

Validierung des Vidas® T4 Test, durchgeführt auf dem
miniVidas® Automated Analyser, für die Messung des Gesamt-
Thyroxins bei Hund und Katze

von Rouven Noel Anderson

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

Validierung des Vidas® T4 Test, durchgeführt auf dem
miniVidas® Automated Analyser, für die Messung des Gesamt-
Thyroxins bei Hund und Katze

von Rouven Noel Anderson

aus München

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Medizinische Kleintierklinik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Ralf Mueller

Mitbetreuung durch: Dr. med. vet. Astrid Wehner

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ralf Mueller

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Für Alex, Mareile und William

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Immuntechnologische Möglichkeiten zur Messung des Gesamt- Thyroxins	2
1.1.	Radio-Immunassay	2
1.1.1.	Autopak-System beim Hund	4
1.1.2.	Autopak-System bei der Katze	6
1.1.3.	Coat-A-Count® Total T4 beim Hund	6
1.1.4.	Coat-A-Count® Total T4 bei der Katze	9
1.1.5.	Coat-A-Count® Canine T4 beim Hund	10
1.1.6.	Coat-A-Count® Canine T4 bei der Katze	12
1.2.	Chemilumineszenz-Systeme	15
1.2.1.	Chemilumineszenz-Immunassay	16
1.2.1.1.	Chemilumineszenz-Immunassay bei Hund und Katze	17
1.2.2.	Chemilumineszenz-Enzym-Immunassay	18
1.2.2.1.	Chemilumineszenz-Enzym-Immunassay bei Hund und Katze	19
1.3.	Enzyme-linked immunosorbent assay	23
1.3.1.	Enzymun® T4	23
1.3.2.	SNAP® Total T4	28
1.3.2.1.	SNAP® Total T4 beim Hund	29
1.3.2.2.	SNAP® Total T4 bei der Katze	30
1.3.3.	SNAP® T4 Test	31
1.3.3.1.	SNAP® T4 Test beim Hund	32
1.3.3.2.	SNAP® T4 Test bei der Katze	33
1.3.4.	ST AIA-Pack® T4	34
1.3.4.1.	ST AIA-Pack® T4 beim Hund	35
1.3.4.2.	ST AIA-Pack® T4 bei der Katze	37
1.4.	Enzym-Immunassay	40
1.4.1.	CEDIA® Total T4 beim Hund	40
1.4.2.	CEDIA® Total T4 bei der Katze	43
1.4.3.	DRI® Thyroxine Assay bei der Katze	44
2.	Einsatz des miniVidas® Automated Analyzer in der Tiermedizin	48

2.1.	Progesteronbestimmung mittels Vidas® P4 bei Hunden.....	48
III.	PUBLIKATION	50
IV.	DISKUSSION	62
V.	ZUSAMMENFASSUNG	76
VI.	SUMMARY.....	78
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	80
VIII.	DANKSAGUNG	90

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
ANS	8-Anilino-naphthalin-1-Sulfonsäure
AP	Alkalische Phosphatase
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CEIA	chemiluminescence immunoassay (Chemilumineszenz-Immunoassay)
CIA/CLIA	chemiluminescence immunoassay (Chemilumineszenz-Immunoassay)
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute (Institut für Standards in der klinischen Labormedizin)
Corp.	Corporation (Form der Aktiengesellschaft in den Vereinigten Staaten von Amerika)
EIA	enzyme immunoassay (Enzym-Immunoassay)
ELFA	enzyme-linked fluorescence assay (Enzymgebundener Fluoreszenz-Assay)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Enzymgebundener Immunosorbent Assay)
et al.	et alii (und andere)
fT4	freies T4
g	Gewichtskraft
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
Inc.	Incorporated (Form der Aktiengesellschaft in den Vereinigten Staaten von Amerika)

IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Internationale Gesellschaft für klinische Chemie und Labormedizin)
IU	international units (Internationale Einheiten)
k.a.	keine Angabe
Ltd.	Limited (Aktiengesellschaft im englischen Sprachraum)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µg/dl	Mikrogramm pro Deziliter
µl	Mikroliter
n	Probenanzahl
nmol/l	Nanomol pro Liter
P4	Progesteron
r	Korrelationskoeffizient
®	registered trademark (registrierte Warenmarke)
RIA	radio immunoassay (Radio-Immunoassay)
s.o.	siehe oben
SD	standard deviation (Standardabweichung)
STARD	Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy
T3	Trijod-Thyronin
T4	Gesamt-Thyroxin
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TRH	Thyrotropin-Releasinghormon

