testeigenen Standards und bekannter Hormonkonzentration aufgestockt, um die nachfolgend aufgeführten Wiederfindungsraten zu ermitteln.

Für TT4 ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 103,0 % mit einem Minimum von 86,0 % und einem Maximum von 127,0 %. Für TT3 lagen die Wiederfindungsraten zwischen 119,0 % und 142,0 % mit einem Mittelwert von 133,0 %. Die Wiederfindungsrate für TT4 ist etwas breiter gestreut als bei DONNE und WILDGOOSE (1984), zeigt aber keine so deutliche Überschätzung wie beim Beckman-Coulter Access®. Bei dem Schilddrüsenhormon TT3 lagen die Werte durchgehend über 100,0 % und zeigten eine Überschätzung der Ergebnisse, wie sie schon beim Beckman-Coulter Access® bei der Wiederfindung von TT4 beobachtet werden konnten. DONNE und WILDGOOSE (1984) erhielten bei ihren Messungen bessere und weniger weit gestreute Wiederfindungsraten von 99,0 % - 107,0 %. Auch beim Elecsys® 1010 wurde ausgeschlossen, dass sich im Katzenserum Stoffe befinden, die mit dem Test kreuzreagieren könnten. Die Ergebnisse lagen entsprechend der Empfehlung der Bundesärztekammer mit einer Abweichung unter 45,0 % noch im akzeptablen Bereich. Auch beim Elecsys® 1010 muss demzufolge die Ursache für die Überschätzung der Ergebnisse im Testverfahren begründet sein.

Bei Kortisol erreichte der Elecsys® 1010 Wiederfindungsraten zwischen 80,0 % und maximal 91,0 %, woraus sich ein Mittelwert von 86,0 % ergab. Beim Vergleich dieser Werte mit denen von SINGH et al. (1997) und auch mit den Ergebnissen des Beckman-Coulter® Access in der vorliegenden Studie war die Wiederfindungsrate

des Elecsys® 1010 mit unter 90,0 % wesentlich schlechter in der Richtigkeitsprüfung. Diese durchweg deutliche Unterschätzung der Werte kann auch hier auf die höhere Bindungsaffinität der Kortisolantikörper für das humane Kortisol zurückgeführt werden, da auch hier Humanstandards zur Aufstockung verwendet wurden.

Die Wiederfindungsraten von Insulin fielen noch schlechter aus als die von Kortisol. Der Mittelwert betrug 69,0 % bei einem Minimum von 57,0 % und einem Maximum von 77,0 %. Wie schon beim Kortisol beschrieben, liegt die Ursache für diese schlechten Wiederfindungsergebnisse vermutlich in der geringeren Affinität der testeigenen Antikörper gegenüber dem feline Insulin. NELSON et al. (1990) minimierten das Risiko dieser Unterschätzung aufgrund unterschiedlicher Insulinmoleküle in einer Probe, indem sie die Proben mit acetoneextrahiertem feline Pankreasextrakt aufstockten. Die damit durchgeführten Messungen mit einem RIA ergaben Wiederfindungsraten zwischen 94,0 % und 109,0 %. STOCKHAM et al. (1983) vermuteten ebenfalls eine schlechtere Affinität der Antikörper aus dem humanmedizinischen RIA-Test gegenüber dem caninen Insulin, obwohl sich das Insulin vom Hund nur in einer Aminosäure von dem des Menschen unterscheidet. Zu dem häufig in immunologischen Nachweisverfahren verwendeten Schweineinsulin besteht jedoch zu dem Insulin des Hundes kein struktureller Unterschied.

Diese Ergebnisse und die Erfahrungen aus anderen Studien (NELSON et al., 1990; STOCKHAM et al., 1983) sowie der Tatsache, dass sich die Insulinmoleküle sowohl speziespezifisch als auch gegenüber dem humanen Insulinmolekül unterscheiden, machen es notwendig, die Messungen mit Hilfe einer bereits validierten Methode (RIA, ELISA) zu bestätigen. Allerdings könnte sich dies als problematisch erweisen, da nur vereinzelt validierte und für diagnostische Zwecke verwertbare Assays zur Messung von Katzeninsulin erhältlich sind. Wie auch STOCKHAM et al. (1983) in ihrer Studie feststellten, sollte in jedem Fall der Referenzbereich für Insulin für jeden Assay speziell ermittelt werden.

Bei der Überprüfung der biologischen Richtigkeit für die Schilddrüsenwerte konnte für alle vier Hormone (Gesamt T4, fT4, Gesamt T3, und fT3) ein fast einheitlicher Rückgang der Hormonkonzentration nach Therapie mit Carbimazol um mindestens 50 % festgestellt werden. Nur je eine Messung von Gesamt T3 und fT3 zeigten zwar

auch einen Rückgang der Konzentration, allerdings nicht in der oben beschriebenen Größenordnung. Die TT3-Werte und zum Teil auch die fT3-Werte lagen häufig bei Katzen mit Hyperthyreose noch im Referenzbereich. Bei beiden Messungen lagen die Ausgangswerte nur gering über dem Referenzbereich und erklären damit die weniger ausgeprägte Supprimierung der Hormonkonzentration.

Zur Überprüfung der biologischen Richtigkeit von Kortisol wurde nach Entnahme der ersten Blutprobe die Kortisolkretion in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde mit Hilfe des ACTH-Stimulationstestes gesteigert. Der erwartete Anstieg der Hormonkonzentration konnte in allen drei Fällen in der jeweils nach Injektion von ACTH genommenen Probe nachgewiesen und somit die biologische Richtigkeit bei der Messung von Kortisol mit dem Elecsys® 1010 verifiziert werden. SINGH et al. (1997) konnten in ihrer Studie keinen derart deutlichen Anstieg der Kortisolkonzentration nach ACTH-Stimulation messen. In der Studie von SINGH et al. (1997) wurde das Medikament intramuskulär verabreicht und erst 1,5 Stunden nach Injektion der zweite Wert bestimmt. In der vorliegenden Studie wurde das Medikament intravenös verabreicht und die Kortisolkonzentration bereits eine halbe Stunde nach Injektion erneut gemessen. Dies könnte eine Erklärung für den geringeren Anstieg der Hormonmenge in der Studie von SINGH et al. (1997) sein.

Auch für Insulin konnte die biologische Richtigkeit erwartungsgemäß mit einem postprandialen Anstieg der Hormonkonzentration bestätigt werden. In zwei von drei Proben wurde ein sehr deutlicher Anstieg der Konzentration nachgewiesen. Die dritte Probe lag insgesamt bei einer niedrigen Konzentration, stieg aber nach Futteraufnahme um mehr als das Doppelte an. Auch NELSON et al. (1990) verzeichneten in ihrer Studie einen deutlichen Anstieg der Hormonkonzentration nach Glukosegabe.

