

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Erstellung eines klinikinternen Normbereichs von
Schilddrüsenwerten (TSH, fT3, fT4) anhand eines gesunden
Referenzkollektivs

Mira Ganslmeier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten
Dissertation

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Peter B. Lippa

2. Prof. Dr. Jürgen Ruland

Die Dissertation wurde am 01.08.2016 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für
Medizin am 17.05.2017 angenommen.

Inhalt

A Abkürzungsverzeichnis

B Hauptteil

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Hintergrund der Studie | 1 |
| 1.1.1 | Klinisches Problem fT3 | 2 |
| 1.2 | Grundlagen der Schilddrüsenanatomie und –funktion..... | 2 |
| 1.2.1 | Anatomie..... | 3 |
| 1.2.2 | Regulation der Schilddrüsenfunktion | 3 |
| 1.2.3 | Schilddrüsenhormonsynthese, -stoffwechsel und –wirkung..... | 4 |
| 1.3 | Erkrankungen der Schilddrüse | 6 |
| 1.3.1 | Struma | 6 |
| 1.3.2 | Schilddrüsenknoten | 6 |
| 1.3.3 | Schilddrüsenfunktionsstörungen..... | 7 |
| 1.4 | Schilddrüsendiagnostik..... | 8 |
| 1.4.1 | Anamnese und Körperliche Untersuchung | 8 |
| 1.4.2 | Ultraschalluntersuchung der Schilddrüse..... | 8 |
| 1.4.3 | Schilddrüsenszintigrafie | 9 |
| 1.4.4 | Laboruntersuchungen | 9 |
| 1.5 | Assaysysteme | 11 |
| 1.5.1 | Bestimmung des TSH | 13 |
| 1.5.2 | Bestimmungen von fT3 und fT4..... | 17 |
| 1.6 | Ziel der Studie | 19 |
| 2 | Material und Methoden..... | 20 |
| 2.1 | Allgemeines..... | 20 |
| 2.2 | Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute..... | 20 |
| 2.3 | Richtlinien der National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) | 23 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.4 | Voraussetzungen für ein geeignetes Schilddrüsenreferenzwertkollektiv ... | 24 |
| 2.5 | Ausschlusskriterien..... | 24 |
| 2.6 | Ablauf der Messung..... | 25 |
| 2.7 | Labormethoden | 28 |
| 2.8 | Statistische Auswertung | 29 |
| 2.8.1 | Berechnung der Referenzwerte mittels Reference Value Advisor | 29 |
| 2.8.2 | Weitere Datenanalyse mittels SPSS..... | 30 |
| 2.9 | Indirekte Methode zur Erstellung von Referenzwerten aus retrospektiven Daten | 30 |
| 3 | Ergebnis | 32 |
| 3.1 | Studienteilnehmer..... | 32 |
| 3.1.1 | Referenzpopulation..... | 32 |
| 3.1.2 | Ausgeschlossene Studienteilnehmer | 33 |
| 3.2 | Schilddrüsenvolumen | 34 |
| 3.2.1 | Alle Teilnehmer | 34 |
| 3.2.2 | Ausgeschlossene Teilnehmer | 34 |
| 3.2.3 | Referenzpopulation..... | 34 |
| 3.3 | Gemessene Hormone der Referenzpopulation | 35 |
| 3.4 | Referenzwerte | 36 |
| 3.5 | Werte in männlicher und weiblicher Referenzsubpopulation | 42 |
| 3.6 | Altersabhängigkeit..... | 43 |
| 3.7 | Schilddrüsenautoantikörper..... | 44 |
| 3.8 | Ergebnisse aus indirekter Methode zur Erstellung von Referenzwerten aus retrospektiven Daten..... | 44 |
| 4 | Diskussion | 46 |
| 4.1 | Studienpopulation..... | 46 |
| 4.2 | Schilddrüsenvolumen | 47 |
| 4.3 | Normalverteilung | 48 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4.4 | Referenzwerte | 50 |
| 4.5 | Geschlechtsabhängigkeit | 54 |
| 4.6 | Altersabhängigkeit | 55 |
| 4.7 | Limitationen | 56 |
| 4.8 | Indirekte Methode zur Erstellung von Referenzwerten aus retrospektiven Daten und Ausblick | 57 |
| 4.9 | Fazit..... | 60 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 61 |
| 6 | Tabellenverzeichnis..... | 63 |
| 7 | Abbildungsverzeichnis..... | 64 |
| 8 | Literatur | 65 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| µg | Mikrogramm |
| µIU/L | Mikro international Unit |
| Anti-TG | Thyreoglobulinantikörper |
| Anti-TPO | Thyreoperoxidaseantikörper |
| Anti-TSHR | TSH-Rezeptorantikörper |
| B-Mode | brightness mode |
| CI | Konfidenzintervall |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Insitute |
| ECL | Elektrochemilumineszenz |
| ECLIA | Elektrochemilumineszenzassay |
| et al. | Et alii |
| fT3 | Freies Trijothyronin |
| fT4 | Freies Thyroxin |
| HbA1c | Hämoglobin A1c |
| HUNT | Nord-Trøndelag Health Study |
| IBM | International Business Machines Corporation |
| IFCC | International Federation of Clinical Chemistry |
| IRMA | Immunoradiometrischer Assay |
| L | Liter |
| M. | Morbus |
| mIU/L | Milli International Units pro Liter |
| mL | Milliliter |
| NACB | National Academy of Clinical Biochmistry |

| | |
|--------|---|
| pmol/L | Picomol pro Liter |
| RIA | Radioimmunassay |
| SD | Standardabweichung |
| SPSS | Statistical Package for the Social Sciences |
| T3 | Trijodthyronin |
| T4 | Thyroxin |
| TGB | Thyreoglobulin |
| TPA | Tripropylamin |
| TPO | Thyreoperoxidase |
| TRH | TSH-releasing Hormon |
| TSH | Thyreoida-stimulierendes Hormon |
| TTR | Transthyretin |
| Quant. | Quantile |

1 Einleitung

1.1 Hintergrund der Studie

Die Prävalenz von Schilddrüsenerkrankungen in Deutschland liegt unter Erwachsenen bei etwa einem Drittel (Reiners et al. 2004). In der 2001 bis 2002 bundesweit durchgeführten Papillon Initiative wurden bei einem repräsentativen Kollektiv von über 92 000 Teilnehmern bei 33,1% der Teilnehmer sonografisch Auffälligkeiten der Schilddrüse, wie Struma oder Knoten festgestellt (Reiners et al. 2004).

Angesichts dieser hohen Anzahl an Schilddrüsenpathologien ist es wichtig, mögliche Funktionsstörungen der Schilddrüse sicher diagnostizieren zu können. Die entsprechenden Schilddrüsenreferenzwerte für die Abgrenzung zu einer Funktionsstörung sollten möglichst alle Gesunden als gesund und alle krankhaften Veränderung als krankhaft erkennen, da nachfolgende Über- oder Untertherapien bei einer hohen Prävalenz an Schilddrüsenerkrankungen in Deutschland ein wirtschaftlich relevantes gesundheitspolitisches Problem mit darstellen können. Die erste laborparametrische Unterscheidung von der Euthyreose zur Hypothyreose anhand der Überschreitung der oberen Referenzwertgrenze von Thyreotropin (TSH) stellt dabei ein besonders häufiges und viel diskutiertes Problem dar. Das Augenmerk bei der Diskussion liegt auf der Festlegung des oberen Referenzwertes für TSH in einem Bereich zwischen 2,5 mIU/L und 4 - 5,5 mIU/L (Hamilton et al. 2008).

Bis in die 1990er Jahre zählte Deutschland noch zu einem Jodmangelgebiet (Manz et al. 2002). Durch die Jodierung von Speisesalz und dessen Verwendung im lebensmittelverarbeitenden Handwerk (Hampel et al. 2010) sowie durch den steigenden Jodgehalt in Milchprodukten (Bader et al. 2005) werden inzwischen die WHO-Kriterien einer ausreichenden Jodversorgung in Bayern und anderen Bundesländern erfüllt (Hampel et al. 2010). Auch wenn die Jodversorgung bundesweit als ausreichend angesehen werden kann, bestehen noch immer regionale Unterschiede (Hampel et al. 2010).

Da die Schilddrüsenfunktionsparameter TSH, fT3 und fT4 hauptsächlich von der alimentären Jodversorgung abhängen, die Jodversorgung jedoch wegen den unterschiedlichen geologischen Voraussetzungen regional sehr verschieden ausfällt (Hampel et al. 2010), nahmen wir dies zum Anlass, eine eigene klinikinterne Referenzwertstudie für die Schilddrüsenfunktionsparameter TSH, fT3 und fT4 mit einem geeigneten hiesigen Referenzkollektiv durchzuführen. Damit sollen bessere Voraussetzungen für die adäquate Diagnosestellung von Schilddrüsenfunktionsstörungen des lokalen Patientenguts geschaffen werden.

Zudem nahmen wir die Heterogenität der Studienpopulationen, auf deren Basis die Referenzwertangaben von Roche für das Elecsys Immunoassays Systems (Anonymous 2009) beruhen, als weiteren Anlass die Studie durchzuführen. Die Referenzwertangaben beruhen auf unterschiedlichen Studien mit Studienpopulationen aus küstennahen Gebieten und aus Mitteldeutschland (Anonymous 2009). Jedoch gibt es nach unserem Wissensstand keine aktuelle Studie bezüglich Schilddrüsenreferenzwerten basierend auf einem Studienkollektiv aus Süddeutschland.

1.1.1 Klinisches Problem fT3

Im klinischen Alltag fielen bei stationären Patienten des Klinikums rechts der Isar vermehrt fT3-Werte auf, die sich unterhalb des bisher benutzten Referenzbereiches ($< 3,84$ pmol/mL) befand. Aus diesen empirischen Beobachtungen heraus ist es ein Nebenziel dieser Referenzwertstudie, die untere Grenze des Referenzbereiches von fT3 zu überprüfen und gegebenenfalls zu korrigieren.

1.2 Grundlagen der Schilddrüsenanatomie und –funktion

Die Schilddrüse produziert die Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4) und Trijodthyronin (T3). Reguliert wird die Schilddrüsenfunktion durch einen Regelkreislauf mit negativer Rückkopplung, an dem die Schilddrüsenhormone, das aus der Hypophyse sezernierte Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH) und das TSH-Releasing-Hormon (TRH) aus dem Hypothalamus beteiligt sind. Die Wirkung der Schilddrüsenhormone

umfasst den Energiestoffwechsel, sowie Zelldifferenzierung und den Wärmehaushalt (Fauci et al. 2008).

1.2.1 Anatomie

Die Schilddrüse ist ein schmetterlingsförmiges parenchymatöses Organ, bestehend aus zwei Schilddrüsenlappen, die durch einen Isthmus verbunden sind. Sie liegt im Halsbereich ventral der Trachea zwischen Ringknorpel und dem Jugulum. Dorsal der Schilddrüse liegen jeweils an den Polen der Schilddrüse die Nebenschilddrüsen. Sie produzieren das für den Kalziumhaushalt wichtige Hormon Parathormon. Mikroskopisch bilden die Schilddrüsenzellen Follikel, in deren Lumen sich die Schilddrüsenhormone gebunden an das Speicherprotein Thyreoglobulin befinden. Je nach Bedarf können die Schilddrüsenhormone das Follikellumen durch die Follikelzellen hindurch in den systemischen Blutkreislauf transportiert werden. Neben den T3- und T4-produzierenden Follikelzellen, enthält das Schilddrüsengewebe noch die medullären C-Zellen. Diese produzieren Calcitonin, was ebenfalls wie Parathormon, ein wichtiges Hormon zur Regulierung des Kalziumhaushaltes darstellt (Fauci et al. 2008).

1.2.2 Regulation der Schilddrüsenfunktion

Die Schilddrüsenfunktion wird durch einen fein abstimmteten Regelkreislauf, an dem die Schilddrüsenhormone, sowie TSH und TRH beteiligt sind, gesteuert. Das aus dem Hypothalamus sezernierte TSH-releasing-Hormon stimuliert die Produktion von TSH im Hypophysenvorderlappen. TSH stimuliert wiederum die Produktion von Thyroxin und Trijodthyronin in der Schilddrüse. In den peripheren Wirkorganen wird Thyroxin durch Dejodasen in das stärker wirksame Trijodthyronin umgewandelt. Die peripheren Schilddrüsenhormone wirken durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus hemmend auf die Produktion von TSH und TRH. So wird die Produktion der Schilddrüsenhormone stets im Gleichgewicht gehalten (Fauci et al. 2008).

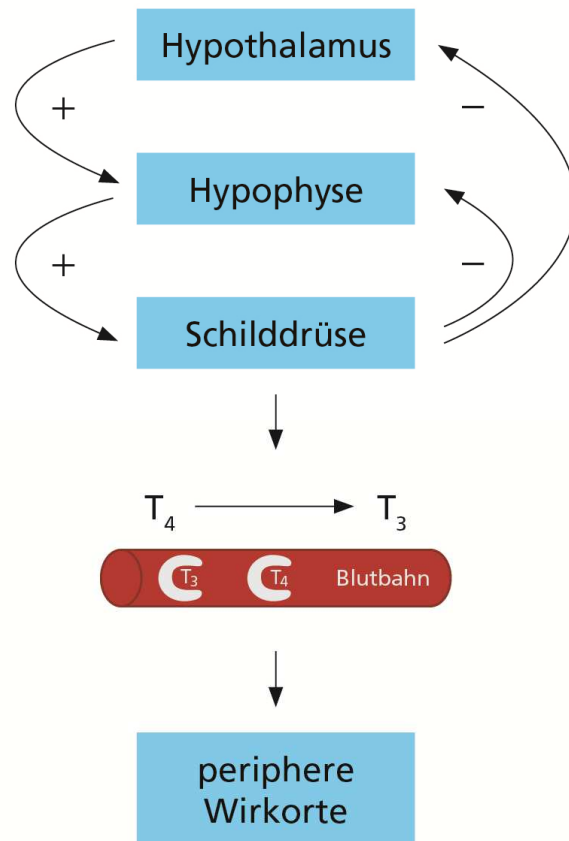


Abbildung 1 Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese

1.2.3 Schilddrüsenhormonsynthese, -stoffwechsel und -wirkung

Nach Jodidaufnahme mittels Natrium-Jodid-Symporter in die Schilddrüsenfollikelzelle werden unter oxidativer Beteiligung von Thyreoperoxidase (TPO) an der lumenwärts gerichteten Seite der Follikelzellen Jodatome in Tyrosinreste des Thyreoglobulins eingebaut. Diese jodierten Tyrosinreste des Thyreoglobulins werden über Etherbrücken miteinander verbunden. Je nach Anzahl der Jodreste entsteht Thyroxin oder Trijodthyronin. Über die Bindung von TSH an den TSH-Rezeptor wird die Schilddrüsenfunktion stimuliert (Fauci et al. 2008).

Im Blut zirkulierendes T₃ und T₄ liegt an Serumtransportproteine gebunden oder in freier Form als freies Trijodthyronin (fT₃) und freies Thyroxin (fT₄) vor. Bindungsproteine sind Thyroxin-bindendes-Globulin (TGB), Transthyretin (TTR, früher Thyroxin-bindendes Präalbumin) und Albumin. Die freien Schilddrüsenhormone bilden den wirksamen Anteil der Schilddrüsenhormone. Thyroxin liegt zu 0,02% und Trijodthyronin liegt zu 0,2% in freier Form vor (Baloch et al. 2003).

Ihre Wirkung entfalten die Schilddrüsenhormone hauptsächlich über die nukleären Schilddrüsenhormonrezeptoren im Zellinneren und beeinflussen über spezifische Genexpression die Zelldifferenzierung und den Zellstoffwechsel (Fauci et al. 2008).

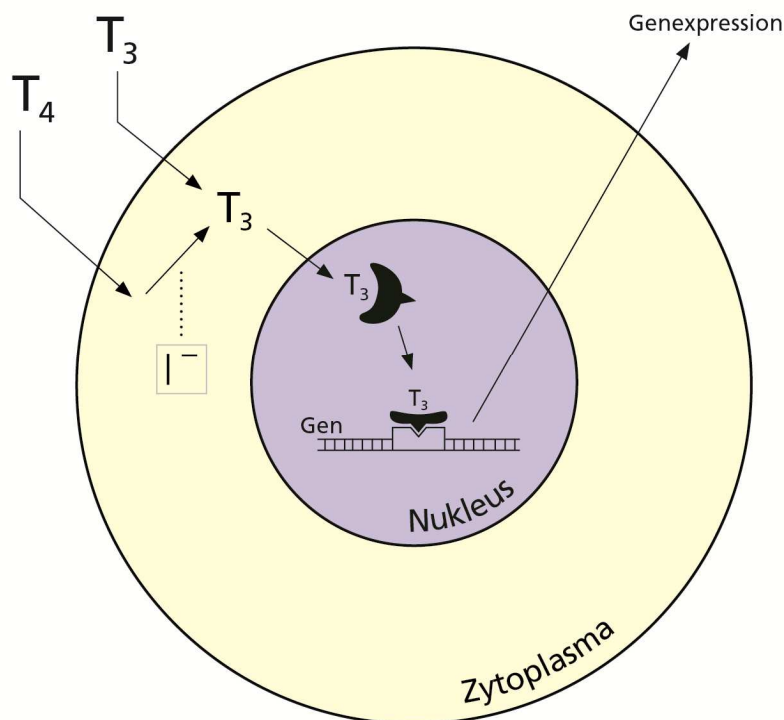


Abbildung 2 Mechanismus der Schilddrüsenhormonwirkung über Schilddrüsenhormonrezeptoren im Zellinneren

1.3 Erkrankungen der Schilddrüse

1.3.1 Struma

Die Struma, oder auch Kropf im Volksmund, beschreibt eine Vergrößerung des Schilddrüsenvolumens. Hierbei kann man die Struma nach Binnenstruktur in eine blande Struma oder eine Struma multinodosa, also eine mit knotigem Gewebe durchsetzte Struma, unterteilen. Ursächlich ist meist ein Jodmangel sowie die Aufnahme von strumigenen Substanzen durch die Nahrung, wie zum Beispiel im Kohl enthaltene zyanogene Glykoside oder in einigen Rapsarten enthaltene Thioglykoside (Klein et al. 1980). Pathophysiologisch wird eine wachstumsstimulierende Wirkung auf das Schilddrüsengewebe durch TSH angenommen. Durch den Mangel an Jod, dem wichtigsten Substrat für die Produktion von Schilddrüsenhormonen, kommt es zu einer ineffizienten Hormonproduktion. Dadurch wird mehr TSH aus der Hypophyse ausgeschüttet, beziehungsweise es kommt zu einer gesteigerten Sensibilität des Schilddrüsengewebes für TSH und somit zur Schilddrüsenvergrößerung. Therapeutisch kann durch eine Jodidsubstitution eine Volumenreduktion um bis zu 30 Prozent erreicht werden. Bei knotig durchsetzter Struma oder bei länger bestehenden Schilddrüsenvergrößerungen älterer Patienten ist die Erfolgsrate geringer (Fauci et al. 2008).

1.3.2 Schilddrüsenknoten

Knotige Veränderungen der Schilddrüse können in der erwachsenen deutschen Bevölkerung sehr häufig festgestellt werden. Bei etwa einem Viertel (23,4%) sind Knoten sonografisch feststellbar (Reiners et al. 2004). Es wird von einer multifaktoriellen Genese der Knoten ausgegangen, wobei Jodmangel, Alter und strumigene Substanzen in der Nahrung eine Rolle spielen (Fauci et al. 2008). Schilddrüsenknoten können als Zufallsbefund bei einer Ultraschalluntersuchung auffallen, als autonome Adenome eine Hyperthyreose auslösen oder durch lokale Verdrängungserscheinungen auffällig werden. Zudem sollte stets die Dignität des Knotens evaluiert werden. Patientenanamnese, körperliche Untersuchung sowie Ultraschall und Szintigramm können Hinweise geben. Eine definitive Aussage kann

letztlich lediglich eine histologische Aufarbeitung des Knotens bieten (Fauci et al. 2008).