TSH	Thyreoidea- stimulierendes Hormon
VK	Variationskoeffizient

I. EINLEITUNG

Der Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen kommt eine große Bedeutung in der Kleintiermedizin zu. Als erster diagnostischer Schritt hat sich in der Regel die Bestimmung des Gesamt-Thyroxins (T4) etabliert (CHASTAIN, 1982; PETERSON et al., 1983; FERGUSON, 1984; PETERSON, 1984). Es kann mit relativ einfachen Methoden aus einer Serumprobe bestimmt werden und kann erste Hinweise auf eine Störung des Hormonhaushaltes der Schilddrüse geben.

Die Hypothyreose ist eine häufige endokrinologische Störung beim Hund (NACHREINER und REFSAL, 1992; PETERSON et al., 1997; FERGUSON, 2007). Die Bestimmung des Gesamt-T4 wird meistens zum Ausschluss einer Hypothyreose oder zur Therapiekontrolle bei Substitution mit Schilddrüsenhormonen verwendet (NACHREINER und REFSAL, 1992; PETERSON et al., 1997; KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). In Fällen, in denen erniedrigte T4-Konzentrationen vorhanden sind, erfordert die Diagnose einer Hypothyreose jedoch die Bestimmung weiterer Hormone, wie das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH) oder das freie Thyroxin (fT4) (CHASTAIN, 1982; BEALE, 1990; KEMPPAINEN und BEHREND, 2001; FERGUSON, 2007).

Bei älteren Katzen stellt die Hyperthyreose eine sehr häufige Erkrankung dar. In der Regel reicht die Feststellung einer erhöhten T4-Konzentration zur Diagnose aus, wenn ein entsprechender klinischer Verdacht besteht (PETERSON et al., 1983; 1987; PETERSON, 2013). Bei Konzentrationen im oberen Referenzbereich müssen zur Diagnosestellung weitere Hormone wie das fT4 und das endogene TSH eingeleitet werden (GRAVES und PETERSON, 1994; PETERSON et al., 2015).

Ziel dieser Studie war es, einen enzyme-linked fluorescence assay (enzymgebundenen Fluoreszenz-Assay, ELFA) zur Bestimmung von caninem und felinem T4 als In-house-Methode prospektiv zu evaluieren. Die neue Methode wurde mit einem etablierten enzyme immunoassay (Enzym-Immunoassay, EIA) verglichen. Da bisher mehrere Methoden zur Messung von caninem und felinem T4 validiert wurden und es keinen Goldstandard gibt, wurden die Ergebnisse beider Nachweismethoden mit einer klinisch-labordiagnostischen Einschätzung überprüft. Zusätzlich wurden Referenzbereiche für die neue Methode etabliert.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Immunotechnologische Möglichkeiten zur Messung des Gesamt-Thyroxins

Die Immunoassay-Technik basiert auf dem Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Antikörper besitzen eine hohe Affinität zu spezifischen Antigenen und können mit ihren Bindungsstellen, den Paratopen, an die spezifischen Bindungsstellen der Antigene, den Epitopen, binden. Man unterscheidet dabei zwischen polyklonalen Antikörpern, die an mehreren verschiedenen Epitopen binden können und dadurch etwas unspezifischer sind, und monoklonalen Antikörpern, deren Paratope nur an ein einziges Epitop binden und dadurch hochspezifisch Bindungen eingehen. Dies kann man sich zu Nutzen machen, um entweder spezifische Antikörper oder eben die von ihnen gebundenen Antigene bspw. im Blut von Säugetieren nachzuweisen. Die Antikörper oder Antigene werden zu diesem Zweck markiert, um ihren Anteil an den Antigen-Antikörper-Komplexen zu bestimmen. Zur Markierung können radioaktive oder Chemilumineszenz-erzeugende Substanzen sowie Enzyme verwendet werden. Je nach verwendetem Marker wird das Immunoassay-System entsprechend benannt. Im Folgenden sollen die bisher kommerziell erhältlichen Immunoassay-Tests vorgestellt werden, die bei der Bestimmung des Gesamt-Thyroxins im Blut von Hunden und Katzen eingesetzt werden können und auf unterschiedlichen Immunoassay-Systemen basieren.