Prüfung der Spezifität

Zur Prüfung der Spezifität des Elecsys® 1010 wurde ebenfalls ein Serum zur Messung benutzt, aus dem zuvor mit Hilfe von Aktivkohle die Schilddrüsenhormone extrahiert wurden. Bei der Messung der Schilddrüsenhormone im Anschluss an die

Extraktion wurde in geringem Maße noch eine TT4-Konzentration gemessen, die bei maximal 7,0 nmol/l lag. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 5,4 nmol/l. Andere Schilddrüsenhormone konnten nach der Behandlung des Serums mit Aktivkohle nicht mehr nachgewiesen werden. Die bei der Extraktion verwendeten Sera wurden sowohl auf dem Beckman-Coulter Access® als auch auf dem Elecsys® 1010 gemessen. Beim Access® lagen die gemessenen Konzentrationen aller Schilddrüsenhormone nach der Extraktion unterhalb der unteren Nachweisgrenze, was vermuten lässt, dass sich im Serum der Katze Substanzen befinden, die mit den Antikörpern aus dem TT4-Test des Elecsys® 1010 kreuzreagieren. Eine weitere Erklärung könnte auch sein, dass der Test des Elecsys® 1010 wesentlich sensitiver ist als der des Beckman-Coulter Access®. In der vorliegenden Studie wurde das Serum 24 Stunden mit Aktivkohle extrahiert. Andere Studien dehnten diese Inkubationszeit auf 48 Stunden aus, teilweise wurde nach 24 Stunden das Serum nach vorheriger Reinigung erneut mit Aktivkohle versetzt. Mit Hilfe dieser Methode könnte eine Überprüfung der Ergebnisse vorgenommen werden, um endgültig eine Kreuzreaktivität auszuschließen. Bei der Wiederfindung zeigte der Elecsys® 1010 keine kontinuierliche Überschätzung der TT4-Werte, sondern lag zum Teil deutlich unter 100,0 % Wiederfindungsrate. Eine durchgängig zu verzeichnende Überschätzung der Werte, wie im Falle der Wiederfindung von TT3, würde die Vermutung für eine Kreuzreaktion der Antikörper mit anderen Stoffen aus dem Serum unterstützen.

Als weiteres Kriterium für die Spezifität eines analytischen Messverfahrens gilt die Linearität von Verdünnungsreihen. Aus diesem Grund wurden von den zu bestimmenden Hormonen jeweils vier Verdünnungsreihen mit einer vom Hersteller mitgelieferten Verdünnungslösung angefertigt und mit dem Elecsys® 1010 gemessen. Mit Ausnahme einer Fehlmessung innerhalb der vier Verdünnungsreihen von TT4 lagen die gemessenen Istwerte nur geringfügig über den Sollwerten. Auch die Linearität war bei den Messungen der Verdünnungsreihen mit dem Elecsys® 1010 sehr gut. Im Vergleich zu den Messungen mit dem Beckman-Coulter Access®, der eine kontinuierliche Unterschätzung der Werte produzierte, zeigte der Elecsys® 1010 eine höhere Spezifität. Zudem lagen die Werte beim Elecsys® 1010 näher an den errechneten Sollwerten. DONNE und WILDGOOSE (1984) verwendeten in ihrer

Studie den testeigenen Nullstandard zur Verdünnung der Proben und konnten ebenfalls, wie auch bereits REIMERS et al. (1981), einen linearen Abfall der Hormonkonzentration von T4 bei der Messung mit einem RIA feststellen. SINGH et al. (1997) erhielten bei der Verdünnung von T4 mit allen drei Methoden (RIA, CLEIA, CLIA) eine gute Linearität. In Verbindung mit den Ergebnissen der Extraktion der Schilddrüsenhormone lässt sich die geringe Überschätzung der Ergebnisse damit erklären, dass im Katzenserum Stoffe vorhanden sind, die mit dem T4-Test kreuzreagieren. Der Hersteller hat eine signifikante Kreuzreaktivität für L-Thyroxin und D-Thyroxin mit jeweils 100,0 % ermittelt (ROCHE, 1999). Wie schon bei der Wiederfindung diskutiert, könnte zum sicheren Ausschluss einer Kreuzreaktivität mit Verbindungen im Katzenserum das Serum einer längeren Extraktion mit Aktivkohle unterzogen werden. Kann nach der längeren Extraktion immer noch eine T4-Konzentration gemessen werden, sind kreuzreagierende Stoffe im Serum enthalten; ist jedoch keine messbare Hormonkonzentration mehr nachweisbar, sind die Antikörper aus dem T4-Test des Elecsys® deutlich sensitiver und spezifischer als z. B. die Antikörper des Beckman-Coulter Access®.

Bei der Verdünnung von TT3 zeigt der Elecsys® 1010 in allen vier Verdünnungsreihen eine extreme Abweichung des Istwertes vom Sollwert im Sinne einer Überschätzung der ermittelten Werte. Die gemessenen Werte werden zwar mit zunehmender Verdünnung niedriger, allerdings nicht in dem Maße, wie es dem Verdünnungsverhältnis entsprechen würde. Diese Überschätzung der TT3-Konzentration korreliert mit den erhaltenen Ergebnissen der Richtigkeitsprüfung, bei der Wiederfindungsraten zwischen 119,0 % und 142, 0 % gemessen wurden. Da mit Hilfe der Extraktion der Schilddrüsenwerte eine Kreuzreaktivität anderer Stoffe mit den TT3-Antikörpern vollständig ausgeschlossen werden konnte, muss die Ursache für diese überdurchschnittliche Überschätzung der Werte im Testverfahren begründet sein. Informationen des Herstellers bezüglich der Kreuzreaktivität mit anderen Stoffen liegen vor. Zu nennen sind insbesondere D-Trijodthyronin mit 100,0 % und 3,3',5-Trijodthyroessigsäure mit 106,0 % Kreuzreaktivität (ROCHE, 1999).

Die Verdünnungsreihen von Kortisol und Insulin waren insgesamt sehr zufriedenstellend mit einer hervorragenden Linearität und einer sehr hohen Messgenauigkeit hinsichtlich des Sollwertes. Insofern sind die Ergebnisse der Verdünnungsreihen von

Kortisol und Insulin vergleichbar denen des Beckman-Coulter Access® und auch den aus der Literatur bekannten Studien von REIMERS et al. (1981) und SINGH et al. (1997) für Kortisol und NELSON et al. (1990) für Insulin. Vom Hersteller ermittelte Kreuzreaktionen bestehen bei Kortisol für 21-Deoxykortisol mit 45,4 %, für Kortikosteron mit 5,8 % und für 11-Deoxykortisol mit 4,1 %. Bei den Stoffen mit Kreuzreakтивität mit Insulin handelt es sich um Rinderinsulin mit 25,0 % und Schweineinsulin mit 19,2 % (ROCHE, 1999). Alle weiteren getesteten Verbindungen für diese beiden Hormone lagen unter 3,0 % Kreuzreaktion und gelten somit als nicht signifikant (REIMERS et al., 1981).