1.3.3 Schilddrüsenfunktionsstörungen

1.3.3.1 Hypothyreose

Hypothyreose beschreibt den Umstand einer Unterfunktion der Schilddrüse. Weltweit ist Jodmangel die häufigste Ursache einer Hypothyreose. In Gebieten ausreichender Versorgung mit Jod stellen Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, wie Hashimoto-Thyreoiditis, und medizinische Behandlungen einer Hyperthyreose, den größeren Anteil. Zu den Symptomen einer Hypothyreose gehören Apathie, Abgeschlagenheit, depressive Verstimmung, Gewichtszunahme, Verstopfung, und Bradykardie (Fauci et al. 2008).

1.3.3.2 Hyperthyreose

Als Hyperthyreose werden Zustände einer Schilddrüsenüberfunktion bezeichnet. Klinische Zeichen einer Hyperthyreose sind unter anderem Unruhe, Hyperaktivität, Reizbarkeit, Hitzeintoleranz, Gewichtsabnahme, Diarrhö und Palpitationen. Am häufigsten tritt eine Hyperthyreose als Folge eines Morbus Basedow, einer Knotenstruma oder eines autonomen Adenoms auf (Fauci et al. 2008).

1.3.3.3 Euthyroid-sick-Syndrom

Das Euthyroid-sick-Syndrom kann bei Patienten mit schwerer akuter Allgemeinerkrankung auftreten. Es gibt verschiedene Ausprägungen. Die typischste Hormonkonstellation ist der Abfall des Gesamt-T3 sowie des freien T3 bei normalen T4-, fT4- und TSH-Werten. Die Schwere der Allgemeinerkrankung korreliert dabei mit der Ausprägung des T3- und fT3-Abfalls. Pathophysiologisch wird ein Zusammenhang des Schilddrüsenhormonabfalls mit der Ausschüttung von Zytokinen, wie IL-6, angenommen. Die Diagnostik des Euthyroid-sick-Syndroms besteht aus Berücksichtigung möglicher Schilddrüsenvorerkrankung, Einschätzung der Schwere der akuten Allgemeinerkrankung, sowie Messungen der Schilddrüsenhormone und deren zeitlicher Verlauf. Eine Reversibilität der Veränderungen der Schilddrüsenwerte nach Abklingen der

Allgemeinerkrankung bestätigt letztendlich die Diagnose des Euthyroid-sick-Syndroms (Fauci et al. 2008).

1.4 Schilddrüsendiagnostik

1.4.1 Anamnese und Körperliche Untersuchung

Bei der Anamnese des Patienten hinsichtlich Schilddrüsenleiden sind Fragen, die auf Symptome einer Schilddrüsenüber- oder -unterfunktion zielen, sinnvoll. Dazu gehören Fragen nach dem Allgemeinbefinden, nach Reizzuständen oder Antriebsverlust, Hitze- oder Kälteintoleranz, Gewichtsveränderungen, Durchfall, Verstopfung und Palpitationen sowie Schwitzen. Bei der körperlichen Untersuchung sollte auf lokale Befunde der Schilddrüse sowie auf körperliche und geistige Veränderungen durch systemische Wirkung der Schilddrüsenhormone geachtet werden. Lokale Befunde umfassen sicht- oder tastbare Vergrößerung der Schilddrüse und knotige Veränderungen. Weiterhin geben Allgemeinaspekt des Patienten, wie Nervosität oder Apathie, Body-Maß-Index, Puls, Hauttemperatur und –farbe Hinweise auf eine Funktionsstörung der Schilddrüse. Zeichen eines malignen Geschehens, wie zum Beispiel Tumorkachexie, sollten ebenfalls bedacht werden.

1.4.2 Ultraschalluntersuchung der Schilddrüse

Bildgebende Verfahren haben ebenso wie labormedizinische Untersuchungen einen festen Platz in der apparativen Schilddrüsen-diagnostik. Hierbei spielt die Ultraschalldiagnostik eine herausragende Rolle, da die Schilddrüse oberflächennah im Hals situiert ist und daher meist mit ohne Probleme mit dem Ultraschallgerät zu beurteilen ist. Die Schilddrüsen-sonografie beinhaltet die Volumenmessung der Schilddrüse für den möglichen Nachweis einer Struma. Bei der Beurteilung der Binnenstruktur wird auf veränderte Echogenität und knotige Veränderungen geachtet. Diese knotigen Veränderungen des Parenchyms können ebenfalls anhand ihres Vaskularisierungsmusters, ihrer Echogenität, Größe sowie ihrer Größenentwicklung im zeitlichen Verlauf beurteilt werden.

Hierbei geht es um eine erste Evaluation der Dignität der Knoten (Fauci et al. 2008).

1.4.3 Schilddrüsenszintigrafie

Die Schilddrüsenszintigrafie ist eine nuklearmedizinische Untersuchungsmethode. Mit Hilfe von Radionukliden (meist ^{99m}Tc), welche spezifisch von der Schilddrüse aufgenommen werden, kann man den Stoffwechsel der Schilddrüse messen und mittels eines Szintigramms darstellen. Somit kann die Stoffwechselaktivität der Schilddrüse und die Lokalisation der im Stoffwechsel veränderten Bereiche festgestellt werden. Diese Methode eignet sich daher zur Darstellung der Stoffwechselaktivität von Schilddrüsenknoten, also der Unterscheidung sogenannter heißer oder kalter Knoten. Die Unterscheidung zwischen autonomen Schilddrüsenadenom und Morbus Basedow bei Hyperthyreose kann ebenfalls mit Hilfe der Schilddrüsenszintigrafie gelingen (Fauci et al. 2008).

1.4.4 Laboruntersuchungen

Neben der Anamnese und klinischen Untersuchung des Patienten spielen auch labormedizinische Untersuchungen eine wichtige Rolle bei der Schilddrüsendiagnostik. Der sensitivste Parameter zur frühzeitigen Detektion einer Schilddrüsen-über- oder -unterfunktion ist das TSH (Meng und Schmidt 1992). Ein erniedrigter Wert weist auf eine Schilddrüsenüberfunktion hin, dementsprechend weisen erhöhte TSH-Werte auf eine Schilddrüsenunterfunktion hin. Eine manifeste Funktionsstörung der Schilddrüsenfunktion kann anschließend im Rahmen einer Stufendiagnostik anhand der Messung der freien Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 ermittelt werden. Möglicherweise zugrunde liegende Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, wie zum Beispiel Morbus Basedow oder Hashimoto Autoimmunthyreoiditis, können mit Hilfe der Schilddrüsenautoantikörper gegen den TSH-Rezeptor (Anti-TSHR), gegen Thyreoperoxidase (Anti-TPO) oder Thyreoglobulin (Anti-Tg) detektiert werden (Fauci et al. 2008).

1.4.4.1 Thyreotropin (TSH)

Das hypophysäre Hormon Thyreotropin (TSH) ist ein Peptidhormon und stimuliert die Jodaufnahme und Hormonproduktion im Schilddrüsen-

parenchym. Es ist der sensitivste Parameter um subklinische bzw. leichte Veränderungen der Schilddrüsenfunktion nachzuweisen (Kuwert et al. 2008).

1.4.4.2 Freies Thyroxin (fT4)

Thyroxin ist eine nicht proteinogene Aminosäure und wird im Schilddrüsenparenchym produziert. Es wird neben Trijodthyronin als peripheres Schilddrüsenhormon bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel des Körpers. Im klinischen Alltag wird vorwiegend die freie, also nicht an Albumin gebundene Form, des Thyroxins (fT4) im Blut gemessen. Die Messung des freien Thyroxins im Blutserum spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung zwischen Hypo-, Eu- und Hyperthyreose (Meng und Schmidt 1992).

1.4.4.3 Freies Trijodthyronin (fT3)

Trijodthyronin (T3) ist ebenfalls eine nicht proteinogene Aminosäure und entsteht extrathyreoidal aus Thyroxin durch Monodejodierung. Der überwiegende Anteil von T3 im Blut ist an Transportproteine gebunden (TGB, Präalbumin, Albumin). Die physiologisch aktive Form ist das freie Trijodthyronin (fT3). Es hat eine 3-8 fach höhere biologische Aktivität als das freie Thyroxin (fT4). In der Schilddrüsendiagnostik wird fT3 im Serum gemessen und hilft bei der Differenzierung zwischen Hypo-, Eu- und Hyperthyreose (Meng und Schmidt 1992).

1.4.4.4 Anti-TPO

Anti-TPO ist ein Autoantikörper gegen die Thyreoperoxidase und ist vor allem bei der Autoimmunthyreoiditis Hashimoto erhöht und kann auch bei einer Autoimmunhyperthyreose (M. Basedow) erhöht sein (Meng und Schmidt 1992).

1.4.4.5 Anti-Tg

Anti-Tg ist ein Autoantikörper gegen Thyreoglobulin. Anti-Tg ist in ca. 40-60% bei einer Autoimmunthyreoiditis und in ca. 15-30% bei einer Autoimmunhyperthyreose erhöht (Meng und Schmidt 1992). Die Bestimmung von Anti-Tg dient zur Verlaufskontrolle der Hashimoto-Thyreoiditis und kann für die Differenzialdiagnose bei unklaren

Autoimmungeschehen der Schilddrüse, z.B. vermutete Autoimmunthyreoiditis ohne erhöhte Anti-TPO-Antikörper hilfreich sein (Kuwert et al. 2008).

1.4.4.6 Anti-TSHR

Anti-TSHR ist ein Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor der Schilddrüse. Die Bestimmung von Anti-TSHR spielt eine wichtige Rolle bei der Diagnosestellung und Verlaufskontrolle der Autoimmunhyperthyreose Morbus Basedow (Meng und Schmidt 1992).

1.5 Assaysysteme

Mit den neuen Dritt- und Viertgenerationsassays können inzwischen wesentlich präzisere TSH-Messungen als früher durchgeführt werden. Dies gilt vor allem für die Präzision im unteren Messbereich, wo sich die Sensitivität der Messsysteme mit jeder weiteren Generation verbessert hat. Immunoassays der ersten Generation hatten lediglich eine Sensitivität von circa 1mIU/L (Kuwert et al. 2008), womit praktisch nur eine Hypothyreose sicher festgestellt werden konnte. TSH-Erniedrigungen unter diesen Wert bei Hyperthyreosen konnten nicht gemessen werden. Die nächste Generation der Immunoassays verfügte über eine Sensitivität von circa 0,1 mIU/L (Kuwert et al. 2008), womit überhaupt erst TSH-Erniedrigungen gemessen werden konnten. Jedoch konnte das Ausmaß der Hyperthyreose nicht ausreichend festgestellt werden. Mit Immunoassays der dritten und vierten Generation mit einer Sensitivität von 0,01 mIU/L bzw. 0,001 mIU/L (Kuwert et al. 2008) können Hyperthyreosen und ihr Ausmaß zuverlässig diagnostiziert werden. In der Diagnostik haben die Assays der dritten Generation die größte Bedeutung (Spencer et al. 1996).

Auch bei der Messung der freien Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 spielen Immunoassays die größte Rolle, obwohl die Gleichgewichtsdialyse oder das Ultrazentrifugationsverfahren Referenzmethode darstellen (Kuwert et al. 2008)

Grundsätzlich verfolgen die hier zur Sprache gekommenen Immunoassays folgende Prinzipien: das nachzuweisende Analyt bildet als Antigen einen Komplex mit dem passenden spezifischen Antikörper, einen Antigen-Antikörper-Komplex (Kuwert et al. 2008).

Zur Quantifizierung dieser Reaktion werden entweder Antigen oder Antikörper markiert. Dies kann mit radioaktiven, enzymatischen, fluoreszierenden oder lumineszierenden Markierungen (Labels) geschehen. Entsprechend können mit dem entsprechenden Antigen auch Antikörper den gesuchten Analyt darstellen (Kuwert et al. 2008).

Die erste Generation der Immunoassays, die Radioimmunassays (RIA), enthalten radioaktiv markierte Analyte, welche dem gesuchten Analyt möglichst ähnlich sind. Diesen markierten Antigenen, in definierter Menge, wird eine definierte Menge spezifischer Antikörper im Überschuss zugesetzt. Anschließend wird das Serum mit dem gesuchten Analyt zugegeben. Da sowohl markiertes wie auch nicht-markiertes Antigen gleichsam an den Antikörper binden, verhält sich die Konzentration des zu messenden unmarkierten Analyts invers zur gemessenen Antikörperbindung des markierten Antigens. Nach Trennung des freien und antikörpergebundenen markierten Antigens, wird der Anteil des gebundenen markierten Antigens bestimmt. Die Signalstärke wird auf eine Standardkurve aus bekannten Konzentrationen des unmarkierten Antigens aufgetragen. Dadurch kann mit dem kompetitiven Assayformat die Analytkonzentration quantifiziert werden. Je kleiner das gemessene Signal von markiertem Antigen gebunden an den Antikörper ist, desto höher ist die Konzentration des unmarkierten Antigens (Kuwert et al. 2008).

Bei immunometrischen Assays wird anstatt eines künstlichen markierten Analyts ein zweiter markierter Antikörper verwendet. Diese beiden Antikörper binden spezifisch an verschiedenen Epitope des gesuchten Analyts, als Sandwichassay. Dies gelingt jedoch nur bei größeren Proteinanalyten wie TSH. Dagegen können die kleine Analyte T3 und T4 nur mit kompetitiven Assays bestimmt werden.

1.5.1 Bestimmung des TSH

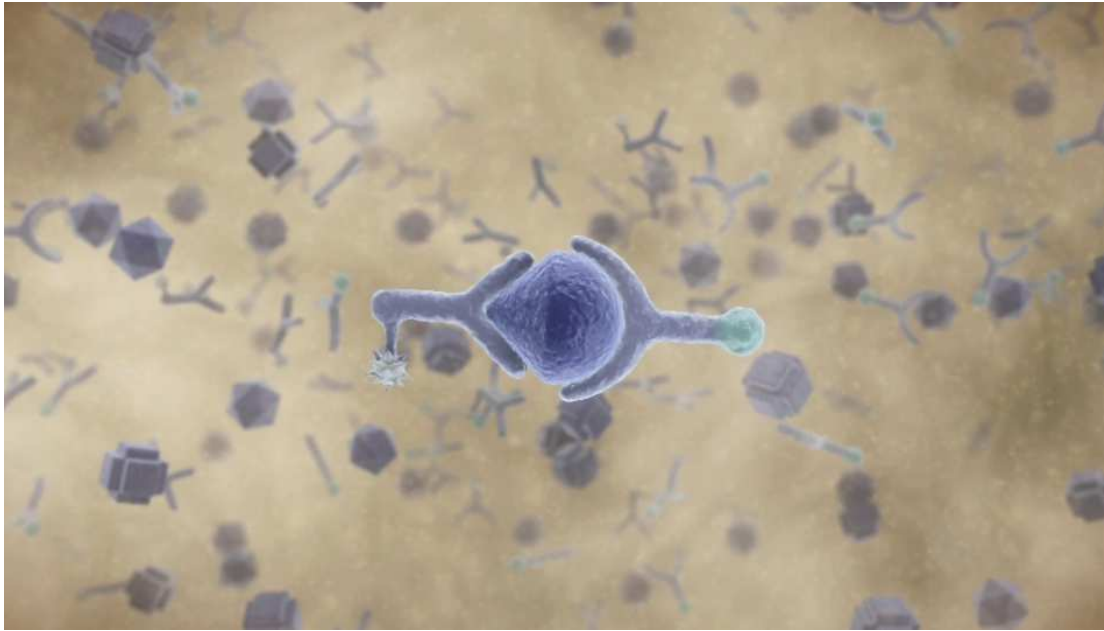


Abbildung 3 Sandwichassay: Antikörper-Antigenkomplex mit zwei markierten Antikörpern (Roche Diagnostics)

Bei der Messung von TSH mittels immunometrischem Assay werden zwei Antikörper gegen TSH im Überschuss zugegeben. Der markierte Antikörper befindet sich meist auf einer Festphase. Die gemessene Signalstärke des Antigen-Antikörper-Komplex ist dann proportional zur Analytkonzentration. Die Quantifizierung erfolgt ebenfalls über das Auftragen auf eine Standardkurve mit bekannten Analytserumkonzentrationen. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit zur Messung von sehr niedrigen Konzentrationen (Kuwert et al. 2008). Neben immunometrischen Assays mit radioaktiv markierten Antikörpern, sogenannten immunradiometrischen Assays (IRMA), gibt es bei Assays der dritten und vierten Generation die Möglichkeit der Signaldetektion durch Elektrochemilumineszenz. Für die klinische Routine werden immunometrische Assays empfohlen (Kuwert et al. 2008), z.B. mit Chemilumineszenzmarkierung wie bei Roche Elecsys Systems verwendet. Dieses System bietet neben der guten Sensitivität auch einen geringen

Interassayvariationskoeffizienten, eine kurze Messdauer, sowie eine große Messbreite (Roche Diagnostics).

Elektrochemilumineszenz ist eine elektrochemisch generierte, stark exogene Reaktion, welche seine Reaktionspartner in einen angeregten Zustand überführt und somit Licht emittieren kann. Bei den hier angewendeten Assays wird ein Ruthenium-II-Komplex in Anwesenheit von Tripropylamin (TPA) oxidiert, woraufhin es zur Lichtemission kommt (Forster et al. 2009).

Bei immunometrischen Assays, wie dem TSH-Assay, mit Elektrochemilumineszenzdetektion wird das gesuchte Antigen an einen Ruthenium-markierten Antikörper und an einen Biotin-markierten Antikörper gebunden. Beide Antikörper binden auch hier spezifisch an verschiedene Epitope des gesuchten Antigens und es kommt zu einem Sandwichkomplex, wie in Abbildung zwei dargestellt. Nach Zugabe von Streptavidinmikrokügelchen kommt es zur Verbindung dieser Mikrokügelchen mit Biotin. Mit dieser Verbindung ist der Immunoassaykomplex vollständig (Roche Diagnostics).

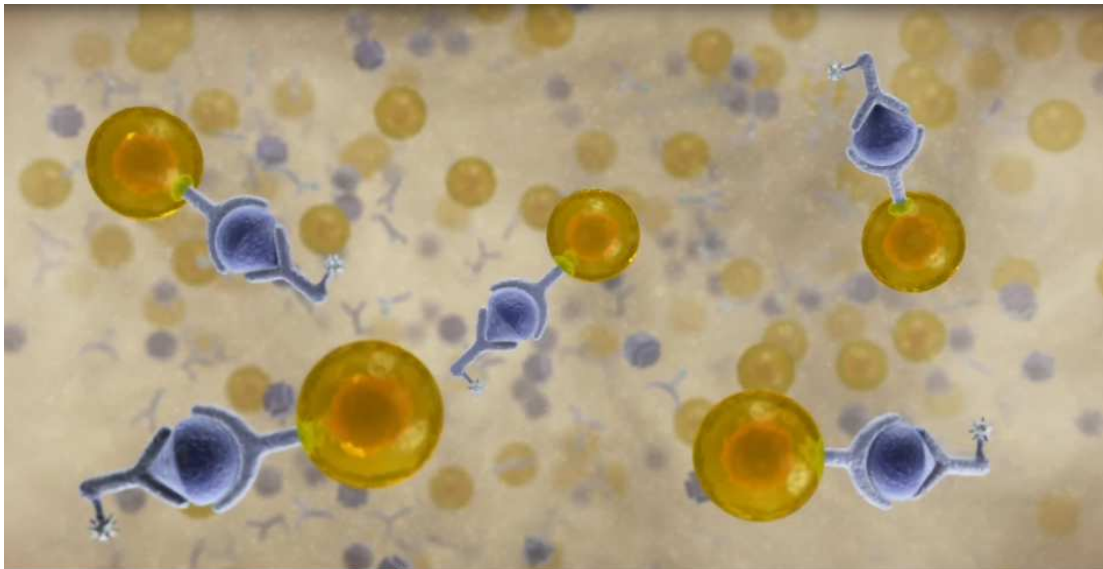


Abbildung 3 Antikörper-Antigen-Komplex nach Zugabe von Streptavidin (Roche Diagnostics)

Die Komplexe werden in eine Messzelle aspiriert und die paramagnetischen Biotinmikrokügelchen werden mit Hilfe magnetischer Kraft an die Oberfläche der Messzelle gebunden. Anschließend werden die ungebundenen Analyte durch eine zugegebene Lösung von den Gebundenen getrennt. Diese Lösung enthält zudem Tripropylamin (Roche Diagnostics).