1.1. Radio-Immunassay

Der Radio-Immunassay (RIA) war einer der ersten Assays, der zur Bestimmung von Blutbestandteilen mit sehr niedriger Konzentration eingesetzt wurde (BERSON und YALOW, 1959; YALOW und BERSON, 1959; DODEIGNE et al., 2000). Yalow und Berson beschrieben erstmals die Nutzung eines mit radioaktivem Iod¹³¹ markierten Insulins zu Diagnosezwecken. Sie hatten herausgefunden, dass es eine starke Kreuz-Reaktivität zwischen humanem Insulin und aus Meerschweinchen gewonnenen Anti-Insulin-Antikörpern gab. Durch Zugabe von Anti-Insulin-Antikörpern und einer definierten Menge radioaktiv markierten Insulins zu einer Patientenprobe gelang es ihnen, die in der Patientenprobe vorhandene Insulinkonzentration zu quantifizieren (YALOW und BERSON, 1959;

LEQUIN, 2005). Die Nutzung radioaktiv markierter Antikörper zur Bestimmung von Insulin in humanen Serumproben wurde 1968 erstmals beschrieben (MILES und HALES, 1968; LEQUIN, 2005). Eine weitere Anwendungsmöglichkeit stellte die Messung von Schilddrüsenhormonen in der Human- und später auch in der Tiermedizin dar (KYZAR et al., 1972; ANDERSON und BROWN, 1979; BELSHAW, 1979; NESBITT et al., 1980; REIMERS et al., 1981). Es handelte sich hierbei um eine einfache sowie sensitive Methode (BELSHAW, 1979; SINGH et al., 1997; LURYE et al., 2002). Die Erforderlichkeit radioaktiver Isotope hat jedoch zur Folge, eine Genehmigung für deren Umgang, spezielle Lagerräume und Sicherheitsvorkehrungen besitzen zu müssen (SINGH et al., 1997; LURYE et al., 2002). Ebenfalls wird eine lückenlose Dokumentation über den Einsatz und den Verbleib der Isotope gefordert, was hohe Anwendungskosten mit sich bringt (SINGH et al., 1997; LURYE et al., 2002). Außerdem stehen bei der Verwendung radioaktiver Materialien mögliche Gesundheitsrisiken, Entsorgungsprobleme und auch die kurze Halbwertszeit der Isotope zur Diskussion (DODEIGNE et al., 2000; LEQUIN, 2005). Zu Beginn des Einsatzes der RIAs mussten die einzelnen Komponenten wie Pufferlösung, Antiserum, Standard- und Kontrollproben sowie T4-freies Plasma von den Laboren selber hergestellt werden (ANDERSON und BROWN, 1979; BELSHAW, 1979). Mit dem Aufkommen kommerziell erhältlicher Untersuchungs-Kits wurde die Handhabung des RIA deutlich erleichtert (REIMERS et al., 1981; KEMPPAINEN und SARTIN, 1984). Aufgrund sehr guter Werte von Präzision und Linearität wurde der RIA lange Zeit als Referenzmethode (KEMPPAINEN und SARTIN, 1984; ECKERSALL et al., 1991; PETERSON et al., 1994; 1997; SINGH et al., 1997; HORNEY et al., 1999; LURYE et al., 2002) oder gar als der Goldstandard für die T4-Bestimmung bezeichnet (GERBER et al., 1994; LURYE et al., 2002; PETERSON, 2006).