Prüfung auf Sensitivität

Die unteren Nachweisgrenzen liegen beim Elecsys® 1010 für TT4 bei 5,4 nmol/l, für fT4 bei 0,30 pmol/l, für TT3 bei 0,30 nmol/l, für fT3 bei 0,40 pmol/l, für Kortisol bei 8,0 nmol/l und für Insulin bei 1,39 pmol/l. Der Elecsys® 1010 ist aufgrund seiner Testverfahren und den sehr niedrigen unteren Nachweisgrenzen erfolgreich für die Messung der oben angeführten Hormone im Katzenserum einsetzbar. Dies wird anhand der aus der Literatur bekannten und in dieser Studie ermittelten Referenzwerte bestätigt.

13. Vergleich Beckman-Coulter Access® mit dem Elecsys® 1010

Beide Geräte sind aufgrund ihrer sehr hohen Sensitivität auch ohne Abwandlung der Standardkurve oder Verdoppelung der Serummenge, wie bei Tests (RIA) anderer Studien zur Verbesserung der Präzision angewandt (ANDERSON, BROWN, 1979; REIMERS et al., 1981; DONNE, WILDGOOSE, 1984), geeignet zur Messung der getesteten Hormone im Katzenserum. Ferner sind beide Geräte aufgrund ihres Random-Access-Betriebes, der die parallele Bearbeitung mehrerer Proben gleichzeitig zulässt, deutlich schneller. Demzufolge ergibt sich eine höhere Effektivität für den täglichen Routineablauf im medizinischen Labor, die durch die Verwendung von effektiveren Technologien noch gesteigert wird (VAN LENTE, 1997). Durch diese Vollautomatisierung verfügen die Geräte über mehrere Vorteile: Weniger Zeit wird für

die Bearbeitung der Proben benötigt, der Faktor Mensch als potentielle Fehlerquelle wird auf ein Minimum und die benötigten Probenmengen werden deutlich reduziert (JOHN, 1999). Letzteres ist speziell in der Tiermedizin von großem Vorteil, da hier, wie schon vorher angesprochen, aufgrund der geringen Größe der Patienten auch die zu gewinnende Blutmenge limitiert ist und dadurch häufig auf Blutuntersuchungen mangels Probenmaterial verzichtet werden muss. Wie aus der Literatur bereits bekannt ist und auch in dieser Studie bestätigt werden konnte, arbeiten die Geräte mit einer sehr hohen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit. Ebenso ist die Sensitivität im Vergleich zu anderen immunologischen Messmethoden deutlich höher, wodurch sich eine größere Messbreite ergibt (PATTERSON et al., 1994; SÁNCHEZ-CARBAYO et al., 1999).

Prüfung der Präzision

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Geräte miteinander, so ist leicht erkennbar, dass hinsichtlich der Präzision bei Messungen der Schilddrüsenhormone der Elecsys® 1010 dem Beckman-Coulter Access® deutlich überlegen ist. Insbesondere bei Messungen der Intraassay-Präzision liegen die Variationskoeffizienten des Elecsys® 1010 deutlich niedriger als die Variationskoeffizienten des Access®, wohingegen die Interassay-Präzision annähernd gleich gut zu bewerten ist. Aufgrund der Verwendung von Sera mit deutlich unterschiedlichen Hormonkonzentrationen bei der fT3 Messung auf den beiden Geräten, können die sehr schlechten Ergebnisse des Elecsys® 1010 nicht mit denen des Access® verglichen werden. Basierend auf der Tatsache, dass die Konzentration des im Elecsys® 1010 gemessenen Serums unter der unteren Nachweisgrenze lag, kann hier kein Vergleich mit den Ergebnissen des Beckman-Coulter Access® vorgenommen werden. Die restlichen Interassay-Messungen von fT3 fielen nur wenig schlechter aus als beim Access®.

Ganz gegenteilig verhielt es sich bei der Präzisionsprüfung für Kortisol und Insulin. Hier erreichte der Beckman-Coulter Access® bessere Variationskoeffizienten als der Elecsys® 1010. Bei Kortisol lag der Access® unter 10,0 %, der Elecsys® 1010

geringfügig über 10,0 % und damit noch im akzeptablen Bereich. Bei Insulin schnitt der Elecsys® 1010 aufgrund einer Probe, deren Hormonkonzentration deutlich unterhalb der unteren Nachweisgrenze des Gerätes lag, sehr viel schlechter ab. Die übrigen Messungen zur Präzisionsprüfung wiesen für beide Geräte entsprechend gute Ergebnisse auf und können damit hinsichtlich dieses Parameters als miteinander vergleichbar angesehen werden.

Prüfung der Richtigkeit

Der Beckman-Coulter Access® überschätzte die Werte bei TT4 durchwegs deutlich, während sich bei der Messung von TT3 eine Unterschätzung der Werte ergab. Der Elecsys® 1010 verhielt sich umgekehrt. Die Wiederfindung von TT4 lag mit 103,0 % im optimalen Bereich, während die TT3-Werte in hohem Maße überschätzt wurden. Für beide Geräte wurde hinsichtlich der jeweils überschätzten Hormone eine Kreuzreaktivität mit anderen Stoffen im Katzenserum ausgeschlossen, so dass die Ursache dafür wohl ein systematischer Fehler im Testverfahren selbst sein dürfte, der im Routinebetrieb der Geräte mit bedacht und insofern in Kauf zu nehmen wäre.

Bei der Messung der Schilddrüsenwerte für die biologische Richtigkeit können beide Geräte den erwarteten Abfall der Hormonkonzentrationen sowohl bei den gebundenen wie auch bei den freien Hormonen darstellen.

Bei der Wiederfindung von Kortisol war der Beckman-Coulter Access® das überlegene Gerät und überzeugte mit einer Wiederfindungsrate von durchschnittlich 100,0 %, während der Elecsys® 1010 bei der Messung eine kontinuierliche Unterschätzung der Werte aufwies. Dabei zeigte sich die Überlegenheit der beim Access® verwendeten Antikörper, die offensichtlich eine höhere Affinität zu felinem Kortisol aufwiesen als die im Testsystem des Elecsys® 1010 zum Einsatz kommenden Antikörper.