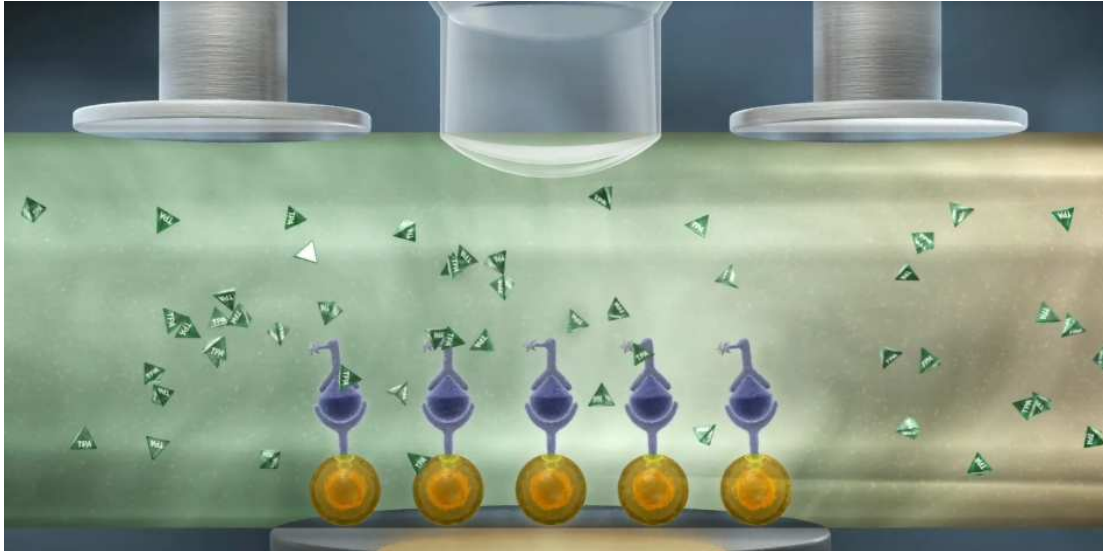


Abbildung 4 Antigen-Antikörper-Komplex nach Bindung auf Festphase und nach Zugabe von TPA (Roche Diagnostics)

In Anwesenheit von TPA kann es am Ruthenium-II-Komplex nach Anlegen einer Spannung zur elektrisch generierten Chemilumineszenzreaktion kommen (Roche Diagnostics).



Abbildung 5 Antigen-Antikörper-Komplex, nicht festphasengebundener Antikörper ist mit einem Rutheniumkomplex markiert (Roche Diagnostics)

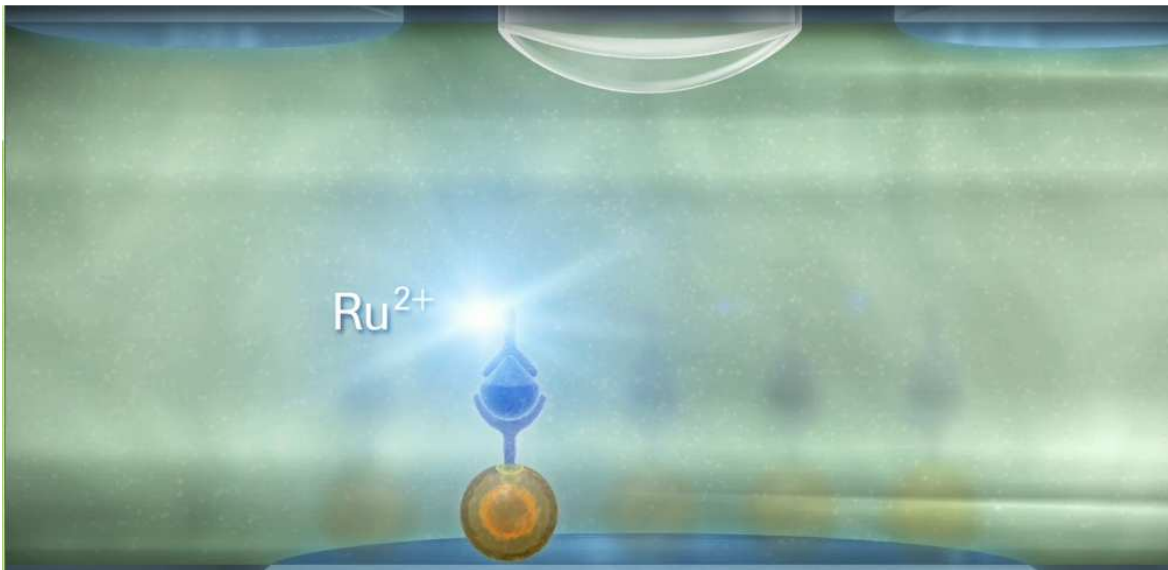


Abbildung 6 Elektrochemilumineszenzreaktion durch einen Rutheniumkomplex (Roche Diagnostics)

Die Lichtemission wird durch einen Photomultiplier detektiert. Das detektierte Signal ist äquivalent zur Analytkonzentration. (Roche Diagnostics)

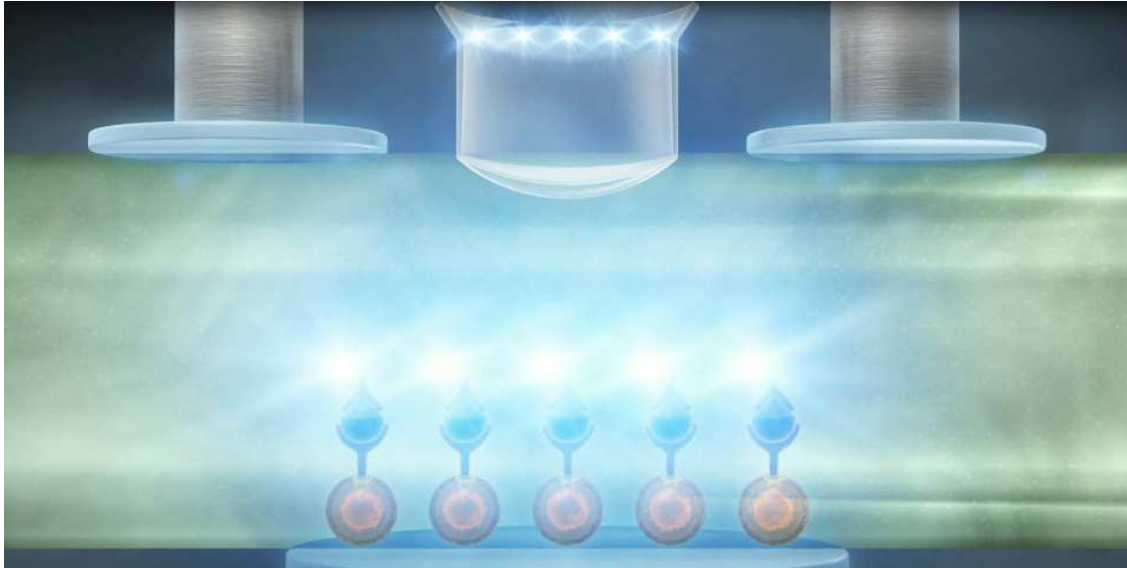


Abbildung 7 Detektion der Elektrochemilumineszenzreaktion durch einen Photomultiplier (Roche Diagnostics)

1.5.2 Bestimmungen von fT3 und fT4

Die Bestimmung der freien Schilddrüsenhormone findet auf indirekte Weise statt und stellt genau genommen einen Schätzwert der Serumkonzentration dar. Die Werte werden mit einem Zweistufenassay bestimmt. Hierbei wird eine geringe Menge mit einem Rutheniumkomplex markierter anti-T3-Antikörper (beziehungsweise anti-T4 Antikörper) der Serumprobe zugesetzt, meist etwa ein bis zwei Prozent des üblichen totalen T3 oder T4-Gehalts. So soll verhindert werden, dass das Gleichgewicht zwischen ungebundenem und gebundenem T3 beziehungsweise T4 unbeeinflusst bleibt.

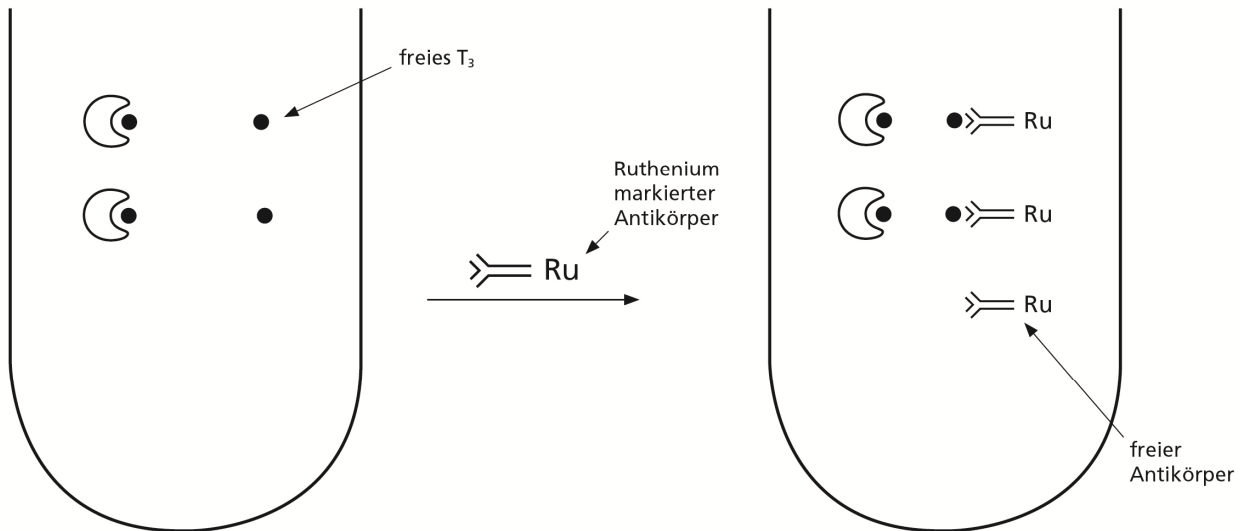


Abbildung 8 Zugabe von Ruthenium markierten Antikörpern zu Patientenserum für die Messung von freiem T₃

Anschließend werden biotinylierte T₃ bzw. T₄ Partikel und mit Streptavidin beschichtete Mikropartikel hinzugegeben. Diese hinzugegebenen Partikel bilden einen Haptenkomplex und binden an die frei gebliebenen Bindungsstellen der markierten Antikörper.

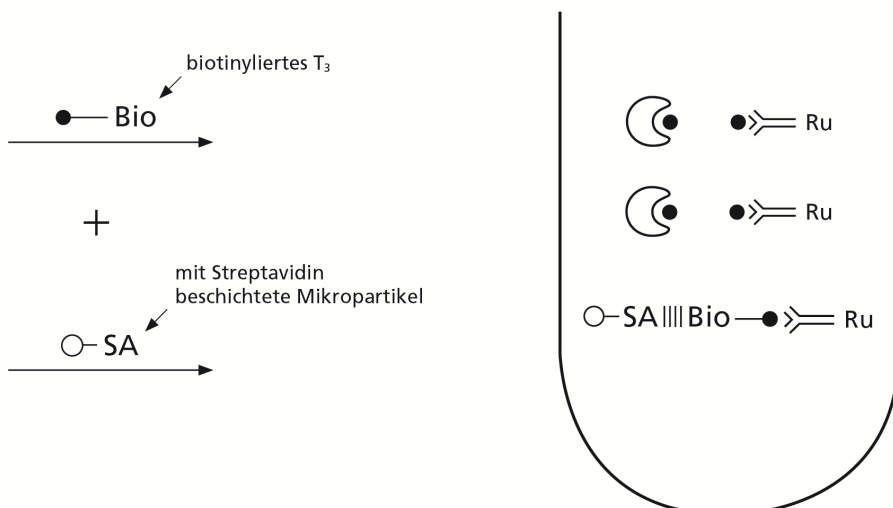


Abbildung 9 Zugabe von markiertem T₃ und beschichteten Mikropartikeln mit anschließender Bildung eines Komplexes aus Antikörper, markiertem T₃ und Mikropartikel

Dieser Komplex bindet nun über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen an eine Festphase. Nach Übertritt des Gemisches in die Messzelle, werden diese Komplexe über magnetische Wirkung an die Oberfläche einer Elektrode fixiert und die ungebundenen Substanzen entfernt. Nun wird die Elektrochemilumineszenzreaktion durch Anlegen einer Spannung induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Mithilfe einer Kalibrationskurve werden die Ergebnisse bestimmt (Roche Diagnostics).

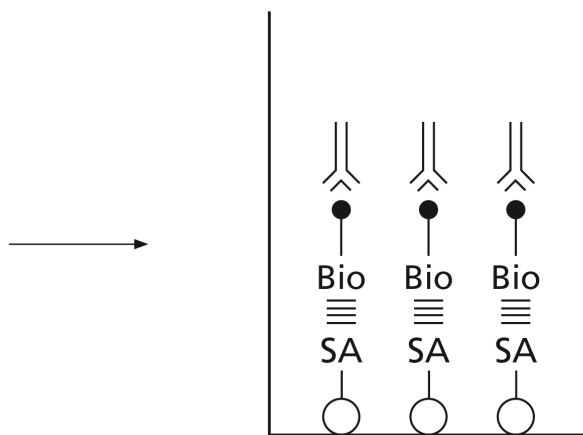


Abbildung 10 Bindung des Gesamtkomplexes an eine Festphase

1.6 Ziel der Studie

Ziel der Studie ist die Etablierung eines klinikinternen Normbereichs von Schilddrüsenwerten mit Teilnehmern aus dem Großraum München. Auswahl dieser Teilnehmer sollte durch Kriterien nach dem Vorbild der NACB-Kriterien stattfinden um ein valides Ergebnis zu erzielen.

Nebenziel dieser Referenzwertstudie ist es, die untere Grenze des Referenzbereiches von fT3 zu überprüfen und gegebenenfalls zu korrigieren.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Das Studiendesign dieser epidemiologischen Untersuchung entspricht dem einer Querschnittsstudie mit dem alleinigen Ziel, lokale Schilddrüsenreferenzwerte zu erhalten. Durchgeführt wurde diese Studie in Süddeutschland im Großraum München, einem ehemaligen Jodmangelgebiet (Hampel et al. 2010). Die Studie erfolgte gemäß den Prinzipien der Deklaration von Helsinki (World Medical Association General 2004): Dies wurde vor Beginn der Messungen durch ein Ethikkomitee der Technischen Universität München nach Antrag bestätigt. Alle Studienteilnehmer erklärten sich nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung schriftlich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden.

Es wurden 292 freiwillige Teilnehmer rekrutiert. Davon konnten 204 Teilnehmer in die Referenzpopulation eingeschlossen werden. Der Rekrutierungszeitraum erstreckte sich von Juni 2011 bis September 2012.

Basierend auf den Empfehlungen des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) wurde die Mindestanzahl an Referenzwertdaten zur Etablierung von Referenzwerten mittel nichtparametrischer Herangehensweise mit 204 eingeschlossenen Datensätzen übertroffen (Horowitz et al. 2008). Die empfohlene Mindestanzahl beträgt 120 (Horowitz et al. 2008).

2.2 Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute

Die Grundsatzschrift "Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Third Edition" (Horowitz et al. 2008) des Clinical and Laboratory Standards Institute, erschienen 2008 in der dritten Auflage, gibt wesentliche Prinzipien zur Erstellung und Überprüfung von Referenzwerten im Bereich von diagnostischen Labortests vor. Diese im Konsens erstellten Richtlinien stellen sicher, dass die Mindestanforderungen für die Zuverlässigkeit und Verwendbarkeit der erstellten Referenzwerte gegeben sind.

Im Folgenden werden die wesentlichen Grundsätze sinngemäß wiedergegeben:

- (1) Die Auswahl des Referenzkollektivs sollte überlegt sein und die Ein- und Ausschlusskriterien müssen schon vorab geklärt sein. Der Gesundheitszustand der Referenzindividuen muss dokumentiert werden und als Teil der Referenzwertstudie beschrieben werden. Die Güte der Beschreibung des Gesundheitszustandes bestimmt auch die Güte der Referenzwertstudie.
 - (a) Ein Goldstandard mit vollkommen gesunden jungen Erwachsenen als Referenzpopulation wird von der Arbeitsgruppe des CLSI abgelehnt.
 - (b) Im Allgemeinen sollten auch keine Klinikpatienten als Referenzindividuen dienen, außer es gibt keine Möglichkeit Nicht-Patienten zu rekrutieren. Wenn die der Fall ist, sollte besonderes Augenmerk auf die Auswahl der Teilnehmer gelegt werden, sowie auf die Ein- und Ausschlusskriterien.
- (2) Alle analytischen und präanalytischen Prozesse, die im Zusammenhang mit der Messung der Referenzwerte stehen, sollten genau durchdacht und, wenn nötig, kontrolliert werden. Es ist wichtig, dass diese Prozesse ebenso gehandhabt werden, wie bei einer Messung eines Patienten.
- (3) Sobald alle Daten erhoben sind, sollte ein Histogramm bezüglich der Verteilung der Werte erstellt und visuell begutachtet werden, um die anschließende Auswertung zu erleichtern. Es wird empfohlen, Tests zur Erfassung von Ausreißern durchzuführen und mit Hilfe dieser Tests über die Beibehaltung dieser Ausreißer zu entscheiden.
- (4) Die nichtparametrische Methode zur Berechnung des Referenzintervalls wird wegen ihrer Einfachheit und Zuverlässigkeit nachdrücklich empfohlen. Darüber hinaus setzt diese Methode keine Vermutung über Verteilung der Referenzwerte voraus.

Für die Verwendung der nichtparametrischen Methode wird eine Mindestanzahl von 120 Referenzwertproben empfohlen; für einzelne Subklassen sollten auch mindestens 120 Proben zur Verfügung stehen. Diese Mindestanzahl von Proben erlaubt die Erstellung eines 90%-Konfidenzintervalls (CI) für die oberen und unteren Grenzen des Referenzintervalls. Höhere Konfidenzintervalle können mit einer größeren Anzahl an Referenzproben erreicht werden.

- (5) Im Wissen, dass die Rekrutierung einer ausreichend großen Anzahl an Referenzindividuen für die einzelnen Labore mit gewissen Schwierigkeiten verbunden ist, stellt die Arbeitsgruppe Konzepte für multizentrische Studien und für robuste statistische Methoden vor.
 - (a) Gut organisierte Multicenterstudien mit strikten Ein- und Ausschlusskriterien und vergleichbaren Analysemethoden können die Datenerhebung in verschiedenen Standorten erlauben.
 - (b) Falls nur eine geringe Anzahl von Referenzindividuen zur Verfügung steht, können moderne statistische Methoden die Berechnung eines Referenzintervalls ermöglichen.
- (6) Die Arbeitsgruppe legt besonderes Augenmerk auf das Konzept der Konfidenzintervalle. Zu wenige Werte können dazu führen, dass die Konfidenzintervalle so groß werden, sodass die Referenzintervalle ihre Bedeutung verlieren.
- (7) Eine strenge und systematische Herangehensweise zur Erstellung von Referenzwerten für einzelne Subklassen wird empfohlen.
- (8) Fall das Labor zuvor in der eigenen Patientenpopulation erhobene Referenzintervalle auf eine neu eingeführte Analysemethoden übertragen will, kann man diese übertragen. Das Komitee empfiehlt jedoch die neuen Referenzwerte mit einer kleinen Gruppe von Referenzindividuen zu verifizieren.