Ein RIA zur Messung von T4 basiert im Allgemeinen auf einem Festphasensystem mit Anti-T4-Antikörper-beschichteten Röhrchen. Mit radioaktivem Iod (zuerst ^{131}I , später das wesentlich weniger stark strahlende ^{125}I) markiertes T4 konkurriert während einer vorgegebenen Zeit bei Raumtemperatur (15 – 28°C) mit dem T4 im Patientenserum um die Bindungsstellen an den spezifischen Anti-T4-Antikörpern. Durch Zugabe von 8-Anilino-1-Naphthalin-Schwefelsäure (ANS) wird die Bindung des T4 an das Thyroxin-bindende Globulin (TBG) im Serum verhindert und steht somit zur Bindung an die spezifischen Antikörper zur Verfügung. Nach

dem Dekantieren der Röhren werden diese ausgespült und anschließend im Gammacounter für eine Minute gemessen. Zur Qualitätssicherung empfehlen die Hersteller, bei jedem Testansatz eine Reihe von Kalibrierungsröhren (bis zu sieben Stück) mit anzusetzen und auszumessen. In den Kalibrierungsröhren kommen Kalibrierungslösungen mit bekannter T4-Konzentration in aufsteigender Reihe zum Einsatz. Anhand der Counts der einzelnen Kalibrierungsröhren kann eine Standardkurve erstellt werden. Durch den Abgleich der Counts der Röhren mit Patientenserum mit der Standardkurve kann so die T4-Konzentration in der untersuchten Probe abgelesen werden. Dies erfolgte früher durch Erstellung der Standardkurve per Hand und heute durch ein Computerprogramm.

Bis in die späten 1990er Jahre wurden zur Überprüfung der Übereinstimmung zweier Messmethoden hauptsächlich die Parallelität der Inhibitionskurven von tierischem T4 und der Kurven von humanem T4 sowie der Korrelationskoeffizient ausgewertet (LARSSON und LUMSDEN, 1980; REIMERS et al., 1991; JENSEN et al., 1992; PETERSON et al., 1994; SINGH et al., 1997; HORNEY et al., 1999). Im Nachfolgenden sollen die erste tiermedizinische Validierungsstudie sowie die am häufigsten eingesetzten RIA-Systeme vorgestellt werden.

1.1.1. Autopak-System beim Hund

REIMERS und Mitarbeiter (1981) führten mit dem Autopak-System (Micromedic Systems, Horsham, Pennsylvania, Vereinigte Staaten von Amerika) die erste Studie für den Einsatz eines kommerziell erhältlichen RIA aus der Humanmedizin bei Tieren durch und beanspruchten den Status einer Validierungsstudie (REIMERS et al., 1981). Sie legten bereits großen Wert auf die Tatsache, dass ein Gerät für die Nutzung bei einer anderen Spezies für diese auch validiert werden sollte und führten an, dass einige Wissenschaftler dies nicht getan hätten und deren Ergebnisse daher nur experimenteller Natur seien (REIMERS et al., 1981).

Um die Sensitivität des Autopak-Systems zu steigern, passten sie das Testprotokoll an, indem sie die Humanstandards (sieben Stufen von 0 bis 32 µg/dl) und auch die zwei Qualitätssicherungs-Proben (Humanserum mit bekannten T4-Konzentrationen) jeweils im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnten. Jeweils 20 µl der Standards und der zu untersuchenden Probe wurden im Doppelansatz mit je 100 µl der radioaktiv markierten Reagenzlösung und 880 µl Puffer in die beschichteten Reagenzröhren gegeben und 1 Stunde (h) bei 37°C

inkubiert. Danach wurden die Röhren entleert und mit destilliertem Wasser ausgespült, um etwaige Reste der Reagenzflüssigkeit zu entfernen und die Röhren im Gammacounter messen zu können.