Bei der Messungen der Kortisolwerte im Rahmen der biologischen Richtigkeitsprüfung zeigten bei beiden Geräten in gleichem Maße einen deutlichen Anstieg der Konzentration und sind dementsprechend als erfolgreich zu bewerten.

Hinsichtlich der Wiederfindung von Insulin verhielten sich die Geräte umgekehrt proportional zu den Ergebnissen des oben besprochenen Kortisol. Beide Geräte zeigten eine Unterschätzung der Werte. Der Beckman-Coulter Access® mißt offensichtlich - aufgrund der extremen Affinität für humanes Insulin - in den mit humanen Standards aufgestockten Proben nur das Hormon aus den Standards und nicht das feline Insulin aus den Proben. Beim Elecsys® 1010 ist dieser Effekt nicht ganz so ausgeprägt und erreicht noch eine Wiederfindungsrate von 69,0 %, ebenfalls ein unbefriedigendes Ergebnis.

Bei der Überprüfung der biologischen Richtigkeit für Insulin zeigten beide Geräte in jeweils zwei Messungen einen zu erwartenden deutlichen Anstieg der Konzentration. Jeweils eine Messung ergab einen geringen Anstieg der Konzentration, wobei bei beiden Proben der Ausgangswert im sehr niedrigen Bereich lag. Aufgrund dieser Ergebnisse zeigte sich für beide Geräte, dass ohne humanes Insulin das feline Insulin, zumindest in einem gewissen Maße, durch die in den Tests verwendeten Antikörper gebunden wird. Allerdings sei auch hier in Anlehnung an die Literatur nochmals darauf hingewiesen, dass es insbesondere im Falle des Insulins sinnvoll ist, jeden Test gesondert auf die Möglichkeit der Anwendung bei der Katze zu überprüfen und für jeden Test eigene Referenzwerte festzulegen (STOCKHAM et al., 1983). Ferner empfiehlt es sich, wie bereits angesprochen, bei beiden Geräten eine Spezifitätsprüfung unter Verwendung von felinem Pankreasextrakt durchzuführen (NELSON et al., 1990), um einen sicheren Nachweis der Bindungsaffinität der testeigenen Antikörper für felines Insulin zu erhalten. Felines Insulin steht derzeit jedoch nicht zur Verfügung.

Prüfung der Spezifität

Das Ergebnis für den Beckman-Coulter Access®, bei dem die Konzentrationen aller Schilddrüsenhormone nach der Extraktion mit Aktivkohle unter der unteren Nachweigrenze lagen, ist in dieser Arbeit besser ausgefallen als für den Elecsys® 1010. Beim Elecsys® 1010 waren alle vier gemessenen TT4-Werte gerade noch messbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Katzenserum keine Verbindungen enthalten sind, die mit dem Test des Access® kreuzreagieren. Beim Elecsys® 1010

hingegen scheinen noch Substanzen im Serum enthalten zu sein, die mit dem Test zur Bestimmung von Gesamt T4 interferieren. Allerdings korrespondiert dieses Ergebnis nicht mit den guten Ergebnissen bei der Bestimmung der Wiederfindungsrate von Gesamt T4 (103,0 % Wiederfindungsrate). Der Grund dafür liegt möglicherweise in der Tatsache, dass dieses Testverfahren um ein Vielfaches sensitiver ist als das des Beckman-Coulter Access®. In der Literatur wurde von einigen Autoren Serum verwendet, das nicht nur für 24 Stunden, sondern für 48 Stunden mit Aktivkohle versetzt war, um damit sämtliche Hormone aus dem Serum zu eliminieren. Um eine mögliche Kreuzreaktivität sicher zu bestätigen oder auszuschließen, wäre eine erneute Messung mit Serum, das 48 Stunden mit Aktivkohle versetzt war, anzuraten.

Bei den Verdünnungsreihen von TT4, gemessen mit dem Elecsys® 1010, scheint die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität mit anderen im Katzenserum enthaltenen Stoffen wiederum bestätigt. Die vier Verdünnungsreihen zeigten eine geringradige Überschätzung der Hormonkonzentrationen bei sehr guter Linearität. Eine weniger gute Linearität wies der Beckman-Coulter Access® bei der Messung der Verdünnungsreihen auf, und zwar zeigte sich bei diesem Gerät durchwegs eine Unterschätzung der Konzentration, die im Gegensatz zur Überschätzung bei der Wiederfindung steht. Eine Verdünnungsreihe, bei der es sich um eine vollständige Fehlmessung handelt, wurde nicht zur Beurteilung herangezogen, da wohl eher von menschlichem Versagen als von einem Gerätefehler ausgegangen werden kann.

Bei den Verdünnungsreihen für TT3 zeigte das Testverfahren des Beckmann-Coulter Access® die weitaus höhere Spezifität mit drei von vier sehr guten Resultaten sowohl bei der Linearität als auch hinsichtlich der Annäherung an den Sollwert. Beim Elecsys® 1010 lagen die Werte aller vier Messungen deutlich über den erwarteten Sollwerten entsprechend der Überschätzung bei der Wiederfindung und wiesen zudem noch eine mäßige Linearität auf. Diese Überschätzung des Elecsys® 1010 konnte bei der Extraktion nicht nachvollzogen werden und ist demzufolge als ein systematischer Fehler im Testverfahren anzusehen.

Die Verdünnungsreihen von Kortisol ergaben bei beiden Geräten sehr gute Ergebnisse. Sie zeigten eine gleich gute Annäherung an den Sollwert bei

hervorragender Linearität. Im Gegensatz zu den schlechten Ergebnissen des Elecsys® 1010 bei der Wiederfindung von Kortisol war bei der Verdünnung keinerlei Unterschätzung der Konzentrationen zu finden, wohingegen der Beckman-Coulter Access® im Gegensatz zur hervorragenden Wiederfindung eher zur leichten Unterschätzung der Werte neigte.

Beim Vergleich der beiden Geräte bei den Verdünnungsreihen für Insulin konnte beim Elecsys® 1010 eine minimal bessere Annäherung der Ergebnisse an den erwarteten Sollwert als beim Access® festgestellt werden. Beide Geräte wiesen jedoch eine hervorragende Linearität bei der Messung der Verdünnungsreihen von Insulin auf.