- (9) Da die Erstellung eigener Referenzintervalle die Möglichkeiten viele Labore übersteigen, wird eine Verifizierung von Referenzintervallen anderer Labore im eigenen Labor empfohlen. Dies ist schon mit 20 Proben möglich.
- (10) In zunehmend mehr Fällen (z.B. Cholesterin, HbA1c) ist die Erstellung eines eigenen Referenzwerte nach den Prinzipien der Arbeitsgruppe nicht mehr angemessen, da für diese Werte bereits nach nationalem bzw. internationalem Konsens Grenzwerte festgelegt wurden. Hinsichtlich solcher Analyte müssen Hersteller und Labore sicherstellen, dass ihre Geräte und Methoden akkurate Ergebnisse liefern.
- (11) Eine korrekte und übersichtliche Präsentation zur Erstellung der Referenzwerte ist für die praktische Anwendung in Klinik und Labor wichtig und sollte auf Anfrage zugänglich sein.

2.3 Richtlinien der National Academy of Clinical Biochemistry (NACB)

Nach Empfehlungen der NACB sollten die Referenzpopulation zur Erstellung eines Referenzwertes für TSH-Serumwerte folgende Kriterien erfüllen (Baloch et al. 2003).

Es sollten Werte von mindestens 120 freiwilligen Teilnehmern erhoben werden.

Der Referenzwerte sollte aus der 95% -Konfidenzgrenze erstellt werden.

Weiterhin sollten folgende Voraussetzungen erfüllt sein.

- Keine nachweisbaren Schilddrüsenautoantikörper gegen Thyreoperoxidase oder Thyreoglobulin
- Keine positive Eigen- oder Familienanamnese hinsichtlich Schilddrüsenerkrankungen
- Keine sichtbare oder tastbare Struma
- Keine Medikamenteneinnahme (mit Ausnahme von Östrogenen)

2.4 Voraussetzungen für ein geeignetes

Schilddrüsenreferenzwertkollektiv

In Anlehnung an die Kriterien der NACB zur Erstellung eines Schilddrüsenreferenzkollektivs (Baloch et al. 2003) haben wir modifizierte Kriterien zur Auswahl geeigneter Teilnehmer für eine Referenzpopulation erstellt.

Teilnehmer sollten augenscheinlich gesund sein und weder eine vergrößerte Schilddrüse, noch sonografisch erfassbare parenchymatöse Veränderung in der Schilddrüse aufweisen. Zudem sollten keine laborchemischen Hinweise für eine Schilddrüsenerkrankung vorliegen. Auch andere körperliche Umstände, wie zum Beispiel Schwangerschaft, welche in erheblichem Maße die Schilddrüsenfunktion verändern (Glinioer 1997), sollten nicht vorliegen.

Um gewährleisten zu können, dass die gemessene Schilddrüsenfunktion nur durch die regionale Jodversorgung beeinflusst wird, müssen außerdem die Schilddrüsenfunktion beeinflussende Medikamente, wie auch eine Jodkontamination, z. B. durch Jodhaltiges Kontrastmittel, ausgeschlossen werden.

2.5 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden Teilnehmer, bei denen folgende Kriterien zutrafen:

- anamnestische Schilddrüsenvorerkrankung
- Diabetes mellitus
- aktuelle Einnahme von Medikamenten, welche die Schilddrüsenfunktion stark beeinflussen (Abuid und Larsen 1974; Bocchetta et al. 1991; Bogazzi et al. 2001), darunter:
 - o Thyroxin
 - o Thyreostatika
 - o Amiodaron
 - o Lithium
- Jodkontamination durch:

- aktuelle Einnahme von jodhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln über 100 µg pro Tag
- operative Eingriffe bzw. Röntgenkontrastmittelgabe, weniger als drei Monate zurückliegend
- zum Messzeitpunkt bestehende Schwangerschaft oder Stillen
- sonografisch festgestellte Struma, definiert mit mehr als 18 mL Schilddrüsenvolumen bei Frauen und mehr als 25 mL bei Männern
- sonografisch festgestellte Auffälligkeiten der Binnenstruktur der Schilddrüse, wie verminderte Echogenität oder knotige Veränderungen des Schilddrüsenparenchyms
- laborchemisch nachgewiesene Erhöhung der Schilddrüsenautoantikörper mit 34 IU/mL für Anti-TPO , 115 IU/mL für Anti-Tg und 1,75 IU/L für Anti-TSHR als obere Grenze (Roche, private Kommunikation).

2.6 Ablauf der Messung

Die Anwerbung der Teilnehmer erfolgt durch Auslegen von Handzetteln in Arztpraxen, Apotheken in München, sowie in den verschiedenen Instituten und Stationen des Klinikums rechts der Isar.

Die Befragung und Untersuchung der Probanden fand in den Räumen der Schilddrüsenambulanz der Nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar statt. Im Institut der Klinischen Chemie wurden die Blutproben analysiert und verwahrt.

Die Ziele der Studie, der Ablauf der Messung und die Risiken der Blutentnahme wurden den Probanden in schriftlicher und mündlicher Form näher gebracht. Die freiwillige Teilnahme wurde anschließend von allen Teilnehmern in schriftlicher Form dokumentiert.

Alle Teilnehmer füllten einen Fragebogen bezüglich anthropometrischer Daten, Zeitraum der Ansässigkeit im Raum Bayern, Vorerkrankungen, im

speziellen Schilddrüsenerkrankungen, Medikamenteneinnahme, alimentäre Jodeinnahme, weniger als drei Monate zurückliegende operative Eingriffe oder Röntgenkontrastmittelgabe, sowie aktuell bestehende Schwangerschaft oder Stillen, aus.

Die Ultraschalluntersuchung der Schilddrüse wurde mit einem B-Mode Gerät Acuson X300 (Siemens Healthcare, Erlangen) mit einem Linearschallkopf V10-5 mit 10 MHz durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte im Liegen. Beide Schilddrüsenlappen wurden seitengetrent im Transversal- und Longitudinalschnitt dargestellt. Das Volumen der Schilddrüsenlappen wurde seitengetrent durch Breite x Tiefe x Länge x 0,479 (Brunn et al. 1981) berechnet und addiert, um das Gesamtvolumen zu berechnen. Das Volumen wurde in mL angegeben. Zudem wurde die Binnenstruktur des Schilddrüsenparenchyms auf Unregelmäßigkeiten, d.h. noduläre Strukturen, veränderte Echogenität und zystische Strukturen, beurteilt. Als Struma wurden Volumina von über 25 mL bei Männern und Volumina von über 18 mL bei Frauen angesehen (Dietlein M 2003).

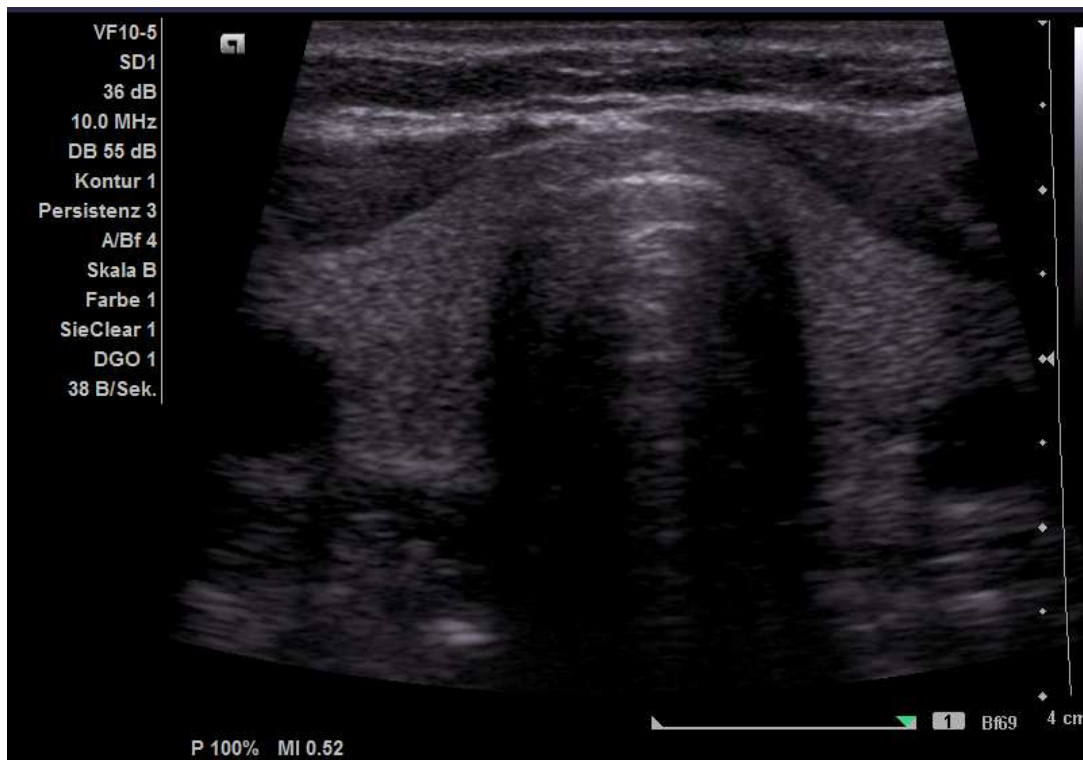


Abbildung 11 Ultraschallbild der Schilddrüse im Querschnitt, Übersichtsbild

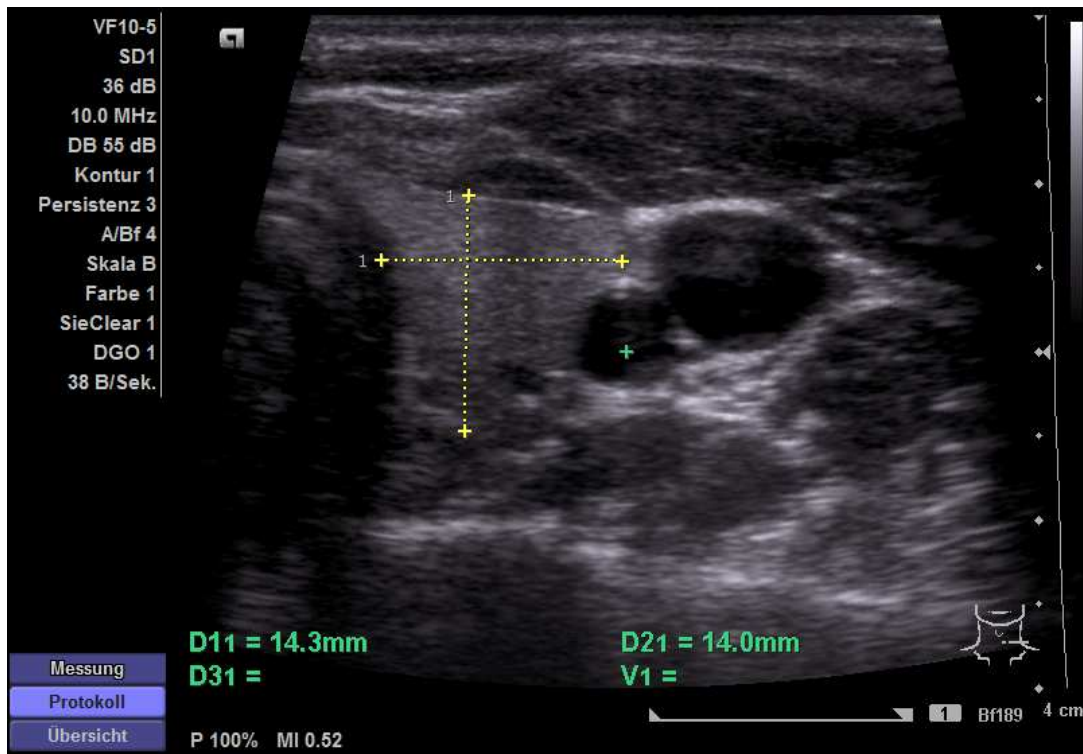


Abbildung 12 Ultraschallbild der Schilddrüse im Querschnitt, linker Schilddrüsenlappen

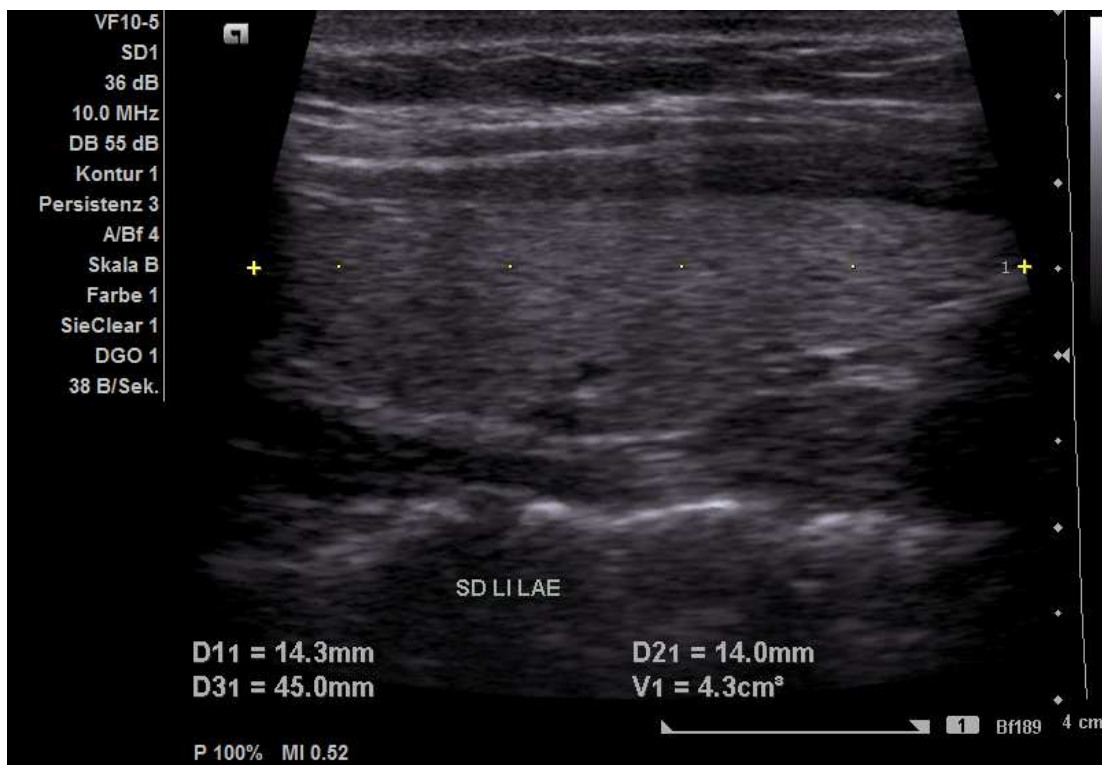


Abbildung 13 Ultraschallbild der Schilddrüse im Längsschnitt, linker Schilddrüsenlappen

2.7 Labormethoden

Teilnehmern, die keine der in 2.4 aufgeführten Ausschlusskriterien erfüllten, wurden zwei Serumröhrchen peripheres venöses Blut abgenommen, anhand derer die Serumkonzentrationen von TSH, der Schilddrüsenhormone fT3, fT4, und der Schilddrüsenautoantikörper Anti-Tg, Anti-TPO und Anti-TSHR gemessen wurden. Die Patienten waren dabei nicht nüchtern. Die Uhrzeit der Abnahme variierte zwischen 12 und 18 Uhr.

Es wurde peripheres venöses Blut mit einem Winged Infusion Set (sog. Butterfly) mit dem dazugehörigen Adapter für Serum-Monovetten abgenommen. Die Zwei Serum-Röhrchen wurden abgenommen und 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und anschließend noch am selben Tag mit einem **ElektroChemiLumineszens ImmunoAssay** gemessen. Es wurden die Geräte Elecsys 2010 cobas e 411 verwendet (Fillee et al. 2012).

Die Probandenseren wurden nach Herstellervorgaben mit den vom Hersteller gelieferten Originalreagenzien weiterverarbeitet.

Die gemessenen Analyte waren TSH, fT3, fT4, Anti-Tg, Anti-TPO und anti-TSHR. Für die kompetitiven ECLIA des Elecsys Systems zur Bestimmung von fT3 und fT4 wurden spezifische Anti-T3- oder Anti-T4-Antikörper verwendet, welche mit einem Rutheniumkomplex [tris(2,2'-bipyridyl)-ruthenium(II)-complex] markiert wurden. Biotinyliertes T3 oder T4 fungierte dabei als Markierungssubstanz für das kompetitive Format des Assays. Die Assays für TSH, Anti-TPO, Anti-Tg und Anti-TSHR funktionieren nach dem Sandwich-Assay-Prinzip. Hierbei wird einer der Antikörper des Sandwich-Assays mit dem bereits erwähnten Rutheniumkomplex markiert. So entsteht ein Sandwichkomplex aus dem zu messenden Analyt, dem rutheniummarkierten Antikörper und dem biotinmarkierten Antikörper.

Die untere Nachweisgrenze (limit of quantification LOQ) betrug laut Herstellerangaben für TSH 0,005 mIU/L, für fT3 0,4 pmol/L und für fT4 0,30 pmol/L.

Anti-TPO 5.00 IU/mL, Anti-Tg 10.0 IU/mL und Anti-TSHR 0.3 IU/L.

Die funktionellen Sensitivitäten stellten sich wie folgt dar: TSH 0.014 mIU/L, fT3 1.5 pmol/L, und fT4: 3 pmol/L.

Die laborinterne Qualitätskontrolle ergab folgende Interassaypräzisionen der Elecsys Schilddrüsenimmunoassays: TSH: 3,85% (1,64 IU/L, n=34) und 6,22% (20,9 IU/L, n= 33); fT3: 4,66% (5,08 pmol/L, n=31) und 3,83% (37,58 pmol/L, n=33); fT4: 4,45% (15,44 pmol/L n=32) und 3,49% (43,89 pmol/L, n=32).

Die Interassayvariationskoeffizienten hatten folgende Werte: Anti-TPO 3.54% (27.3 IU/mL, n = 36) und 9.43% (102 IU/mL, n = 35); Anti-TG 4.04% (72.9 IU/mL, n = 35) und 8.81% (153 IU/mL, n = 35); und Anti-TSHR 4.63% (4.67 IU/L, n = 33) und 2.58% (16.4 IU/L, n = 35).

Für die Messungen der Schilddrüsenautoantikörper wendeten wir die vom Hersteller vorgegebenen cut-offs an. Die Werte für Anti-TPO und Anti-Tg stellen die 95te Perzentile eines gesunden Referenzwertkollektivs bestehend aus 392 beziehungsweise 208 Personen dar (Roche persönliche Kommunikation).

2.8 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit den Programmen IBM SPSS Version 20.0 (Corp. 2011) und Reference Value Advisor (Geffre et al. 2011) analysiert.

2.8.1 Berechnung der Referenzwerte mittels Reference Value Advisor

Reference Value Advisor entspricht den zur Berechnung von Referenzwerten durch die International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) empfohlenen Vorgaben (Solberg 2004). Analysen mit Reference Value Advisor wurden jeweils für die Werte TSH, fT3 und fT4 durchgeführt. Folgende statistische Größen wurde ermittelt: Minimum, Maximum, Median, Mittelwert und Standardabweichung.

Die Verteilungen der Werte von TSH, fT3 und fT4 wurden durch Histogramme dargestellt und grafisch mit der Normalverteilung verglichen.

Für die Entdeckung möglicher Ausreißer für die Werte von TSH, fT3 und fT4 wurde ein Test nach Dixon (Dixon 1953) verwendet. Die Referenzbereiche wurden parametrisch und nicht-parametrisch berechnet und als empirische 2,5te und 97,5te Perzentile mit entsprechenden 90% Konfidenzintervallen (CI) angegeben. Zudem wurden Mittelwert bei parametrischer und Median bei nicht-parametrischer Berechnung angegeben. Der Berechnung der Referenzwerte wurden untransformierte Daten und für fT3 zusätzlich nach Box-Cox (Box GEP 1964) transformierte Daten zugrunde gelegt.

2.8.2 Weitere Datenanalyse mittels SPSS

Die Studienpopulation wurde durch Angabe des minimalen, maximalen und medianen Alters, sowie die Geschlechterverteilung beschrieben.

Anhand eines nicht-parametrischen Hypothesentests nach Mann-Whitney (Wilcoxon 1945; Mann und Whitney 1947) wurde auf signifikante Unterschiede in der Verteilung folgender Parameter zwischen dem männlichen und weiblichen Anteil der Studienpopulation getestet : Alter, TSH, fT3, fT4, Anti-Tg, Anti-TPO, Anti-TSHR, Volumen. Die angegebenen p-Werte sind zweiseitig und wurden nicht für multiples Testen angepasst.

Für die Referenzpopulation wurden Korrelationen zwischen Alter und gemessenen Schilddrüsenvolumen sowie TSH und Schilddrüsenhormonen nach Spearmans Rho getestet (Spearman 1904).

2.9 Indirekte Methode zur Erstellung von Referenzwerten aus retrospektiven Daten

Eine Methode zur Umgehung des großen Arbeitsaufwands der Erstellung eigener Referenzwerte ist die Nutzung und Verarbeitung bereits existierender Patientendaten des jeweiligen Labors. Hierbei werden alle über einen bestimmten Zeitraum erhobenen Werte des gefragten Analyts, zu dem ein Referenzwert erstellt werden soll, verwendet. Ausgeschlossen werden Wiederholungsmessungen desselben Patienten, sowie Daten aus Intensivstationen. Die Ausgangsannahme ist hierbei, dass von einem

bestimmten Analyt der überwiegende Anteil der Werte, die im jeweiligen Labor gemessen werden, nicht pathologisch ist. Ein statistischer Ansatz zur Unterscheidung der normalen Werte von pathologischen Werten arbeitet mit einer geglätteten Kernel Dichtefunktion (Arzideh et al. 2009). Bei Anwendung der Kernel Dichtefunktion wird angenommen dass in einer Population gemessene Werte einer bestimmten Verteilung folgen, welche auch für Stichproben zutreffen. Mit Hilfe der Kernel Dichtefunktion kann diese zugrunde liegende Verteilung identifiziert werden (Parzen 1962). Der Grundgedanke dieses Ansatzes ist die Annahme, dass Analyte gesunder Referenzpersonen normal- oder log-normalverteilt sind. Mit Hilfe eines Algorithmus und der Kernel Dichtefunktion können nun von der erwarteten Verteilung abweichende Werte extrahiert werden. Anschließend kann aus den restlichen Werten, von denen man annimmt, dass sie die gesunde Patientenpopulation darstellt, die Referenzwerte bestimmen (Arzideh et al. 2009). Die beschriebene Methode ist jedoch nur für sehr große Datenmengen von mehreren tausend Einzelwerten anwendbar (Arzideh et al. 2007).

Für die Schilddrüsenhormone wurde diese indirekte Methode zur Bestimmung von Referenzwerten angewendet. Es wurden 212 402 gemessene Werte für TSH, 38 611 gemessene Werte für fT3 und 39 422 gemessene Werte für fT4 angewendet.

3 Ergebnis

3.1 Studienteilnehmer

Es nahmen 292 erwachsene Männer und Frauen teil. Davon waren 132 (45%) männlich und 160 (55%) Teilnehmer weiblich. Das mittlere Alter betrug 38 ± 15 Jahre, der Median lag bei 33 Jahren mit einem Altersbereich von 20 bis 79 Jahren.

3.1.1 Referenzpopulation

Es wurden 204 Probanden in die Studie eingeschlossen; davon waren 111 (54%) weibliche Teilnehmer und 93 (46%) männliche Teilnehmer. Das mittlere Alter betrug 33 ± 13 Jahre. Das mediane Alter lag bei 27 Jahren. Mittels Mann-Whitney-U-Test (Mann und Whitney 1947) zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Altersverteilung zwischen männlicher und weiblicher Subpopulation der Referenzpopulation ($p = 0,56$).

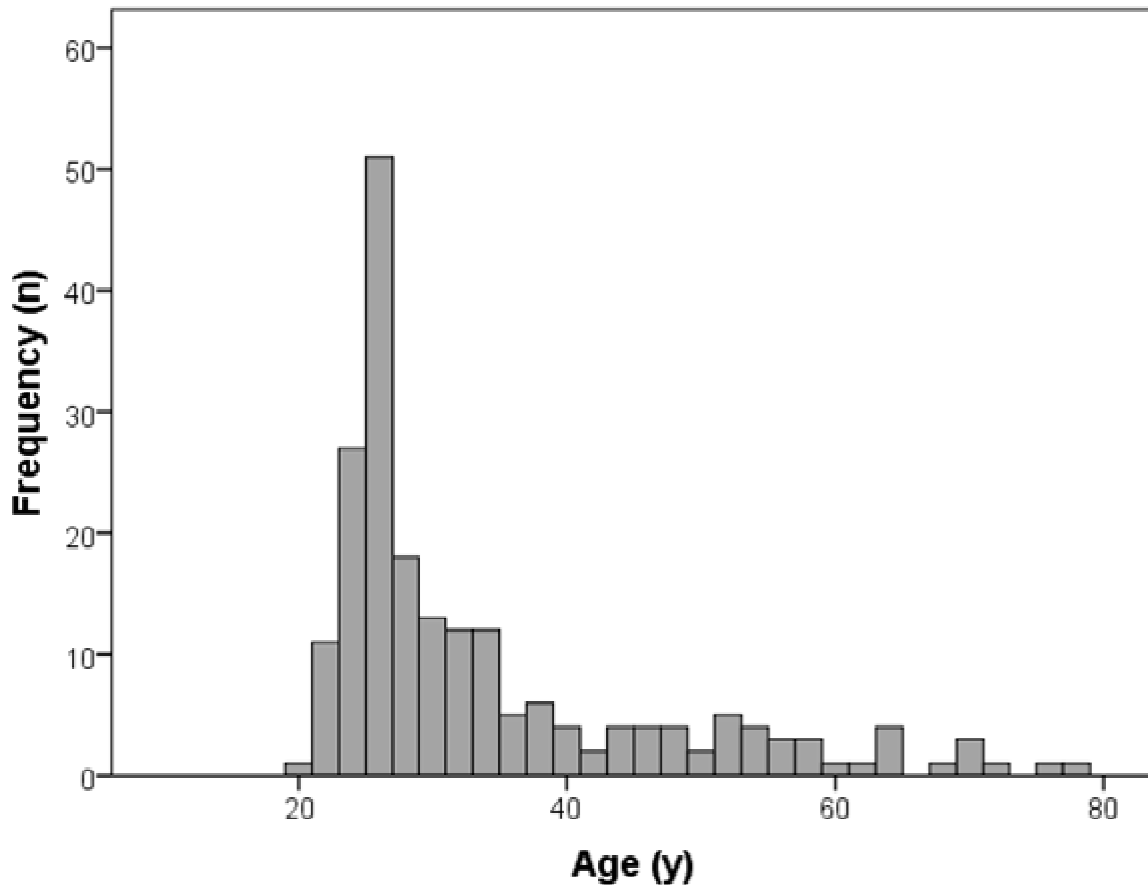


Abbildung 14 Altersverteilung innerhalb der Referenzpopulation

3.1.2 Ausgeschlossene Studienteilnehmer

88 Teilnehmer wurden anhand in Sektion 2.4 ausgeführter Kriterien aus der Studie ausgeschlossen. Davon waren 39 Teilnehmer männlich und 49 Teilnehmer weiblich. Das mediane Alter betrug 52 Jahre und das mittlere Alter lag bei 50 ± 16 Jahren.

Das häufigste Ausschlusskriterium waren Auffälligkeiten in der Schilddrüsenultraschalluntersuchung. Es wurden 67 Probanden aufgrund von sonografisch erfassten Unregelmäßigkeiten des Schilddrüsenparenchyms oder Volumenvergrößerung der Schilddrüse ausgeschlossen. Davon wiesen 16 Teilnehmer eine Struma auf. Weitere elf Probanden wurden auf Grund von Erhöhung der Schilddrüsenautoantikörper Anti-TPO oder Anti-Tg

ausgeschlossen. Keiner der Teilnehmer wies eine Anti-TSHR-Erhöpfung auf. Zwei Teilnehmer berichteten über regelmäßige alimentäre Jodeinnahme in Form von Nahrungsergänzungsmitteln mit mindestens 100 µg pro Tag. Schilddrüsenvorerkrankungen waren bei zwei Teilnehmern bekannt und sechs Probanden mussten aus anderen organisatorischen Gründen ausgeschlossen werden. Keiner der Teilnehmer gab eine Schwangerschaft, Stillen oder die Einnahme der in 2.5 aufgeführten Medikamente an.

3.2 Schilddrüsenvolumen

3.2.1 Alle Teilnehmer

Das mediane sonografisch gemessene Schilddrüsenvolumen, welches bei allen Teilnehmern vermessen wurde, die nicht bereits vor der sonografischen Untersuchung ein Ausschlusskriterium erfüllten und darauffolgend ausgeschlossen wurden, betrug 10,8 mL.

3.2.2 Ausgeschlossene Teilnehmer

Das mediane Schilddrüsenvolumen, sofern gemessen, betrug bei ausgeschlossenen Studienteilnehmern 13,5 mL. Bei männlichen Teilnehmern konnte ein medianes Volumen von 14,3 mL und bei weiblichen Teilnehmern ein medianes Volumen von 10,6 mL vermessen werden.

3.2.3 Referenzpopulation

Das mediane Gesamtschilddrüsenvolumen aller eingeschlossenen Teilnehmer betrug 10,4 mL. Medianes Schilddrüsenvolumen betrug bei männlichen Teilnehmern 11,7 mL und 9,2 mL bei weiblichen Teilnehmern. Die Schilddrüsenvolumina zeigten positive Korrelation mit zunehmendem Alter der Teilnehmer ($p = 0,005$).

Tabelle 1 Mediane Schilddrüsenvolumina

| | männlich | weiblich | gesamt |
|--|----------|----------|--------|
| Ausgeschlossene Studienteilnehmer medianes Volumen (mL) | 14,3 | 10,6 | 13,5 |
| Referenzpopulation medianes Volumen (mL) | 11,7 | 9,2 | 10,4 |

3.3 Gemessene Hormone der Referenzpopulation

Die Minimal- und Maximalwerte von TSH, fT4 und fT3 gemessen innerhalb der Referenzpopulation werden in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2 Minimal- und Maximalwerte von TSH, fT4 und fT3

| | Minimum | Maximum |
|---------------------|---------|---------|
| TSH (mIU/L) | 0,50 | 4,30 |
| fT4 (pmol/L) | 11,58 | 20,59 |
| fT3 (pmol/L) | 3,78 | 6,91 |

Die Analyse hinsichtlich möglichen Ausreißern nach Dixon (Dixon 1953) zeigte bei TSH und fT3 verdächtige Werte. Diese Werte wurden jedoch gemäß den Empfehlungen IFCC (Institute 2008) nicht ausgeschlossen, da kein Fehler seitens der Auswahl der Probanden oder bei den Messungen der Analyte ermittelt werden konnte. Bei fT4 wurden keine verdächtigen Werte gefunden.

3.4 Referenzwerte

Die Referenzwerte wurden nichtparametrisch für TSH und fT4 berechnet. Die Verteilung Werte von fT3 entspricht jedoch der Normalverteilung, wie im Histogramm nachfolgend dargestellt (Abbildung 13). Daher wurden die Referenzwerte für diesen Analyt parametrisch als Mittelwert und 2,5te und 97,5te Perzentile berechnet. Die in dieser Studie berechneten Referenzintervalle betragen 0,58 – 3,49 mIU/L für TSH, 11,58 – 20,46 pmol/L für fT4 und 3,56 und 5,88 pmol/L für fT3. Alle berechneten Referenzwerte und die entsprechenden 90% Konfidenzintervalle (90% CI) sind nachmals in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 Referenzbereiche von TSH, fT4 und fT3 angegeben als 2,5te und 97,5te Perzentile

| Hormon | Median von TSH und fT4 Mittelwert von fT3 (SD) | 2,5. Perzentile (90% CI) | 97,5. Perzentile (90% CI) |
|------------------------|---|-----------------------------|------------------------------|
| TSH (mIU/L) | 1,57 | 0,59 (0,53 – 0,69) | 3,49 (3,00 – 4,20) |
| fT4 (pmol/L) | 15,44 | 11,58 (11,58 – 11,58)* | 20,46 (19,30 – 20,59) |
| fT3 (pmol/L) | 4,76 (0,58) | 3,56 (3,46 – 3,69) | 5,88 (5,74 – 6,02) |

*Anmerkung: die identischen Konfidenzintervalle ergeben sich durch die angewandte Rankingmethode und den Wertebereich von fT4, der im Vergleich zu seinem Ausmaß relativ wenig verschiedene Einzelwerte enthält.

Die 90% Konfidenzintervalle für die oberen unteren Grenzen der Referenzwerte sind, mit Ausnahme des oberen Referenzwertes von TSH, nicht größer als 20% der Ausdehnung der Wertebereiche. Dies entspricht den Empfehlungen von Harris und Boyd (Harris EK 1995), erwähnt in den CLSI Standards (Harris EK 1995; Horowitz et al. 2008). Man kann daher von einer ausreichenden Anzahl an zur Verfügung stehenden Referenzwerten ausgehen (Horowitz et al. 2008) (Seite 17). Bei dem oberen Referenzwert von TSH ergab die Plausibilitätsprüfung durch Berechnung des oberen Referenzwertes von TSH anhand von transformierten Werten ähnliche Referenzwerte mit 90% Konfidenzintervallen, die kleiner als 20% des Wertebereichs waren. Daher kann die nicht-parametrisch berechnete 97,5te Perzentile als plausibler Wert angesehen werden. Ergebnisse der Plausibilitätsprüfung sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 Berechnung des oberen Referenzwertes von TSH (97,5te Perzentile) mit transformierten Daten

| | Nicht- parametrisch | Nach Box-Cox- Transformierung | Nach Box-Cox- Transformierung mit robust Methode |
|--|--------------------------------|--|---|
| 97,5te Perzentile (mIU/l) | 3,49 | 3,44 | 3,43 |
| 90% CI (mIU/l) | 3,00 – 4,20 | 3,20 – 3,66 | 3,21 – 3,65 |

Die Verteilung der gemessenen Hormone TSH, fT4 und fT3 wurde mittels Histogramm grafisch dargestellt und zeigte bei TSH und fT4 keine Normalverteilung. Bei fT3 kann man anhand der grafischen Darstellung von einer Normalverteilung der gemessenen Werte ausgehen. Die gemessenen Werte von sowohl TSH als auch fT4 sind nicht normalverteilt.