Insgesamt zeigten beide Geräte in dieser Studie gute Ergebnisse und können hinsichtlich der durchgeführten Untersuchungen als geeignet für die Anwendung bei der Messung der getesteten Hormone in Katzenblutproben bewertet werden, mit Ausnahme des Insulins, das besonders bei der Wiederfindung bei beiden Geräten keine akzeptablen Ergebnisse erreichte. Für dieses Hormon müssen noch weitergehende Untersuchungen angeschlossen werden, da diese aufgrund des Mangels an feline Insulinstandards und der fehlenden Möglichkeit, z. B. feline Pankreasextrakt zu verwenden, nicht durchgeführt werden konnten. Die erhaltenen Resultate der beiden Geräte zeigten die in geringem Masse vorhandene Fähigkeit beider Testverfahren, feline Insulin nachzuweisen. Allerdings konnte nicht bewiesen werden, dass dies für die Diagnostik ausreichend ist. Aus diesem Grund werden auch die für Insulin gemessenen Referenzwerte als nicht verwertbar erachtet.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie und im Hinblick auf die bei der Katze am häufigsten benötigten Werte ist der Elecsys® 1010 das für diese Tierart besser geeignete Gerät, da es bei der Messung der Schilddrüsenhormone, insbesondere des TT4, das bei der Katze noch immer der wichtigste Parameter zur Diagnose der Hyperthyreose ist, die durchweg besseren Ergebnisse erbracht hat. Der systematische Fehler im Sinne einer Überschätzung der Werte bei der Bestimmung von TT3 kann aufgrund der insgesamt eher im niedrigen Bereich liegenden TT3-Werte bei der Katze in Kauf genommen werden.

Während der Arbeit mit den beiden Geräten wurde der Elecsys® 1010 als das im täglichen Umgang und im Arbeitsablauf bedienerfreundlichere Gerät empfunden. Die Handhabung des Beckman-Coulter Access® ist komplizierter und damit auch zeitaufwändiger im Hinblick auf die Eingabe und die Vorbereitung der einzelnen Proben. Ein weiteres positives Kriterium für die Verwendung des Elecsys® 1010 ist der Einsatz von Ruthenium als Chemilumineszenz-Marker. Ruthenium kann im Vergleich zu anderen Chemilumineszenz-Markern immer wieder verwendet werden, während andere Marker wie Luminoll oder Acridinester nur einmal reagieren können (WON-YOUNG, 1997; ROCHE DIAGNOSTICS, 1999).

14. Bestimmung der Referenzwerte

Aufgrund der Tatsache, dass eine breite Streuung der Konzentrationen der peripheren Schilddrüsenhormone sowohl bei euthyreoten als auch bei hyperthyreoten Individuen bekannt ist, ergibt sich eine gewisse Unsicherheit bei der alleinigen Bestimmung von Gesamt T4 und Gesamt T3 zur Diagnose von Schilddrüsenfunktionsstörungen (PUILLE et al., 2000). Wie auch aus der Humanmedizin bekannt, bestehen zusätzlich dazu mehrere Faktoren, die für diese Streubreite besonders bei der Messung von T3 und T4 verantwortlich sind. Durch die Proteinbindung dieser Hormone sind sie ausgeprägten (inter)individuellen Schwankungen unterworfen, die durch Medikamente, unterschiedliche Östrogen-Spiegel und - wie bereits erwähnt - durch extrathyreoidale Krankheiten (NTI) mit schwerer Allgemeinstörung beeinflusst werden (MCLOUGHLIN, 1993). Dem wurde, auch in Anlehnung an die bereits erwähnte Literatur und die Empfehlung der Autoren STOCKHAM et al. (1983) dahingehend Folge geleistet, dass die Referenzwerte für das Gerät Elecsys® 1010 und das Labor der I. Medizinischen Tierklinik der LMU München individuell festgelegt wurden.

Diese Referenzwerte haben nur Gültigkeit für den Elecsys® 1010 und die Katzenpopulation im Klientel der Tierklinik der Universität München. Insofern sind sie nicht als allgemein gültig anzusehen und nicht für die Anwendung in tierärztlichen Institutionen in anderen Regionen und für andere Geräte zu Grunde zu legen.

Zusammenfassung

Die schnelle und exakte Bestimmung von Laborparametern, wie z. B. Hormonen, ist ein entscheidender Schritt für die Diagnostik und die sich anschließende Therapie in der Tiermedizin.

In dieser Arbeit wurden zwei Geräte zur Messung der Schilddrüsenhormone Thyroxin (TT4), Trijiodthyronin (TT3), freies Thyroxin (fT4), freies Trijiodthyronin (fT3), Kortisol und Insulin im Katzenserum validiert. Zur Messung dieser Hormone standen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung, der Beckman-Coulter Access[®], der mit Chemilumineszenz-Technik arbeitet, und der Elecsys[®] 1010, der die Parameter mit der Elektrochemilumineszenz-Technik misst. Beide Testverfahren wurden hinsichtlich der Faktoren Präzision, Richtigkeit und Spezifität bewertet. Zu diesem Zweck wurden zehn Messungen in einem Durchgang (Intraassay), Reihenmessungen an zehn aufeinander folgenden Tagen (Interassay), Messungen hinsichtlich Wiederfindung und biologische Richtigkeit sowie Verdünnungsreihen der einzelnen Hormone durchgeführt. Für die Schilddrüsenhormone wurde zusätzlich die Spezifität mit Hilfe der Messung von mit Aktivkohle behandeltem Serum geprüft. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse können beide Geräte als geeignet für den Einsatz in der Tiermedizin beurteilt werden mit Ausnahme der Insulinmessung. Notwendige Untersuchungen für die genaue Evaluierung, z. B. mit acetoneextrahiertem feline Pankreas, konnten im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt werden. Insofern kann über die Eignung der getesteten Geräte – Beckman-Coulter Access[®] und Elecsys[®] 1010 - im Hinblick auf die Messung von Insulin im Katzenserum nicht ohne das Vorliegen der Ergebnisse der oben angegebenen, notwendigen weiteren Untersuchungen endgültig entschieden werden.

Im Anschluss an die Validierung wurden mit dem Elecsys[®] 1010 die Referenzwerte für die Schilddrüsenhormone und Kortisol bei 118 gesunde Katzen bestimmt. Die sich daraus ergebenden Referenzbereiche liegen für Gesamt T4 zwischen 11,1 nmol/l und 48,7 nmol/l, für fT4 zwischen 7,2 pmol/l und 38,6 pmol/l, für Gesamt T3 zwischen 0,7 nmol/l und 1,6 nmol/l, für fT3 zwischen 1,0 pmol/l und 9,8 pmol/l sowie für Kortisol zwischen 6,9 nmol/l und 388,4 nmol/l. Die bei 115 gesunden Katzen für

Insulin ermittelten Referenzwerte konnten aufgrund der nicht ausreichend geprüften Fähigkeit der beiden Testverfahren und der dazugehörenden Antikörpern, nicht als gültig für die Verwendung in der Diagnostik bewertet werden. Die Werte der Schilddrüsenhormone Gesamt T4, fT4, Gesamt T3 und fT3 sowie für Kortisol werden für den Elecsys® 1010 als Referenzbereiche angegeben.