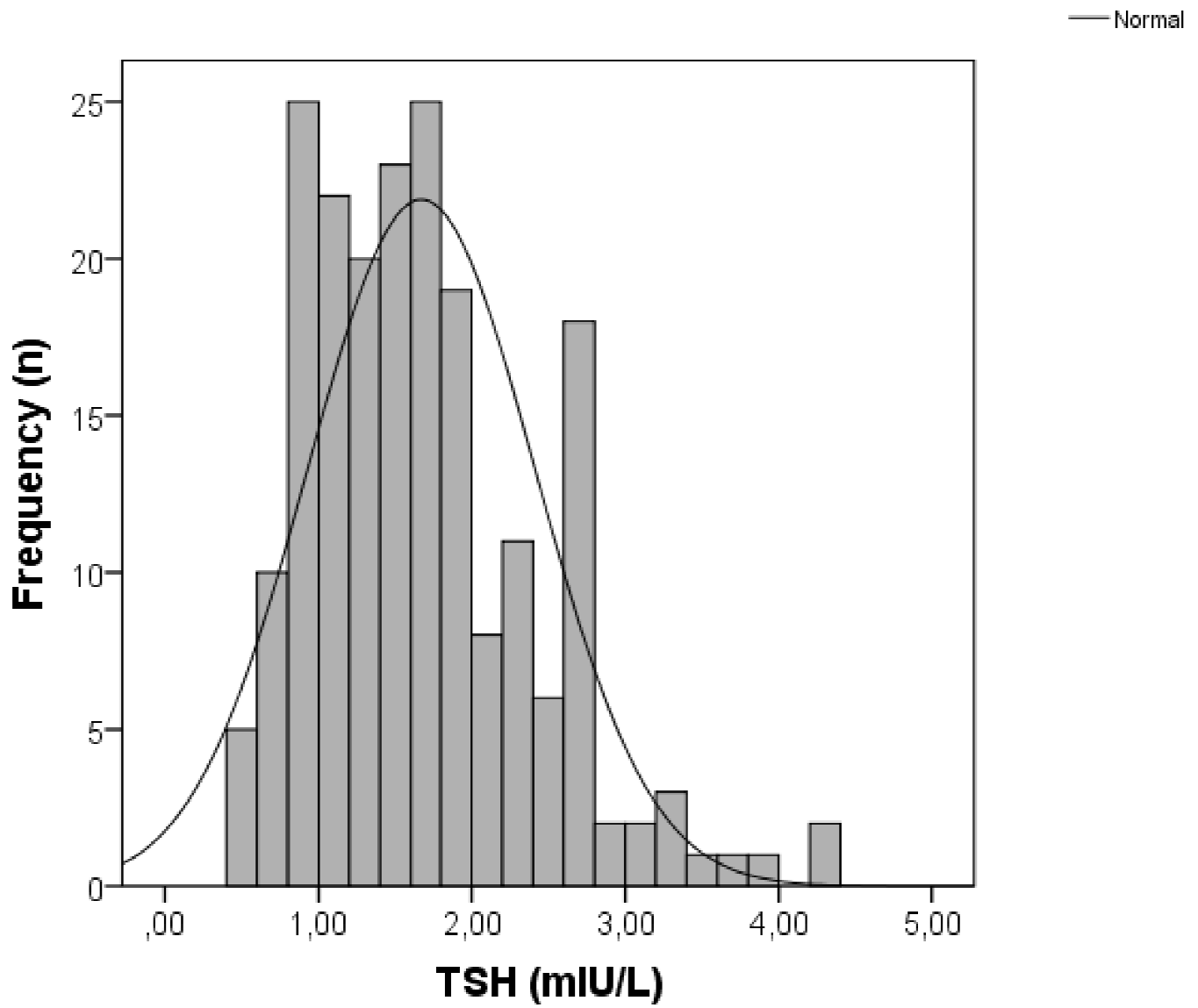


Abbildung 15 Verteilung der Serumkonzentrationen von TSH

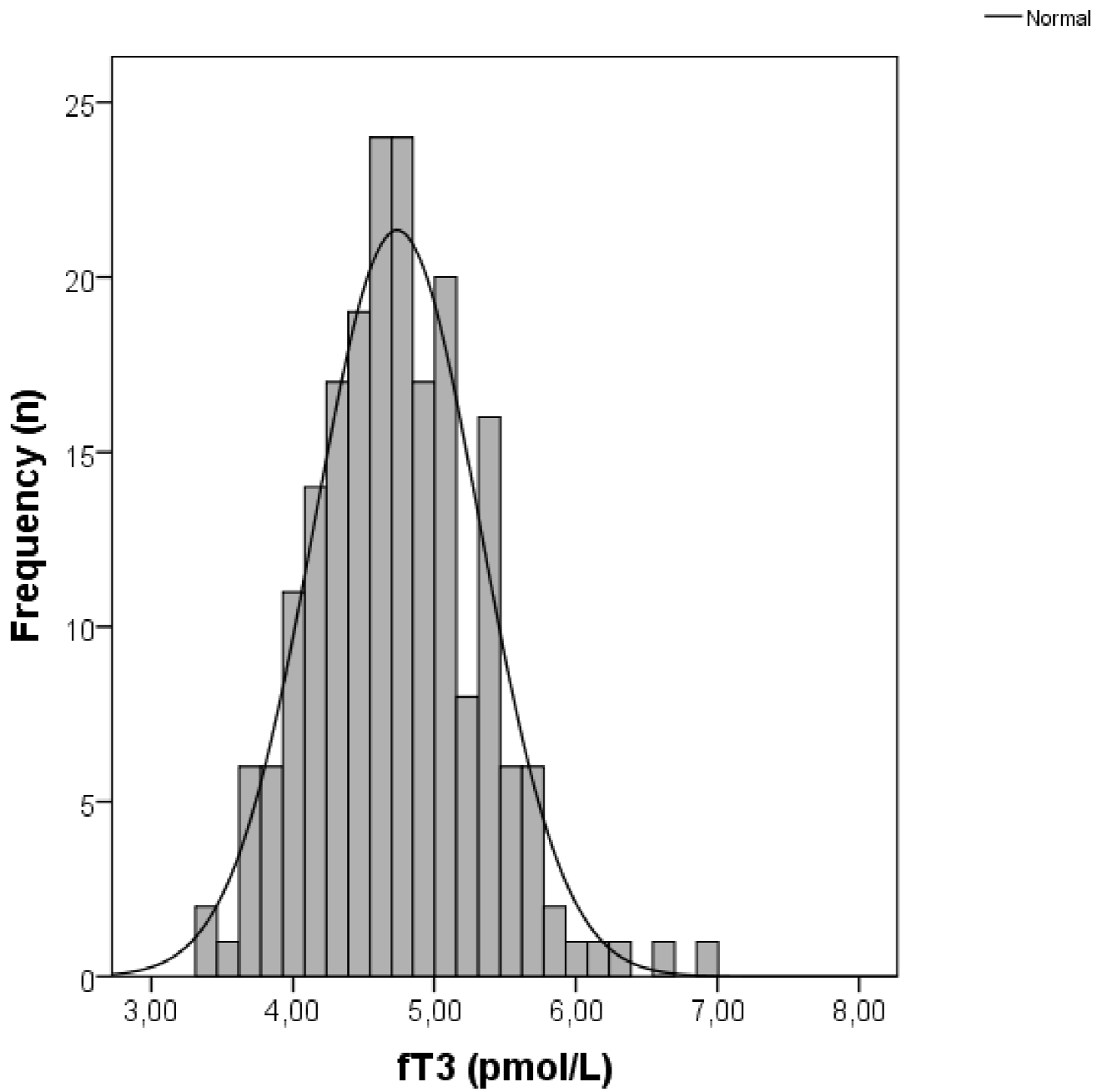


Abbildung 16 Verteilung der Serumkonzentrationen von fT3

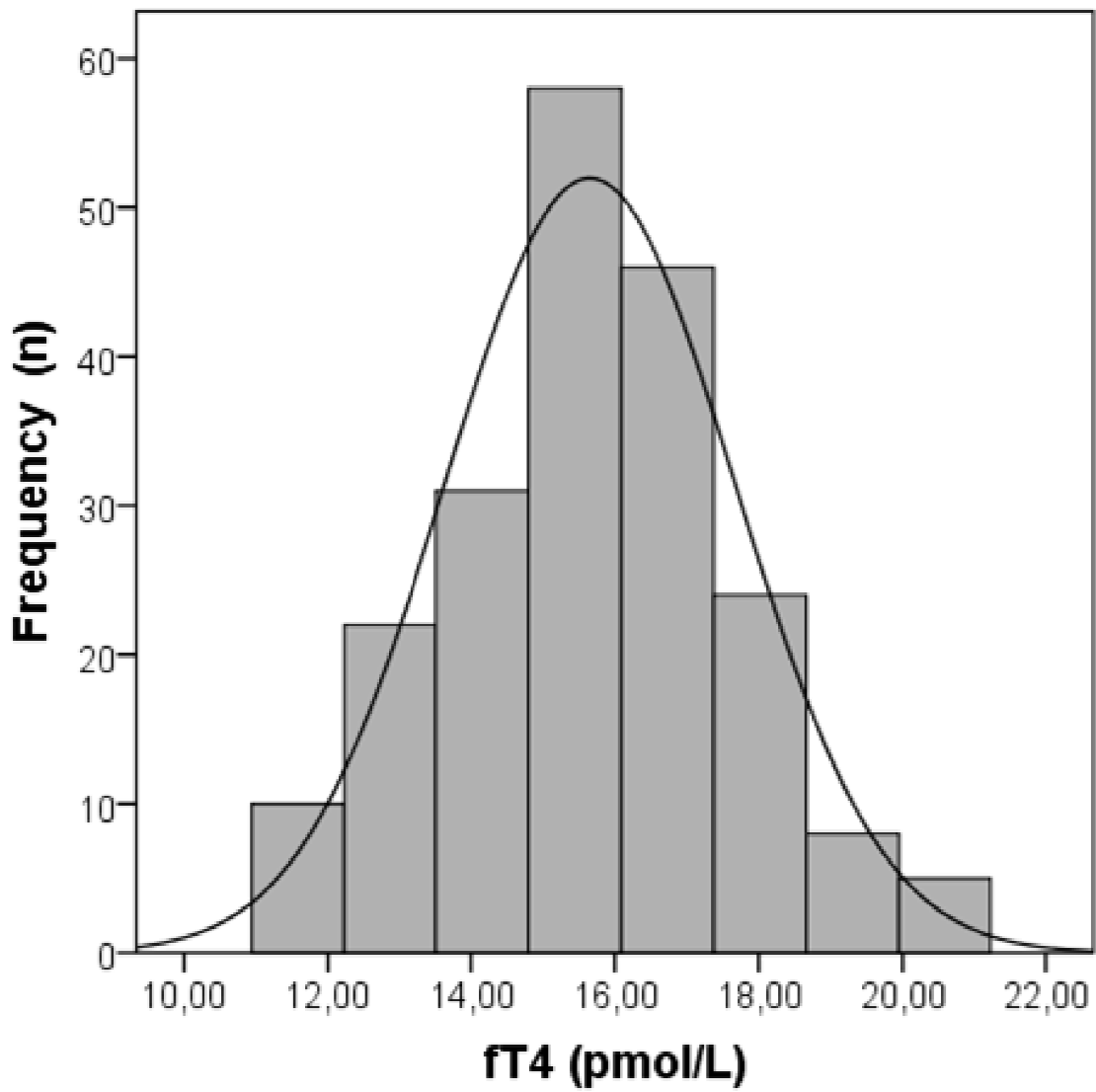


Abbildung 17 Verteilung der Serumkonzentrationen von fT4

3.5 Werte in männlicher und weiblicher Referenzsubpopulation

Es fanden sich keine Unterschiede zwischen dem männlichen und weiblichen Anteil der Studienpopulation in Bezug auf die Verteilung von TSH-Werten.

Signifikante Unterschiede der Werteverteilung zwischen weiblicher und männlicher Subpopulation wurden bei fT3-Werten ($p < 0,001$), fT4-Werten ($p < 0,001$), Anti-TSHR-Werten ($p < 0,05$) und Volumen ($p < 0,001$) gefunden. Die männliche Studiensubpopulation wies in diesen Kategorien jeweils höhere Werte auf.

Für die Serumkonzentrationen von fT3 waren sowohl die 2,5te als auch die 97,5te Perzentile im Vergleich zur weiblichen Studiensubpopulation erhöht: 3,39 – 6,93 pmol/L gegenüber 3,23 – 6,78 pmol/L. Gleiches gilt für mediane und mittlere Werte: 4,93 pmol/L und 5,01 pmol/L gegenüber 4,47 pmol/L und 4,51 pmol/L.

Auch bei den gemessenen Serumkonzentrationen von fT4 umfasste die Erhöhung gegenüber der weiblichen Studiensubpopulation die 2,5te und 97,5te Perzentile, sowie mediane und mittlere Werte.

Bezüglich des Schilddrüsenvolumens waren Mittelwert und Median in der männlichen Subpopulation gegenüber der weiblichen Studiensubpopulation erhöht.

Tabelle 5 Geschlechtsspezifische Unterschiede betreffend fT3, fT4 und das Schilddrüsenvolumen

| | | Männlich | weiblich |
|----------------|----------------------------|-----------------|-----------------|
| fT3 | 2,5te Perzentile (pmol/L) | 3,39 | 3,23 |
| | 97,5te Perzentile (pmol/L) | 6,93 | 6,78 |
| | Median (pmol/L) | 4,93 | 4,47 |
| | Mittelwert (pmol/L) | 5,00 | 4,51 |
| fT4 | 2,5te Perzentile (pmol/L) | 11,6 | 10,3 |
| | 97,5te Perzentile (pmol/L) | 57,9 | 56,6 |
| | Median (pmol/L) | 16,73 | 15,44 |
| | Mittelwert (pmol/L) | 16,36 | 15,06 |
| Volumen | Median (mL) | 11,70 | 9,20 |
| | Mittelwert (mL) | 12,03 | 9,72 |

3.6 Altersabhängigkeit

FT3 korreliert in geringem Maße signifikant negativ mit zunehmendem Alter. TSH und fT4 zeigen keine signifikante Korrelation mit steigendem Alter. Das Schilddrüsenvolumen korreliert in geringem Maß positiv mit zunehmendem Alter.

Tabelle 6 Korrelation Alter mit TSH, Schilddrüsenhormon, Schilddrüsenvolumen innerhalb der Referenzpopulation

| | | TSH | fT3 | fT4 | Schilddrüsenvolumen |
|--------------|-------------------------|--------|---------|--------|---------------------|
| Alter | Korrelationskoeffizient | -0,125 | -0,167* | -0,089 | 0,198* |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,076 | 0,017 | 0,204 | 0,005 |

3.7 Schilddrüsenautoantikörper

Die im Serum gemessenen Schilddrüsenautoantikörperkonzentrationen lagen bei allen 204 Subjekten der Referenzpopulation unter den gegebenen Cut-off-Werten von <34 IU/mL für Anti-TPO, <115 IU/mL für Anti-Tg und <1,75 IU/mL für Anti-TSHR.

Innerhalb der Referenzpopulation konnten bei 178 Teilnehmern Antikörper gegen Thyreoperoxidase, bei 115 Antikörper gegen Thyreoglobulin und bei 60 Teilnehmern Antikörper gegen den TSH-Rezeptor detektiert werden

Tabelle 7 Gemessene Schilddrüsenantikörperwerte innerhalb der Referenzpopulation

| | Anti-TPO (n = 178) | Anti-TG (n = 115) | Anti-TSHR (n = 60) |
|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Median (IU/L) | 9,0 | 13,0 | 0,45 |

3.8 Ergebnisse aus indirekter Methode zur Erstellung von Referenzwerten aus retrospektiven Daten

Die aus Patientendaten berechneten Referenzwerte für TSH, fT3 und fT4, werden in Tabelle 8 aufgeführt. Die erhobenen Referenzwerte aus der Referenzpopulation werden zum Vergleich ebenfalls nochmal aufgeführt.

Tabelle 8 Referenzwerte im Vergleich

| | TSH | fT3 | fT4 |
|---|----------------|-----------------|-----------------|
| | (mIU/L) | (pmol/L) | (pmol/L) |
| Referenzpopulation (n = 204) | 0,59 – 3,49 | 3,56 – 5,88 | 11,58 – 20,46 |
| Patientendaten | 0,34 – 4,05 | 2,51 – 6,37 | 11,79 – 23,33 |
| | (n = 212 402) | (n = 38 611) | (n = 39 422) |

4 Diskussion

4.1 Studienpopulation

Der Anteil der ausgeschlossenen Teilnehmer an der Gesamtteilnehmerzahl beträgt 30,1% und ist nur teilweise konsistent mit anderen Schilddrüsenreferenzwertstudien der letzten Jahre mit vergleichbaren Ausschlusskriterien (Kratzsch et al. 2005; Völzke et al. 2005). So wurden bei Kratzsch et al. 25,3 % (Kratzsch et al. 2005) der Teilnehmer aus dem Referenzkollektiv ausgeschlossen und 62,0% (Völzke et al. 2005) bei der in Pommern durchgeführten Studie. Der Anteil der wegen sonografisch festgestellter Auffälligkeiten des Schilddrüsenparenchyms oder Struma ausgeschlossenen Teilnehmer ist mit 22,9% ebenfalls lediglich vergleichbar mit der Leipziger Studie (Kratzsch et al. 2005), jedoch niedriger als bei Völzke et al. (Völzke et al. 2005) und ebenfalls niedriger als in der 2004 veröffentlichten repräsentativen Studie zur Prävalenz von sonografischen Auffälligkeiten der Schilddrüse in Deutschland (Reiners et al. 2004). So fanden Reiners bei 33,1% der Teilnehmer sonografische Auffälligkeiten der Schilddrüse (Reiners et al. 2004). Die im Vergleich zu den aufgeführten Studien überwiegend niedrigere Prävalenz von sonografisch erfassten Auffälligkeiten der Schilddrüse mag unter anderem durch die Art der Probandenrekrutierung beeinflusst worden sein, da gezielt nach Schilddrüsengesunden Teilnehmern gesucht wurde. Mögliche Teilnehmer, die bereits bekannte Schilddrüsenleiden oder anamnestische Auffälligkeiten in der Bildgebung der Schilddrüse hatten, haben sich so sehr wahrscheinlich gar nicht erst gemeldet.

Der Anteil der wegen erhöhter Schilddrüsenautoantikörpertiter ausgeschlossenen Teilnehmer verglichen mit der Gesamtteilnehmerzahl ist mit 3,7% vergleichsweise niedrig (Hollowell et al. 2002; Kratzsch et al. 2005; Völzke et al. 2005), ist jedoch der Methodik dieser Studie geschuldet, da eine Vielzahl der ausgeschlossenen Teilnehmer bereits vor venöser Blutabnahme auf Grund von sonografischen Auffälligkeiten der Schilddrüse ausgeschieden sind.

Letztlich kann man in dieser Arbeit von einer sorgfältig zusammengestellten Referenzpopulation, bestehend aus 204 klinisch gesunden Erwachsenen Teilnehmern, selektiert nach den entsprechenden NACB-Kriterien (Baloch et al. 2003), ausgehen, welche valide Referenzwerte für TSH, fT3 und fT4 gewährleistet.

4.2 Schilddrüsenvolumen

Das mittlere Schilddrüsenvolumen gemessen in dieser Studie war vergleichsweise niedrig. Während das mittlere Schilddrüsenvolumen innerhalb der Referenzpopulation dieser Studie bei 10,8 mL lag, zeigten sich sowohl in der Referenzpopulation von Kratzsch et al. höhere Werte, 12,0 mL bei Frauen und 16,2 mL bei dem männlichen Anteil der Referenzpopulation (Kratzsch et al. 2005). Ebenfalls war in der deutschlandweit durchgeführten Papillonstudie von Reiners et al. zur Prävalenz von Schilddrüsenunregelmäßigkeiten einer unselektierten Teilnehmerschaft das mittlere Schilddrüsenvolumen mit 17,1 mL (Reiners et al. 2004) erheblich höher als in dieser Studie. Hier betrug das mittlere sonografisch erfasste Schilddrüsenvolumen 11,9 mL innerhalb der nicht selektierten Studienteilnehmerschaft. Diese erheblichen Unterschiede können einerseits durch den bereits erwähnten Selektionsbias hinsichtlich der Rekrutierungsmethode bedingt sein, da im Rekrutierungsprozess aktiv nach Schilddrüsengesunden gesucht wurde. Andererseits zeigten Untersuchungen von Rasmussen et al. den signifikanten inversen Zusammenhang zwischen Höhe der Jodaufnahme und Schilddrüsenvolumen (Rasmussen et al. 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass sich inzwischen die Jodversorgung im Großraum München im Vergleich zu der 2004 durchgeführten Papillonstudie (Reiners et al. 2004) deutlich verbessert hat. Dies zu bestätigen könnte Gegenstand weiterer Studien sein.

Das Schilddrüsenvolumen korreliert sowohl in der Referenzgruppe als auch in der Gruppe der ausgeschlossenen Teilnehmer signifikant positiv mit zunehmendem Alter ($p = 0,005$). Dies passt zu der Beobachtung, dass

sowohl medianes Schilddrüsenvolumen als auch medianes Alter in der Gruppe der ausgeschlossenen Teilnehmer im Vergleich zur Referenzpopulation höher ausfiel und ist in Einklang mit Ergebnissen aus Schilddrüsenuntersuchungen an über 96 000 Teilnehmern im Rahmen der Papillon Initiative, welche eine stetige Zunahme des Schilddrüsenvolumen bis 45 Jahren und anschließendem Plateau feststellte (Reiners et al. 2004).

Tabelle 9 Aufstellung der Ausschlussgründe

| | Unselektierte Studienpopulation | Referenzpopulation | Ausgeschlossene Teilnehmer |
|--|--|---------------------------|-----------------------------------|
| Medianes Alter | 32 | 27 | 50 |
| Medianes Schilddrüsenvolumen (mL) | 10,8 | 10,4 | 13,5 |
| Mittel (SD) | 11,9 (5,1) | 10,8 (3,4) | 15,2 (7,4) |

4.3 Normalverteilung

Nach grafischer Darstellung (Bland 2000) der gemessenen Schilddrüsenhormone und TSH, zeigte sich bei Werten von fT3 eine der Normalverteilung entsprechende Häufigkeitsverteilung der Werte. Es wurde daher bei Berechnungen für fT3 von einer Normalverteilung ausgegangen. Um die Vermutung der Normalverteilung zu bestätigen, wurden die Werte von fT3 nach Box-Cox (Box GEP 1964) transformiert. Diese Transformation hat die Herstellung einer Normalverteilung der transformierten Daten zum Ziel (Box GEP 1964) und zeigt, wie in Tabelle 10 dargestellt, annähernd identische Werte vor und nach Transformation. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Normalverteilung der Werte von fT3.

Tabelle 10 Referenzwert für fT3, parametrisch berechnet mit und ohne Transformation der Daten

| | Nicht transformiert | Nach Box-Cox transformiert |
|--|----------------------------|-----------------------------------|
| 2,5te Perzentile (90% CI) pmol/L | 3,56 (3,46 – 3,69) | 3,68 (3,59 -3,77) |
| 97,5te Perzentile (90% CI) pmol/L | 5,88 (5,74 – 6,02) | 5,99 (5,,85 – 6,16) |

Auf eine formale Testung auf Normalverteilung der Werte, zum Beispiel nach Shapiro-Wilk (Shapiro und Wilk 1965), wurde verzichtet, da kein zusätzlicher Nutzen zur grafischen Evaluation erwartet werden konnte. Mit steigender Fallzahl steigt die Power dieser Tests auf Normalverteilung kleine Abweichungen von der Normalverteilung aufzudecken, während die Abweichungen weniger relevant werden. Wie Armitage et al. betonen, ist es von größerer Bedeutung, die Relevanz der Abweichung und somit auch die Relevanz der statistischen Test, als die Signifikanz der Ergebnisse dieser Testinstrumente zu evaluieren (Armitage et al. 2009). Im Falle dieser Arbeit mit N = 204, sind statistisch signifikante Ergebnisse für TSH, fT3 und fT4 nach Shapiro-Wilk (Shapiro und Wilk 1965) berechnet worden. Jedoch gibt die Teststatistik selbst Hinweise auf eine starke Übereinstimmung mit der Normalverteilung, in diesem Fall Werte nahe eins, welche mit der grafischen Darstellung konsistent sind.