Summary

Validation and comparison of two determining methods for thyroid hormones, cortisol and insulin of cats.

Quick and precise determination of laboratory parameters, like for instance hormones, is a decisive step for diagnostics and the subsequent therapy in veterinary medicine.

This paper has been used to validate two devices for measuring the thyroid hormones thyroxine (TT4), triiodothyronine (TT3), free thyroxine (fT4), free triiodothyronine (fT3), cortisol and insulin in feline serum. Different processes are available for measuring these hormones, one being the device Beckman-Coulter Access[®], using chemical luminescence technology and Elecsys[®] 1010, measuring the parameters using the electro-chemical luminescence technology. Both testing processes were assessed with respect to the factors precision, correctness and specificity. Ten measurements were made in one run for this purpose (intra-assay), serial measurements on ten consecutive days (inter assay), measurements for repeated detection and biological correctness as well as serial dilution measurements were made for the individual hormones. Additionally, the specificity is tested for the thyroid hormones using serum treated using activated carbon. Based on the results received, both devices may be assessed as suitable for use in veterinary medicine, with the exception of insulin measurement. Required examinations for exact evaluation, for instance using feline pancreas extracted using acetone, could not be performed within the scope of this study. Therefore, no final decision may be made on suitability of the devices tested - Beckman-Coulter Access[®] and Elecsys[®] 1010 – with respect to measurement of insulin in feline serum without having the results of the above mentioned further required examinations.

Subsequent to validation, Elecsys[®] 1010 was used to determine the reference values for thyroid hormones and cortisol of 118 healthy cats. The resulting reference ranges are for TT4 between 11.1 nmol/l and 48.7 nmol/l, for fT4 between 7.2 pmol/l and 38.6 pmol/l, for TT3 between 0.7 nmol/l and 1.6 nmol/l, for fT3 between 1.0 pmol/l and 9.8 pmol/l and for cortisol between 6.9 nmol/l and 388.4 nmol/l. The reference values

determined for insulin for 115 healthy cats could not be assessed as valid for use in diagnostics due to the insufficiently tested ability of the two testing processes and the associated antibodies. The values for the thyroid hormones TT4, TT3, fT4, fT3 and cortisol are stated as reference ranges for the Elecsys® 1010 remaining in the laboratory of the I. Medizinischen Tierklinik (first veterinary clinic) of LMU Munich.

Literaturverzeichnis

Anderson JH, Brown RE: Serum thyroxin (T4) and triiodothyronine (T3) uptake values in normal adult cats as determined by radioimmunoassay. Am J Vet Res 1979; 40: 1493 - 1494.

Babson AL, et al: The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogenous ligand assay. Clin Chem 1991; 37: 1521 - 1522.

Bamberger E: Endokrinium. In: Lehrbuch der Veterinär Physiologie. Wittke G. Hrsg. 7. Auflage. Berlin. Verlag Paul Parey 1987; 438 - 477.

Beckman-Coulter: Access Immunoassay System. Referenzhandbuch, 1999.

Beckman Instruments, Inc. Cortisol. 1997; 25 – 32.

Beckman Instruments, Inc. Ultrasensitive Insulin. 1997; 19 – 24.

Beckman Instruments, Inc. Total T3. 1998; 19 – 24.

Beckman Instruments, Inc. Total T4. 1998; 19 – 24.

Berson SA, Yalow RS: Radiometrische Verfahren. In: Immunologische Arbeitsmethoden. Friemel H, Hrsg. 4. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag 1991; 120 - 134.

Blackburn GF, Shah HP, Kenten JH, Leland J, Kamin RA, Link J, Peterman J, Powell MJ, Shah A, Talley DB, Tyagi SK, Wilkins E, Wu TG, Massey RJ. Electrochemiluminescence Detection for Development of Immunoassays and DNA Probe Assays for Clinical Diagnostics. Clinical Chemistry 1991; 37: 1534 - 1539.

Bounaud JY, Bounaud MP, Begon F: One-Step Chemiluminescent Immunoassay of Free Thyroxin with Acridinium-Ester-Labeled Thyroxin Evaluated and Compared with a Two-Step Radioimmunoassay. *Clin Chem* 1988; 34: 2556 - 2560.

Broussard JD, Peterson ME, Fox PF: Changes in clinical and laboratory findings in cats with hyperthyroidism from 1983 to 1993, *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206: 302 - 305.

Bucknell DG: Feline hyperthyroidism: spectrum of clinical presentation and response to carbimazol therapy. *Aus Vet J* 2000; 78: 462 - 465.

Büchler F: Hyperthyreose bei der Katze. *Diss med vet*, München 1999.

Carpenter AB. Enzyme-Linked Immunoassay. In: Manual of clinical laboratory immunology, Noel RR, de Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM Hrsg. 5. Aufl. Washington DC, American Society for microbiology 1997; 20 - 29.

Chastain CB. Adrenocortical suppression in cats administered megestrol acetate (abstract). American College of Veterinary Internal Medicine Scientific Proceedings, Salt Lake City, 1982; 54.

Chastain CB, et al. Congenital hypothyroidism in a dog due to an iodide organification defect. In: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Feldman EC und Nelson RW. Hrsg. 2. Aufl. Philadelphia: WB Saunders Company 1996; 68 - 117.

Coons AB, Creech JH: Fluorescence Immunoassays. In: Manual of clinical laboratory immunology. Noel RR, de Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM et al. Hrsg. 5. Aufl. Washington DC: American Society for microbiology 1997; 39 - 48.

Deinert M. Spezielle Herzkrankheiten. In: Kleintierkrankheiten, Band 1, Innere Medizin. Kraft W, Hirschberger J. 3. Aufl. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer 2000; 325 -367.

Donne CS, Wildgoose WH. Magnetic antibody immunoassay thyroid function test in general practice. *The Veterinary Record* 1984; 28: 79 - 83.

Dudley RF: Chemiluminescence Immunoassay: An Alternative to RIA. *Laboratory Medicine* 1990; 21: 216 - 222.

Eigenmann JE: Pituitary-hypothalamic diseases. In: *Textbook of veterinary internal medicine*, Ettinger SJ, Hrsg. 3. Aufl. Philadelphia, WB Saunders Company 1989; 1579 - 1609.

Feldman EC: Adrenal gland disease. In: *Textbook of veterinary internal medicine*, Ettinger SJ, Hrsg. 3. Aufl. Philadelphia, WB Saunders Company 1989; 1721 - 1774.

Feldman E, Nelson R: The Adrenal Gland. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Feldman EC und Nelson RW. Hrsg. 2. Aufl. Philadelphia: WB Saunders Company 1996; 186 - 323.

Feldman EC, Nelson RW: Beta-Cell neoplasia: Insulinoma. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Feldman EC und Nelson RW. Hrsg. 2. Aufl. Philadelphia: WB Saunders Company 1996; 422 - 441.

Feldman EC, Nelson RW: Feline hyperthyroidism (Thyrotoxicosis). In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Feldman EC und Nelson RW. Hrsg. 2. Aufl. Philadelphia: WB Saunders Company 1996; 118 - 166.

Findling JW, Tyrrell JB: Anterior pituitary gland. In: *Basic and Clinical Endocrinology*, Greenspan FS Hrsg. 3rd ed. Los Altos CA: Lange Medical Publications 1991; 79.

Ford SL. Hyperadrenocorticism caused by bilateral adrenocortical neoplasia in dogs: Four cases (1983-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202: 789.

Franklyn JA: The management of hyperthyroidism. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Feldman EC und Nelson RW. Hrsg. 2. Aufl. Philadelphia: WB Saunders Company 1996; 186 - 323.

Friemel H: Immunelektrophorese. In: Immunologische Arbeitsmethoden. Friemel H, Hrsg. 4. Auflage. Jena: Gustav Fischer Verlag 1991; 98 - 187

Giraudi G, Anfossi L, Rosso I, Baggiani C, Giovannoli C, Tozzi C: A general method to perform a noncompetitive immunoassay for small Molecules. Analytical Chemistry 1999; 71: 4697 - 4700.

Gosselin SJ, et al.: Lymphocytic thyroiditis in dog. In: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Feldman EC und Nelson RW. Hrsg. 3. Aufl. Philadelphia: WB Saunders Company 1996; 71 - 117.

Hoyle NR, Eckert B, Kraiss S: Electrochemiluminescence: Leading-Edge Technology for Automated Immunoassay Analyte Detection. Clinical Chemistry 1996; 42: 1576 - 1578.

John H: Immunoassay (4). mta-repetitorium 1999; 14: 45 - 48.

Johnston SD, Mather EC: Canine Plasma Cortisol (Hydrocortisone) Measured by Radioimmunoassay: Clinical Absence of Diurnal Variation and Result of ACTH Stimulation and Dexamethasone Suppression Test. Am J Vet Res 1978; 39: 1766 - 1771.

Jones BR, et al.: Preliminary studies on congenital hypothyroidism in a family of Abyssinian cats. In: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Feldman EC und Nelson RW. Hrsg. 2. Aufl. Philadelphia: WB Saunders Company 1996; 68 - 117.

Kaufman, J: Diseases of the adrenal cortex of dogs and cats. Modern Veterinary Practice 1984; 65: 513 - 516.

Kemppainen RJ, Mansfield PD, Sartin JL: Endocrine Responses of normal cats to TSH and synthetic ACTH administration. J Am Anim Hosp Assoc 1984; 20: 737 - 740.

Kintzer PP: Consideration in the treatment of feline hyperthyroidism. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1994; 24: 577 - 585.

Klostermeyer H. Chemie und Biochemie des Insulins. Angew Chem 1966; 78:871.

Knight AW: A review of recent trends in analytical applications of electrogenerated chemiluminescence. Trends in analytical chemistry 1999; 18: 47 - 62.

Kraft W: Funktionsstörungen des endokrinen Pankreas. In: Kleintierkrankheiten, Band 1, Innere Medizin. Kraft W, Hirschberger J. 3. Aufl. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer 2000; 807 - 820.

Kraft W: Schilddrüsenkrankheiten. In: Kleintierkrankheiten, Band 1, Innere Medizin. Kraft W, Hirschberger J. 3. Aufl. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer 2000; 781 - 806.

Kraft W, Deinert M, Büchler F, Reese S. Symptome bei der Hyperthyreose der Katze: eine retrospektive Studie. Kleintierpraxis 1999; 44: 719 – 732.

Kricka LJ: Chemiluminescent and Bioluminescent Techniques. Clinical Chemistry 1991; 37: 1472 - 1481.

Kricka LJ: Chemiluminescence Immunoassays. In: Manual of clinical laboratory immunology. Noel RR, de Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM Hrsg. 5. Aufl. Washington DC, American Society for microbiology 1997; 49 - 53.

Kunkel S. Radiometrische Verfahren. In: Immunologische Arbeitsmethoden. Friemel H, Hrsg. 4. Aufl. Jena,Fischer Verlag 1991; 120 – 134.

Lee W-Y: Tris (2,2'-bipyridyl)Ruthenium (II) electrogenerated Chemiluminescence in analytical science. Mikrochimica Acta 1997; 127: 19 – 39.

Lente van F: Methodology and Subspeciality Consolidation in the Clinical Laboratory. Clin Chem 1997; 43: 11 - 12.

Lutz TA, Rand JS: Pathogenesis of feline diabetes mellitus. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract* 1995; 25: 527 - 549.

Medleau L, Cowan LA, Cornelius LM: Adrenal function testing in the cat: the effect of low dose intravenous dexamethasone administration. *Res Vet Sci* 1987; 42: 260 - 261.

McLoughlin MA, DiBartola SP, Birchard SJ, Day DG: Influence of systemic nonthyroidal illness on serum concentration of thyroxine in hyperthyroid cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 1993; 29: 227 - 234.

Mooney CT, Thoday KL, Doxey DL: Carbimazole therapy of feline hyperthyroidism. *J Small Anim Pract* 1992; 33: 228 - 235.

Murase T, et al.: Measurement of serum glucocorticoids by high-performance liquid chromatography and circadian rhythm patterns of the cortisol value in normal dogs. *Jpn J Vet Sci* 1988; 50: 1133.

Nakamura RM, Bylund DJ: Fluorescence Immunoassays. In: *Manual of clinical laboratory immunology*, Noel RR, de Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM Hrsg. 5. Aufl. Washington DC, American Society for microbiology 1997; 39 - 48.

Nelson RW: Disorder of the endocrine pancreas. In: *Textbook of veterinary internal medicine*. Ettinger SJ Hrsg. 3. Aufl. Philadelphia, WB Saunders Company 1989; 1676 - 1720.

Nelson RW, Himsel CA, Feldman EC, Bottoms GD: Glucose tolerance and insulin response in normal-weight and obese cats. *Am J Vet Res* 1990; 51: 1357 - 1362.

Paradis M, Pagé N: Serum free thyroxin concentrations measured by chemiluminescence in hyperthyroid and euthyroid cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 1996; 32: 489 - 494.