Tabelle 8 Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk (Shapiro und Wilk 1965)

| | Statistik (empirische Prüfgröße W) | p-Wert |
|-----|--|--------|
| TSH | 0,946* | 0,000 |
| fT3 | 0,982* | 0,009 |
| fT4 | 0,957* | 0,000 |

4.4 Referenzwerte

Die Ergebnisse aus den Daten der 204 Studienteilnehmer zeigen einen engeren und verschobenen Referenzwertbereich verglichen mit den von Roche angegebenen Referenzbereichen (Anonymous 2009). Dies zeigt, dass Referenzwerte auf Basis eines regionalen Referenzkollektivs als Grundlage für eine an ein regionales Patientengut angepasste Schilddrüsendiagnostik dienen können.

Die Referenzwertbereiche für TSH sind in dieser Studie sowohl in Bezug auf die 2,5te Perzentile als auch in Bezug auf die 97,5te Perzentile ähnlich zu den Werten der Leipziger Studie (Kratzsch et al. 2005), die einen Bereich von 0,40 – 3,77 mIU/l angaben, jedoch vor allem im oberen Bereich deutlich verschieden zu Werten von Völzke et al. (Völzke et al. 2005) mit 0,25 – 2,12 mIU/l und der amerikanischen NHANES III Studie (Hollowell et al. 2002) mit 0,45 – 4,12 mIU/l und den von Roche empfohlenen Werten von 0,27 - 4,2 mIU/l. Auch die Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 hatten andere Wertebereiche. Die bei fT4 und fT3 gemessenen Wertebereiche sind gegenüber den Herstellerangaben enger gefasst und insgesamt in Richtung niedrigere Werte verschoben.

Insbesondere die für fT3 parametrisch berechnete 2,5te Perzentile von 3,56 pmol/L ist nun in besserem Einklang mit klinischen Erfahrungswerten in der

Schilddrüsenambulanz im Klinikum. Dieser Wert ist niedriger als die vom Hersteller gegebene Vorgabe von 3,8 pmol/L und entspricht den klinischen Beobachtungen von zu niedrigen fT3-Serumkonzentrationen bei Patienten ohne Symptome einer Schilddrüsenunterfunktion und ohne ein durch nuklearmedizinische Diagnostik vermutetes low-T3-Syndrom. Die Ergebnisse dieser süddeutschen Studie unterscheiden sich von den Ergebnissen von Kratzsch et al., deren Auswertung nicht parametrisch stattfand und eine 2,5te Perzentile von 4,02 pmol/L für fT3 angaben (Kratzsch et al. 2005).

Interessanterweise wurden die Herstellerangaben zum ECLIA von Roche Diagnostics für Schilddrüsenhormone hinsichtlich der zu erwartenden Referenzwerten zwischenzeitlich (2013) geändert. Während die ältere Version der Arbeitsanweisungen für den fT3-Dritt-Generationsassay eine 2,5te Perzentile von 3,85 pmol/L, gemessen innerhalb einer Studienpopulation von 5366 Teilnehmern (Studie A), und eine weitere 2,5te Perzentile von 3,08 pmol/L, gemessen in einer kleineren deutschen Studienpopulation von 870 Teilnehmern (Studie B), angab, wurde in der neueren Version der Arbeitsanweisungen lediglich der Wert 3,08 pmol/L angegeben. Der Hersteller bezog dabei jedoch auf Studie A. Die entsprechenden Referenzintervalle von TSH und fT4 wurden nicht verändert.

Tabelle 12 2,5te und 97,5te Perzentilen im Vergleich mit anderen Referenzwertstudien

| | München | Kratzsch (Kratzsch et al. 2005) | Roche Diagnostics (Anonymous 2009) | Völzke (Völzke et al. 2005) | NHANES III (Hollowell et al. 2002) |
|---|---------|---------------------------------------|---|-----------------------------------|--|
| TSH, 2,5te Perzentile | 0,59 | 0,40 | - | 0,25 | 0,45 |
| TSH (mIU/L) 97,5te Perzentile | 3,49 | 3,77 | - | 2,12 | 4,12 |
| fT3 (pmol/L) 2,5te Perzentile | 3,56 | 4,02 | 3,1 | 3,8 | - |
| fT3 (pmol/L) 97,5te Perzentile | 5,88 | 6,79 | 6,7 | 7,0 | - |
| fT4 (pmol/L) 2,5te Perzentile | 11,58 | 12,8 | 12 | 8,3 | - |
| fT4 (pmol/L) 97,5te Perzentile | 20,46 | 20,4 | 22 | 18,9 | - |

Wodurch kann es zu solchen Unterschieden kommen? Dem können einerseits Unterschiede in der Jodversorgung, andererseits auch methodische Unterschiede zugrunde liegen.

Wie Hampel et al. 2005 herausfanden, unterscheidet sich die mittlere Jodexkretion im Urin signifikant zwischen Nord-, Mittel-, und Süddeutschland (Hampel et al. 2010). Diese wurde für Norddeutschland mit 125 µg/l, für Mitteldeutschland mit 140 µg/l und für Süddeutschland mit 123 µg/l angegeben (Hampel et al. 2010).

Methodische Unterschiede können durch andere Bedingungen der Probenabnahme, unterschiedliche Auswahlkriterien und die Altersverteilung entstehen. Bei den Abnahmebedingungen spielen vor allem die Uhrzeit und der Nüchternheitszustand geringgradig eine Rolle, da vor allem TSH und fT3 einem zirkadianen Rhythmus, mit Peaks in der Nacht, unterliegen (Russell et al. 2008) und Nüchternheit eher zu höheren TSH-Werte führen (Scobbo et al. 2004). Teilnehmer der beiden deutschen Referenzwertstudien waren ebenfalls nicht nüchtern (Kratzsch et al. 2005). Zur Abnahmezeit wurden nur bei Kratzsch et al. Angaben gemacht. Die Abnahmen fanden dort zusätzlich zu den Nachmittagsstunden auch vormittags ab acht Uhr statt (Kratzsch et al. 2005). Somit kann Nüchternheitszustand als Einflussfaktor auf die Schilddrüsenwerte zumindest bei den deutschen Studien ausschließen, wohingegen bei den zusätzlichen Abnahmezeiten am Vormittag bei Kratzsch et al. ein Einfluss auf die Serumwerte nicht ausgeschlossen werden kann.

Zu den Ausschlusskriterien lassen sich ebenfalls einige Unterschiede herausarbeiten. Während allen Studien gemeinsam ist, persönliche Anamnese eine Schilddrüsenerkrankung, Einnahme von Schilddrüsenmedikamenten und positive Antikörper gegen TPO als Ausschlusskriterium zu werten, waren Familienanamnese bezüglich Schilddrüsenerkrankungen nur bei der NHANES III Studie und der Leipziger Studie von Relevanz und zu dieser Studie vergleichbare sonografische Beurteilungen der Schilddrüse fanden nur bei Kratzsch et al. und bei Völzke et al. statt. Hinsichtlich der Medikamenteneinnahme führte bei Kratzsch et al. jegliche Einnahme zum

Ausschluss (Kratzsch et al. 2005), während in der hiesigen und in den anderen erwähnten Studien nur die Schilddrüsenfunktion beeinflussende Medikamente ausgeschlossen wurden (Hollowell et al. 2002; Völzke et al. 2005).

Als großen Einflussfaktor kann man die sonografische Beurteilung der Schilddrüse auf Volumen und Binnenstruktur werten. Diese war in allen Studien mit Sonografie als Beurteilungskriterium der häufigste Ausschlussgrund.

Somit kann man zusammenfassen, dass die hiesige Referenzstudie vergleichbare Ausschlusskriterien gegenüber den vielfach erwähnten anderen Referenzstudien in Deutschland angewendet hat. Die fehlende sonografische Beurteilung der Schilddrüse in der NHANES III Studie beeinträchtigt die Vergleichbarkeit der Werte mit unserer Studie.

Hinsichtlich der Labormethoden ist zu erwähnen, dass wie bei dieser Arbeit auch, bei Kratzsch et al. Elecsys ECLIAS verwendet wurden, wohingegen Völzke die LUMItest-Methode von Brahms verwendeten (Kratzsch et al. 2005; Völzke et al. 2005).

4.5 Geschlechtsabhängigkeit

Bezüglich der geschlechtsspezifischen Unterschiede der Wertebereiche von TSH, fT3 und fT4 werden in der Literatur verschiedene Angaben gemacht. Hinsichtlich TSH ergab sich bei den Werten unserer Studie kein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen. Dies wurde ebenfalls in den Referenzwertstudien von Völzke et al. (Völzke et al. 2005), Kratzsch et al. (Kratzsch et al. 2005) und der amerikanischen NHANES III Studie (Hollowell et al. 2002) beschrieben. Jedoch gibt es eine gegensätzliche Beschreibung einer Studie mit norwegischem Referenzwertkollektiv, welche bei Männern einen signifikant niedrigeren TSH als bei Frauen maß (Bjoro et al. 2000). Auch die signifikanten Erhöhungen der freien Schilddrüsenhormone in der männlichen Subpopulation im Vergleich zur weiblichen wurden bei Kratzsch et al. (Kratzsch et al. 2005) und im

Zusammenhang mit dem Alter bei Völzke et al. (Völzke et al. 2005) beschrieben. Dies kann, wie bei Kratzsch et al. bereits diskutiert (Kratzsch et al. 2005), auf den Zusammenhang der Schilddrüsenhormonbindung an Bindeproteine mit Geschlechtshormonen zurückgeführt werden (Toldy et al. 2004). Der freien Schilddrüsenhormone sinken bei erhöhten Werten des Thyroxin-bindenden Globulins (TBG) leicht ab – dieser Effekt ist vor allem bei fT4 ausgeprägt (Toldy et al. 2004). TBG-Werte werden bei Frauen höher als bei Männern beschrieben (Roberts und Nikolai 1969). Ein möglicher Einfluss durch die Einnahme von oralen Kontrazeptiva kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden (Kratzsch et al. 2005; Gruning et al. 2007).

Trotz signifikanter Unterschiede wurde sowohl bei o.g. vergleichbaren Studien von einer Festlegung auf geschlechtsspezifische Referenzwerte abgesehen (Kratzsch et al. 2005; Völzke et al. 2005; Anonymous 2009). Dies mag vor allem wohl daran liegen, dass die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Subpopulationen stets im Verhältnis zum gesamten Wertebereich sehr gering waren und daher die Wahrscheinlichkeit für ihre Anwendung im klinischen Alltag gering war. Daher werden auch für die Ergebnisse dieser Studie keine geschlechtsspezifischen Werte festgelegt.

4.6 Altersabhängigkeit

Ähnlich zur vielfach erwähnten Referenzwertstudie von Völzke et al. konnte auch in dieser Arbeit eine geringe, jedoch signifikante negative Korrelation von fT3 zum Probandenalter beobachtet ($p = 0,017$) werden. Jedoch konnte für die Werte von TSH und fT4 keinerlei Altersabhängigkeit innerhalb der Referenzpopulation gezeigt werden.

Ergebnisse anderer Autoren zeigen ein durchmisches Bild bezüglich der Altersabhängigkeit von TSH und den freien Schilddrüsenhormonen. Während Völzke et al. ein altersabhängiges Absinken der Werte von TSH und fT3 beschrieben (Völzke et al. 2005), zeigten Surks und Hollowell sowie die norwegische HUNT-Studie steigende Werte für TSH mit

zunehmendem Alter (Bjoro et al. 2000; Surks und Hollowell 2007). Jedoch gehörte bei letztgenannten Studien eine sonografische Evaluation der Schilddrüse nicht zu den Ausschlusskriterien, anders bei dieser Münchener und auch der Pommerschen Studie (Völzke et al. 2005). Dies schränkt die Vergleichbarkeit der Werte zwischen der hiesigen Studie und den Studien von Surks und Hollowell und der HUNT Studie erheblich ein. Wenn man von einer steigenden Prävalenz von Parenchymveränderungen der Schilddrüse mit steigendem Alter ausgeht, wie Reiners et al. beschrieben (Reiners et al. 2004), kann eine Erhöhung der TSH-Werte bei mit steigendem Alter in Studien ohne Schilddrüsensonografie als Ausschlusskriterium eine Assoziation von steigenden TSH-Werten mit zunehmender Prävalenz von Auffälligkeiten der des Schilddrüsenparenchyms nahelegen.

Hierbei ist bereits beschriebene Zunahme des medianen Alters bei der hauptsächlich durch Schilddrüsenauffälligkeiten ausgeschlossenen Teilnehmern dieser Studie eine konsistente Beobachtung mit Ergebnissen der Papillon Initiative, die einen stetige Zunahme der Prävalenz von nodulären Veränderungen der Schilddrüse mit zunehmendem Alter beschreibt (Reiners et al. 2004).

4.7 Limitationen

Neben oben erwähnten Einschränkungen zur Vergleichbarkeit seien in diesem Abschnitt noch einige Limitationen der Studie selbst zu erwähnen. Obwohl das erfasste Kollektiv nach den Kriterien den CLSI eine über das Mindestmaß an benötigten Anzahl an Probanden enthält (Institute 2008), gehen die vergleichbaren Referenzwertstudien von einem jeweils zahlenmäßig umfangreicheren Kollektiv aus (Hollowell et al. 2002; Kratzsch et al. 2005; Völzke et al. 2005).

Hinsichtlich der Ausschlusskriterien ist zu erwähnen, dass lediglich die Einnahme von Medikamenten, die die Schilddrüsenfunktion stark beeinflussen, zum Ausschluss führte. Die Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion durch etwaige Einnahme anderer Medikamente,

deren Auswirkung auf die Schilddrüse nicht explizit erwähnt wird, ist nicht auszuschließen.

Entsprechend der Intention der Erstellung von lokalen Normbereichen von Schilddrüsenwerten, sind die in dieser Arbeit gezeigten Referenzbereiche nur eingeschränkt auf Populationen außerhalb des süddeutschen Raumes anwendbar.

4.8 Indirekte Methode zur Erstellung von Referenzwerten aus retrospektiven Daten und Ausblick

Zentraler Punkt dieser Studie aus München war die Erstellung regionaler Referenzwerte und der Vergleich dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Referenzwertstudien verschiedener Regionen. Alle Ergebnisse von bisher genannten Studien beruhten auf experimentellen Arbeiten. Nachfolgend soll hier die bereits beschriebene indirekte statistische Herangehensweise diskutiert werden, welche bereits vorhandene Datensätze aus dem klinischen Alltag verarbeiten kann.

Nach allgemein akzeptierten Empfehlungen des IFCC ist jedes Labor dazu angehalten, eigene Referenzwerte zu etablieren (Dybkaer und Solberg 1987; Petitclerc und Solberg 1987; Solberg 1987a, b; Solberg und Petitclerc 1988; Solberg und Stamm 1991) (Haeckel et al. 2007). Diese Anforderungen zu erfüllen ist jedoch mit einem großen Arbeitsaufwand verbunden, so dass viele Labore Referenzwerte übernehmen, welche nicht aus dem eigenen Labor stammen. Problematisch sind hierbei Unterschiede in den präanalytischen und analytischen Methoden, sowie unterschiedliche Messungenauigkeiten und systematische Messabweichungen (Haeckel et al. 2007). Mittels der indirekten Methode zur Berechnung von Referenzwerten aus Patientendaten aus dem Routinebetrieb kann die Möglichkeit der einfachen Erstellung eigener Referenzwerte geschaffen werden.

Für verschiedene Elektrolyte (Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Phosphat und Magnesium) und Enzymaktivitäten (Alaninaminotransferase (ALAT),

Aspartataminotransferase (ASAT), Gamma-Glutamyltransferase (γ -GT), Laktatdehydrogenase (LDH), alkalische Phosphatase (AP)) konnten bereits Untersuchungen mit guter Übereinstimmung zwischen indirekt, also rein statistisch bestimmten Referenzwerten, und konventionell erstellten Referenzwerten publiziert werden (Arzideh et al. 2007; Arzideh et al. 2009). Für Natrium zum Beispiel konnten aus Patientendaten, von jeweils über 800 Datensätzen, aus fünf Laboren Referenzwerte von 135 – 145 mmol/L erstellt werden (Arzideh et al. 2009). Diese entsprechen den von Sonntag empfohlenen Referenzwerten, der sich in einem Übersichtsartikel auf etwa 120 prospektive Studien bezieht (Sonntag 2003). Auch die in der NHANES III-Studie bestimmten Natriumreferenzwerte von 136 – 145 mmol/L entsprechen weitgehend den aus Patientendaten erhobenen Referenzwerten (Horn und Pesce 2003; Arzideh et al. 2009).

Im Vergleich zu den Referenzwerten aus der Referenzpopulation dieser Studie sind alle Referenzintervalle berechnet aus Patientendaten weiter gefasst. Bei fT3 ist dies besonders deutlich sowohl bei 2,5ten wie auch bei der 97,5ten Perzentile.

Es stellt sich nun die Frage, woher diese Unterschiede in den Referenzwerten herrühren könnten. Die Datenmenge kann mit mindestens 38000 Datensätzen pro Parameter als ausreichend betrachtet werden (Arzideh et al. 2009).

Zum einen sind Unterschiede bei dem Alter der verschiedenen Studienpopulationen zu beachten. Das mediane Alter der Patientenpopulation beträgt 59 Jahre für die Werte von TSH und 58 für die Werte von fT3 und fT4, während das mediane Alter der Referenzpopulation dieser Studie mit 27 Jahren deutlich niedriger ist. Für fT3 ist in dieser Studie, wie auch bei Völzke et al. eine signifikant negative Korrelation von Alter und fT3-Werten zu beobachten (Völzke et al. 2005). Ein vergleichbarer Trend ist für die Patientendaten grafisch darstellbar. Wie man obiger Tabelle 8 entnehmen kann, ist der Unterschied der Referenzwerte bei fT3 besonders stark ausgeprägt. Die niedriger ausgeprägte 2,5te Perzentile innerhalb der Patientenpopulation bestätigt die dargestellten Beobachtungen einer

negativen Korrelation zwischen Alter und fT3-Werten. Für die höher ausfallende 97,5te Perzentile der Patientendaten kann jedoch keine Erklärung gegeben werden.

Obwohl hier keine signifikante Altersabhängigkeit beschrieben wurde, kann auch für die anderen Parameter, also TSH und fT4 eine Altersabhängigkeit der Werte nicht ausgeschlossen werden.

Ein sehr großer Anteil der untersuchten Patientendaten kommt vermutlich von Patienten der hauseigenen Schilddrüsenambulanz. Schilddrüsenparameter sind in den meisten Abteilungen eines Krankenhauses kein täglicher Routineparameter, anders als etwa die Elektrolyte Natrium oder Kalium. In der Schilddrüsenambulanz kommt es durch ein hohes tägliches Patientenaufkommen und die spezielle Ausrichtung dieser Abteilung auf Schilddrüsenerkrankungen natürlicherweise zu einer großen Datenmenge von pathologischen Schilddrüsenwerten. Die Patientenpopulation solch einer Schilddrüsenambulanz besteht überwiegend aus Personen mit Schilddrüsenpathologien, mit möglicherweise oft stark erniedrigten oder stark erhöhten Schilddrüsenparametern. Zudem sind viele der gemessenen Schilddrüsenparameter durch schilddrüsenspezifische Medikation oder nuklearmedizinische Behandlung artifiziell verändert. Ein Grund für die im Vergleich zu den Referenzdaten weiter gefassten Referenzwerten berechnet aus Patientendaten könnte also der hohe Anteil an Daten von Schilddrüsenkranken sein.

Hier ergibt sich auch schon die erste und wichtige Einschränkung für diese indirekt gewonnenen Daten. Wie Arzideh et al. betonen, ist ein Datenschatz, bei dem man von einer hohen Prävalenz von pathologischen Werten ausgehen kann, nur sehr eingeschränkt für die indirekte Gewinnung von Referenzwerten anwendbar (Arzideh et al. 2009).

Jedoch könnte eine Berechnung der Schilddrüsenreferenzwerte aus Patientendaten, nach Ausschluss von Patientendaten aus Stationen mit hoher Prävalenz pathologischer Werte, wie Intensivstationen oder Schilddrüsenambulanz, ein valides Ergebnis bringen. Ob diese neu berechneten Werte nach Ausschluss dieser Daten mit in dieser Studie

hervorgebrachten Referenzwerten übereinstimmen, kann Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.9 Fazit

Lokale Referenzwerte sollten für einzelne Regionen erstellt oder zumindest verifiziert werden. Obwohl die Jodversorgung in ganz Deutschland als ausreichend angesehen werden kann (Hampel et al. 2010), ist davon auszugehen, dass die erstellten Referenzwerte nur für die süddeutsche Region gültig sind und sich von anderen Regionen mit unterschiedlicher Jodversorgung unterscheiden. Die in dieser Arbeit sorgfältig ausgewählte lokale Referenzpopulation gewährleistet eine gute Basis für die Erstellung von lokalen Schilddrüsenreferenzwerten. Statistisch bemerkenswert ist zudem beschriebene die Normalverteilung der Werte von fT3 mit entsprechend niedrigerer 2,5ter Perzentile von 3,56 pmol/L, verglichen mit der für das ECLIA Format empfohlenen unteren Referenzwertgrenze von 3,90 pmol/L (Anonymous 2009).

5 Zusammenfassung

Mit dem Ziel, lokal angepasste Referenzwerte für TSH und die freien Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 zu erstellen, wurde eine Schilddrüsenreferenzwertstudie im Großraum München durchgeführt. Hintergrund waren sich unterscheidende Herstellervorgaben der Immunoassays zu den Referenzwerten, da diese Referenzwerte aus verschiedenen regionalen Referenzwertstudien stammten.

Es wurden 292 klinisch gesunde erwachsene Teilnehmer hinsichtlich Schilddrüsenerkrankungen befragt und untersucht. Die Befragung richtete sich auf aktuell bestehende oder durchlaufene Schilddrüsenerkrankungen, sowie auf Medikamenteneinnahme und mögliche Jodkontamination durch alimentäre Jodeinnahme oder Röntgenkontrastmittel. Anschließend wurden eine sonografische Untersuchung der Schilddrüse sowie eine venöse Blutabnahme zur Messung von TSH, den freien Schilddrüsenhormonen und den Schilddrüsenautoantikörpern durchgeführt. Teilnehmer mit positiver Anamnese bezüglich Schilddrüsenerkrankung oder Jodkontamination wurden ausgeschlossen. In der Schilddrüsenultraschalluntersuchung festgestellte Auffälligkeiten des Schilddrüsenparenchyms oder Schilddrüsenvergrößerungen, sowie erhöhte Werte der Schilddrüsenautoantikörper führten ebenfalls zum Ausschluss.

Entsprechend diesen Ausschlusskriterien von 292 Teilnehmern wurden 204 Teilnehmer im Alter von 20 bis 78 Jahren in die Referenzpopulation eingeschlossen. Mit den ECLIA von Roche Diagnostics wurden die Serumkonzentrationen von TSH, fT3 und fT4 gemessen und anschließend die 2,5te und 97,5te Perzentile berechnet. Die nichtparametrisch berechneten Referenzwerte ergaben Wertebereiche von 0,58 – 3,49 mIU/L für TSH und 11,58 – 20,46 pmol/L für fT4. Statistisch bemerkenswert war die beobachtete Gauß'sche Verteilung der Werte von fT3, welche eine parametrische Herangehensweise für diese Werte rechtfertigte. Die entsprechend parametrisch berechneten Referenzwerte für fT3 lagen bei 3,56 – 5,88 pmol/L.

Die von diesem regionalen Referenzkollektiv ausgehenden 95%-Konzentrationsbereiche sind enger gefasst als die vom Hersteller vorgegebenen Werte. Ein sorgfältig ausgewähltes Referenzwertkollektiv entsprechend der NACB-Kriterien bietet die Möglichkeit, valide Referenzwerte für TSH, fT3 und fT4 zu erstellen, um somit die Grundlage für eine präzise in-vitro-Analytik von Schilddrüsenwerten zu schaffen. Die 2,5te Perzentile von fT3 steht nun auch in Einklang mit den klinischen und nuklearmedizinischen Beobachtungen bzw. Befunden.

6 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 9 Mediane Schilddrüsenvolumina..... | 35 |
| Tabelle 10 Minimal- und Maximalwerte von TSH, fT4 und fT3..... | 35 |
| Tabelle 11 Referenzbereiche von TSH, fT4 und fT3 angegeben als 2,5te und 97,5te Perzentile..... | 37 |
| Tabelle 12 Berechnung des oberen Referenzwertes von TSH (97,5te Perzentile) mit transformierten Daten..... | 38 |
| Tabelle 13 Geschlechtsspezifische Unterschiede betreffend fT3, fT4 und das Schilddrüsenvolumen..... | 43 |
| Tabelle 14 Korrelation Alter mit TSH, Schilddüsenhormon, Schilddrüsenvolumen innerhalb der Referenzpopulation..... | 44 |
| Tabelle 15 Gemessene Schilddrüsenantikörperwerte innerhalb der Referenzpopulation..... | 44 |
| Tabelle 8 Referenzwerte im Vergleich..... | 45 |
| Tabelle 9 Aufstellung der Ausschlussgründe..... | 48 |
| Tabelle 10 Referenzwert für fT3, parametrisch berechnet mit und ohne Transformation der Daten..... | 49 |
| Tabelle 16 Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk (Shapiro und Wilk1965)..... | 50 |
| Tabelle 12 2,5te und 97,5te Perzentilen im Vergleich mit anderen Referenzwertstudien..... | 52 |

7 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese | 4 |
| Abbildung 2 Mechanismus der Schilddrüsenhormonwirkung über Schilddrüsenhormonrezeptoren im Zellinneren | 5 |
| Abbildung 3 Antikörper-Antigen-Komplex nach Zugabe von Streptavidin (Roche Diagnostics) | 14 |
| Abbildung 4 Antigen-Antikörper-Komplex nach Bindung auf Festphase und nach Zugabe von TPA (Roche Diagnostics)..... | 15 |
| Abbildung 5 Antigen-Antikörper-Komplex, nicht festphasengebundener Antikörper ist mit einem Rutheniumkomplex markiert (Roche Diagnostics) | 16 |
| Abbildung 6 Elektrochemilumineszenzreaktion durch einen Rutheniumkomplex (Roche Diagnostics)..... | 16 |
| Abbildung 7 Detektion der Elektrochemilumineszenzreaktion durch einen Photomultiplier (Roche Diagnostics)..... | 17 |
| Abbildung 8 Zugabe von Ruthenium markierten Antikörpern zu Patientenserum für die Messung von freiem T3 | 18 |
| Abbildung 9 Zugabe von markiertem T3 und beschichteten Mikropartikeln mit anschließender Bildung eines Komplexes aus Antikörper, markiertem T3 und Mikropartikel | 18 |
| Abbildung 10 Bindung des Gesamtkomplexes an eine Festphase..... | 19 |
| Abbildung 11 Ultraschallbild der Schilddrüse im Querschnitt, Übersichtsbild | 26 |
| Abbildung 12 Ultraschallbild der Schilddrüse im Querschnitt, linker Schilddrüsenlappen | 27 |
| Abbildung 13 Ultraschallbild der Schilddrüse im Längsschnitt, linker Schilddrüsenlappen | 27 |
| Abbildung 14 Altersverteilung innerhalb der Referenzpopulation | 33 |
| Abbildung 15 Verteilung der Serumkonzentrationen von TSH..... | 39 |
| Abbildung 16 Verteilung der Serumkonzentrationen von fT3..... | 40 |
| Abbildung 17 Verteilung der Serumkonzentrationen von fT4..... | 41 |

8 Literatur

- Abuid, J. und Larsen, P. R. (1974). "Triiodothyronine and thyroxine in hyperthyroidism. Comparison of the acute changes during therapy with antithyroid agents." *J Clin Invest* 54: 201-208.
- Anonymous (2009). Reference Intervals for Children and Adults. Elecsys Thyroid Tests TSH, FT4, FT3, T4, T3, T-Uptake, FT4-Index, Anti-TPO, Anti-Tg, Tg; Elecsys Systems 1010/20120 Modular Analytics E170, cobas e 411 and e 601 Analysers, „Analysers, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany.
- Armitage, P., Berry, G. und Matthews, J. N. S. (2009). *Statistical methods in medical research*. Malden, Mass. [u.a.], Blackwell Science.
- Arzideh, F., Brandhorst, G., Gurr, E., Hinsch, W., Hoff, T., Roggenbuck, L., Rothe, G., Schumann, G., Wolters, B., Wosniok, W. und Haeckel, R. (2009). "An improved indirect approach for determining reference limits from intra-laboratory data bases exemplified by concentrations of electrolytes." *Laboratoriumsmedizin-Journal of Laboratory Medicine* 33: 52-66.
- Arzideh, F., Wosniok, W., Gurr, E., Hinsch, W., Schumann, G., Weinstock, N. und Haeckel, R. (2007). "A plea for intra-laboratory reference limits. Part 2. A bimodal retrospective concept for determining reference limits from intra-laboratory databases demonstrated by catalytic activity concentrations of enzymes." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 45: 1043-1057.
- Bader, N., Moller, U., Leiterer, M., Franke, K. und Jahreis, G. (2005). "Pilot study: tendency of increasing iodine content in human milk and cow's milk." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113: 8-12.
- Baloch, Z., Carayon, P., Conte-Devolx, B., Demers, L. M., Feldt-Rasmussen, U., Henry, J. F., LiVosli, V. A., Niccoli-Sire, P., John, R., Ruf, J., Smyth, P. P., Spencer, C. A., Stockigt, J. R. und Guidelines Committee, N. A. o. C. B. (2003). "Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease." *Thyroid* 13: 3-126.
- Bjoro, T., Holmen, J., Kruger, O., Midthjell, K., Hunstad, K., Schreiner, T., Sandnes, L. und Brochmann, H. (2000). "Prevalence of thyroid disease, thyroid dysfunction and thyroid peroxidase antibodies in a large, unselected population. The Health Study of Nord-Trondelag (HUNT)." *Eur J Endocrinol* 143: 639-647.
- Bland, M. (2000). *An introduction to medical statistics*, Oxford University Press.
- Bocchetta, A., Bernardi, F., Pedditzi, M., Loviselli, A., Velluzzi, F., Martino, E. und Del Zompo, M. (1991). "Thyroid abnormalities during lithium treatment." *Acta Psychiatr Scand* 83: 193-198.
- Bogazzi, F., Bartalena, L., Gasperi, M., Braverman, L. E. und Martino, E. (2001). "The various effects of amiodarone on thyroid function." *Thyroid* 11: 511-519.
- Box GEP, C. D. (1964). "An analysis of transformations." *J Roy Stat Soc, Series B* 26: 211-252.
- Brunn, J., Block, U., Ruf, G., Bos, I., Kunze, W. P. und Scriba, P. C. (1981). "[Volumetric analysis of thyroid lobes by real-time ultrasound (author's transl)]." *Dtsch Med Wochenschr* 106: 1338-1340.
- Corp., I. (2011). *IBM SPSS Statistics for Windows*. Armonk, NY: IBM Corp.

- Dietlein M, D. J., Grünwald F, Joseph K, Leisner B, Moser E, et.al. (2003). Schilddrüsendiagnostik. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin. AWMF online.
- Dixon, W. (1953). "Processing data for outliers." *Biometrics* 9: 74-89.
- Dybkaer, R. und Solberg, H. E. (1987). "Approved Recommendation (1987) on the Theory of Reference Values .6. Presentation of Observed Values Related to Reference Values." *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 25: 657-662.
- Fauci, A., Kasper, D., Longo, D., Braunwald, E., Hauser, S., Jameson, J. und Loscalzo, J. (2008). Chapter 335: Disorders of the Thyroid Gland. *Harrison's Principles Of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
- Fillee, C., Cumps, J. und Ketelslegers, J. M. (2012). "Comparison of three free T4 (FT4) and free T3 (FT3) immunoassays in healthy subjects and patients with thyroid diseases and severe non-thyroidal illnesses." *Clin Lab* 58: 725-736.
- Forster, R. J., Bertoncello, P. und Keyes, T. E. (2009). "Electrogenerated chemiluminescence." *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 2: 359-385.
- Geffre, A., Concordet, D., Braun, J. P. und Trumel, C. (2011). "Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel." *Vet Clin Pathol* 40: 107-112.
- Glinoer, D. (1997). "The Regulation of Thyroid Function in Pregnancy: Pathways of Endocrine Adaptation from Physiology to Pathology." *Endocrine Reviews* 18: 404-433.
- Gruning, T., Zophel, K., Wunderlich, G. und Franke, W. G. (2007). "Influence of female sex hormones on thyroid parameters determined in a thyroid screening." *Clin Lab* 53: 547-553.
- Haeckel, R., Wosniok, W. und Arzideh, F. (2007). "A plea for intra-laboratory reference limits. Part 1. General considerations and concepts for determination." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 45: 1033-1042.
- Hamilton, T. E., Davis, S., Onstad, L. und Kopecky, K. J. (2008). "Thyrotropin levels in a population with no clinical, autoantibody, or ultrasonographic evidence of thyroid disease: implications for the diagnosis of subclinical hypothyroidism." *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1224-1230.
- Hampel, R., Bennohr, G., Gordalla, A. und Below, H. (2010). "Urinary iodide excretion in adults in germany 2005 meets WHO target." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 118: 254-257.
- Harris EK, B. J. (1995). *Statistical Basis of Reference Values in Laboratory Medicine*. New York, Marcel Dekker.
- Hollowell, J. G., Staehling, N. W., Flanders, W. D., Hannon, W. H., Gunter, E. W., Spencer, C. A. und Braverman, L. E. (2002). "Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)." *J Clin Endocrinol Metab* 87: 489-499.
- Horn, P. S. und Pesce, A. J. (2003). "Reference intervals: an update." *Clinica Chimica Acta* 334: 5-23.
- Horowitz, G., Altaie, S., Boyd, J., Ceriotti, F., Garg, U., Horn, P., Pesce, A., Sine, H. und Zakowski, J. (2008). "Defining, Establishing, and Verifying Reference

- Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition CLSI Document C28-A3." Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Institute, C. a. L. S. (2008). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition.
- Klein, E., Scriba, P. C. und Pickardt, C. (1980). "Die blande Struma." New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Kratzsch, J., Fiedler, G. M., Leichtle, A., Brugel, M., Buchbinder, S., Otto, L., Sabri, O., Matthes, G. und Thiery, J. (2005). "New reference intervals for thyrotropin and thyroid hormones based on National Academy of Clinical Biochemistry criteria and regular ultrasonography of the thyroid." *Clin Chem* 51: 1480-1486.
- Kuwert, T., Bockisch, A. und Ell, P. J. (2008). *Nuklearmedizin : 143 Tabellen*. Stuttgart: Thieme.
- Mann, H. B. und Whitney, D. R. (1947). "On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other." *The annals of mathematical statistics*: 50-60.
- Manz, F., Bohmer, T., Gartner, R., Grossklaus, R., Klett, M. und Schneider, R. (2002). "Quantification of iodine supply: representative data on intake and urinary excretion of iodine from the German population in 1996." *Ann Nutr Metab* 46: 128-138.
- Meng, W. und Schmidt, K. J. (1992). *Schilddrüsenerkrankungen : Pathophysiologie - Diagnostik - Therapie*. Jena: Fischer.
- Parzen, E. (1962). "On estimation of a probability density function and mode." *The annals of mathematical statistics*: 1065-1076.
- Petitclerc, C. und Solberg, H. E. (1987). "Approved Recommendation (1987) on the Theory of Reference Values .2. Selection of Individuals for the Production of Reference Values." *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 25: 639-644.
- Rasmussen, L. B., Ovesen, L., Bülow, I., Jørgensen, T., Knudsen, N., Laurberg, P. und Perrild, H. (2002). "Relations between various measures of iodine intake and thyroid volume, thyroid nodularity, and serum thyroglobulin." *The American journal of clinical nutrition* 76: 1069-1076.
- Reiners, C., Wegscheider, K., Schicha, H., Theissen, P., Vaupel, R., Wrbitzky, R. und Schumm-Draeger, P. M. (2004). "Prevalence of thyroid disorders in the working population of Germany: ultrasonography screening in 96,278 unselected employees." *Thyroid* 14: 926-932.
- Roberts, R. C. und Nikolai, T. F. (1969). "Assay of thyroxine-binding globulin by polyacrylamide electrophoresis: normal values." *Clin Chem* 15: 367-375.
- Russell, W., Harrison, R. F., Smith, N., Darzy, K., Shalet, S., Weetman, A. P. und Ross, R. J. (2008). "Free triiodothyronine has a distinct circadian rhythm that is delayed but parallels thyrotropin levels." *J Clin Endocrinol Metab* 93: 2300-2306.
- Scobbo, R. R., VonDohlen, T. W., Hassan, M. und Islam, S. (2004). "Serum TSH variability in normal individuals: the influence of time of sample collection." *W V Med J* 100: 138-142.

- Shapiro, S. S. und Wilk, M. B. (1965). "An analysis of variance test for normality (complete samples)." *Biometrika* 52: 591-611.
- Solberg, H. E. (1987a). "Approved Recommendation (1986) on the Theory of Reference Values .1. The Concept of Reference Values." *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 25: 337-342.
- Solberg, H. E. (1987b). "Approved Recommendation (1987) on the Theory of Reference Values .5. Statistical Treatment of Collected Reference Values - Determination of Reference Limits." *Clinica Chimica Acta* 170: S13-S32.
- Solberg, H. E. (2004). "The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program." *Clin Chem Lab Med* 42: 710-714.
- Solberg, H. E. und Petitclerc, C. (1988). "Approved Recommendation (1988) on the Theory of Reference Values .3. Preparation of Individuals and Collection of Specimens for the Production of Reference Values." *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 26: 593-598.
- Solberg, H. E. und Stamm, D. (1991). "Approved Recommendation on the Theory of Reference Values .4. Control of Analytical Variation in the Production, Transfer and Application of Reference Values." *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 29: 531-535.
- Sonntag, O. (2003). "Is this normal? - This is normal." *J Lab Med* 8: 302-310.
- Spearman, C. (1904). "The proof and measurement of association between two things." *The American journal of psychology* 15: 72-101.
- Spencer, C. A., Takeuchi, M. und Kazarosyan, M. (1996). "Current status and performance goals for serum thyrotropin (TSH) assays." *Clin Chem* 42: 140-145.
- Surks, M. I. und Hollowell, J. G. (2007). "Age-specific distribution of serum thyrotropin and antithyroid antibodies in the US population: implications for the prevalence of subclinical hypothyroidism." *J Clin Endocrinol Metab* 92: 4575-4582.
- Toldy, E., Locsei, Z., Rigo, E., Kneffel, P., Szabolcs, I. und Kovacs, G. L. (2004). "Comparative analytical evaluation of thyroid hormone levels in pregnancy and in women taking oral contraceptives: a study from an iodine deficient area." *Gynecol Endocrinol* 18: 219-226.
- Völzke, H., Alte, D., Kohlmann, T., Ludemann, J., Nauck, M., John, U. und Meng, W. (2005). "Reference intervals of serum thyroid function tests in a previously iodine-deficient area." *Thyroid* 15: 279-285.
- Wilcoxon, F. (1945). "Individual comparisons by ranking methods." *Biometrics bulletin*: 80-83.
- World Medical Association General, A. (2004). "World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects." *J Int Bioethique* 15: 124-129.

Danksagung

Ich danke Herrn Dr.med. Andreas Bietenbeck für die freundliche Zurverfügungstellung der Patientendaten und ihrer entsprechenden Auswertung.

Ich danke Herrn Prof. Scheidhauer und Frau Dr. Claudia Castrop für die Zusammenarbeit.

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Luppä für die außerordentlich gute Betreuung und Zusammenarbeit!

Zuletzt ein großer Dank an meine Eltern für die immerwährende und selbstverständliche Unterstützung meines langen Ausbildungswegs.