Paradis M, Pagé N. Serum free thyroxine concentration, measured by chemiluminescence assay before and after thyrotropin administration in healthy dogs,

hypothyropid dogs and euthyroid dogs with dermatopathies. Can Vet J 1996; 37: 289 - 294.

Patterson W, Werness P, Payne WJ, Matsson P, Leflar C, Melander T, Quast S, Stejskal J, Carlson A, Macera M, Schubert FW: Random and Continuous-Access Immunoassay with Chemiluminescent Detection by Access[®] Automated Analyzer. Clinical Chemistry 1994; 40: 2042 - 2045.

Peterson ME: Diagnosis and management of insulin resistance in dogs and cats with diabetes mellitus. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1995; 25: 691 - 713.

Peterson ME, Ferguson DC: Thyroid Diseases. In: Textbook of veterinary internal medicine. Ettinger SJ Hrsg. 3. Aufl. Philadelphia, WB Saunders Company, 1989; 1633 - 1675.

Peterson ME, Gamble DA: Effects of nonthyroidal illness on serum thyroxin concentrations in cats: 494 cases (1988). J Am Vet Med Assoc 1990; 197: 1203 - 1208.

Peterson ME, Graves TK, Cavanagh I: Serum thyroid hormone concentration fluctuate in cats with hyperthyroidism. J Vet Int Med 1987; 142 - 146.

Peterson ME, Steele P: Pituitary-dependent hyperadrenocorticism in a cat. J Am Vet Med Assoc 1986; 189: 680 – 683.

Porstmann T, Porstmann B: Enzymimmunoassay. In: Immunologische Arbeitsmethoden, Friemel H Hrsg. 4. Aufl. Jena Gustav Fischer Verlag 1991; 135 - 187.

Puille M, Auch D, Spillmann T, Birke L, Bauer R: Bestimmung von TSH und freien Schilddrüsenhormonen in der Hyperthyreosediagnostik der Katze. Tierärztliche Praxis 2000; 28: 289 - 294.

Rand JS, et al.: Spontaneous adult-onset hypothyroidism in cat. In: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 2. Aufl. Philadelphia, WB Saunders Company 1996; 111 - 117.

Reese S, Büchler F, Kraft W. Die sonographische Schilddrüsenuntersuchung bei der Katze. Tierärztl Prax 2001; 29: 184 – 190.

Reese S, Müller M, Kurzke E, Hermanns W, Kraft W. Prävalenz morphologischer Schilddrüsenveränderungen bei der Katze. Tierärztl Prax 2002; 30: 274 – 281.

Reimers TJ, Cowan RG, Davidson HP, Colby ED: Validation of radioimmunoassays for triiodothyronine, thyroxine and hydrocortisone (cortisol) in canine, feline and equine sera. Am J Vet Res 1981; 42: 2016 - 2021.

Roche Diagnostics GmbH: Produktinformation Elecsys Diagnostica. Roche Diagnostics GmbH, 1999.

Roche Produktinformation. Elecsys[®] Cortisol, 1999.

Roche Produktinformation. Elecsys[®] Insulin, 1999.

Roche Produktinformation. Elecsys[®] T3, 1999.

Roche Produktinformation. Elecsys[®] T4, 1999.

Sánchez-Carbayo M, Mauri M, Alfayate R, Miralles C, Soria F: Analytical and clinical evaluation of TSH and Thyroid hormones by electrochemiluminescent immunoassays. Clinical Biochemistry 1999; 32: 395 - 403.

Schaer M. Autoimmunity and Addison's disease in the dog. J Am Animal Hospital Assoc 1986; 22: 789.

Scott DW, Manning TO, Reimers TJ: Iatrogenic Cushing's syndrome in the cat. Feline Practice 1982; 12: 30 - 36.

Singh AK, Jiang Y, White T, Spassova D: Validation of nonradioactive chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats and horses. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9: 261 - 268.

Spaulding SW, Utiger RD. The thyroid: Physiology, hyperthyroidism, hypothyroidism and the painful thyroid. In: Thyroid Diseases. In: Textbook of veterinary internal medicine. Ettinger SJ Hrsg. 3. Aufl. Philadelphia, WB Saunders Company 1989; 1633 - 1675.

Stockham SL, Nachreiner RF, Krehbiel JD: Canine immunoreactive insulin quantitation using five commercial radioimmunoassay kits. *Am J Vet Res* 1983; 44: 2179 - 2183.

Tomsa K, Glaus T, Kacl GM, Pospischil A, Reusch CE: Thyreotropin-Releasing hormone stimulation test to assess thyroid function in severely sick cats. *J Vet Int Med* 2001; 15: 89 - 93.

Voigt K: Endokrinologisches System. In: Lehrbuch der Physiologie. Klinke R Silbernagel S Hrsg. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1996; 435 - 484.

Won-Yong L: Tri (2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Electrogenerated Chemiluminescence in Analytical Science. *Mikrochim Acta* 1997; 127: 19 – 39.

Wood WG, Fricke H: Solid Phase Antigen Luminescent Immunoassay (SPALT) for the determination of insulin, insulin antibodies and gentamicin levels in human serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 1982; 20: 825 - 831.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Wilfried Kraft danke ich für die Überlassung des Themas und die allzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Dank gilt ebenso den Mitarbeiterinnen und den Mitarbeitern der I. Medizinischen Tierklinik für die Beratung und Mithilfe bei der Durchführung der praktischen Tätigkeit.

Herrn Prof. Dr. K. Osterkorn danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michel Bucher, Herrn Thomas Dollriess und meiner Familie für ihre unermüdliche Motivationsarbeit, die liebevolle Unterstützung und ihren Rat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Denise Rudolph
Geburtsdatum: 12. Mai 1970
Geburtsort: Gräfelfing bei München
Eltern: Dipl.-Ing. Peter Rudolph
Ursula Rudolph, geb. Schön
Familienstand: ledig, keine Kinder

Ausbildung

1976 - 1981 Volksschule Gräfelfing
1981 - 1990 Kurt-Huber-Gymnasium Gräfelfing
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
1990 - 1993 Ausbildung zur Tierarzthelferin
Kleintierpraxis Dr. med. vet. Birgit Land
1993 - 1998 Studium der Veterinärmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Februar 1999 Approbation als Tierärztin

Berufstätigkeit

Januar 1999 - Dezember 2000 Doktorandin in der I. Medizinischen Tierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Juni 1999 - Dezember 2000 Wissenschaftliche Hilfskraft an der
Medizinischen Tierklinik München
Januar 2001 – November 2001 Freiberufliche Tätigkeit als Praxisvertretung in
verschiedenen Kleintierpraxen
Seit Dezember 2001 Assistentin in der tierärztlichen Klinik
Dr. Thevis in Reichenberg bei Würzburg