Die Anzahl der Tiere oder der untersuchten Serumproben in der Studie wurde nicht angegeben. Zur Bestimmung der Variationskoeffizienten (VK) wurden Serumpools mit niedrigen, normalen und hohen T4-Werten gebildet. Für die Bestimmung der Intra-Assay-Präzision wurden zehn Wiederholungsmessungen von Einzelproben im selben Ansatz herangezogen. Der genaue Zeitraum, über welchen diese zehn Messungen durchgeführt wurden, wird nicht angegeben. Die Ergebnisse lagen zwischen 4,0 und 16,4 %, wobei letzterer für den Serumpool mit niedrigen T4-Konzentrationen berechnet wurde. Für die Inter-Assay-Präzision wurden aus einer Probe 20 Aliquots gebildet und diese in jeweils einem neuen Ansatz gemessen. Der genaue Zeitraum, in welchem die Messungen durchgeführt wurden, wird ebenfalls nicht angegeben. Hier lagen die Ergebnisse zwischen 5,8 und 7,5 %. Die Wiederfindungsrate wurde bestimmt, indem zum 0-Standard jeweils verschiedene Mengen an T4 hinzugegeben und diese dann gemessen wurden. Nahezu 100 % der hinzugefügten Mengen an T4 konnten richtig gemessen werden, die untere Nachweisgrenze wurde mit 0,17 µg/dl berechnet. Zur Bestimmung der Spezifität wurden Inhibitionskurven erstellt, für welche sowohl die Standards und Qualitätssicherungsproben des Tests als auch Serumproben mit verschiedenen Mengen an T4 in absteigenden Verdünnungsstufen gemessen und die Ergebnisse grafisch miteinander verglichen wurden. Aus dem parallelen Verlauf dieser Kurven wurde abgeleitet, dass sowohl die in den Standards als auch die in den caninen Serumproben vorhandenen Bestandteile in gleichem Maße an die radioaktiv markierten Antikörper binden. Gleichzeitig bewiesen die Autoren somit, dass die Antikörper sowohl humanes als auch canines T4 binden. Zusätzlich wurde die Kreuzreaktivität zwischen T4 und strukturell ähnlichen Blutbestandteilen (inklusive Triiodthyronin, T3) untersucht, jedoch keine nennenswerte Kreuzreaktivität (< 0,1 %) festgestellt. Zur qualitativen Feststellung der Spezifität wurden zwölf Hunden jeweils 5 Internationale Einheiten (IU) TSH injiziert und vor sowie 4 h nach der Injektion Blut abgenommen. Bei allen Proben konnte ein Anstieg der T4-Konzentration nach TSH-Gabe gemessen werden.

Diese Ergebnisse veranlassten die Autoren, den RIA als valide für die Bestimmung von T4 in Hundeserum zu bezeichnen (REIMERS et al., 1981).

1.1.2. Autopak-System bei der Katze

Die feline Hyperthyreose ist eine sehr häufige Erkrankung vor allem älterer Katzen (GERBER et al., 1994; SHIEL und MOONEY, 2007), deren Prävalenz weiter ansteigt (RUTLAND et al., 2009; MCLEAN et al., 2014; KOHLER et al., 2016). Seit der Erstbeschreibung durch PETERSON und Mitarbeiter (1979) nahm das Interesse an der feline Hyperthyreose stetig zu und die erhältlichen Testsysteme wurden ebenfalls zur Bestimmung von feline T4 verwendet (REIMERS et al., 1981; PETERSON et al., 1983; KENNEDY und THODAY, 1984).

REIMERS und Mitarbeiter (1981) analysierten auch Katzenserum auf dem Autopak-System. Die genaue Anzahl der untersuchten Tiere wird, wie beim Hund, ebenfalls nicht angegeben. Der VK und die Wiederfindungsrate wurden nur für canines, nicht aber für felines T4 bestimmt. Die Bestimmung der Spezifität erfolgte durch die Erstellung von Inhibitionskurven, für welche sowohl die Standard- und Qualitätssicherungsproben des Tests als auch Serumproben mit verschiedenen T4-Konzentrationen in Verdünnungsstufen gemessen und die Ergebnisse grafisch aufgezeichnet wurden. Aus dem ebenfalls parallelen Verlauf dieser Kurven wurde abgeleitet, dass sowohl die in den Standards als auch die in den feline Serumproben vorhandenen Bestandteile in gleichem Maße an die radioaktiv markierten Antikörper binden. Gleichzeitig bewiesen die Autoren somit, dass die Antikörper neben humanem und caninem T4 ebenfalls felines T4 binden (REIMERS et al., 1981). Zur qualitativen Feststellung der Spezifität wurden sieben Katzen jeweils 3 IU TSH injiziert und vor sowie nach der Injektion Blut abgenommen. Bei allen Proben konnte, wie beim Hund, ein Anstieg der T4-Konzentration nach TSH-Gabe gemessen werden. Bei zwei Katzen wurde untersucht, wie sich eine Thyroidektomie auf die im Serum zu messende T4-Konzentration auswirkt. Dazu wurde den beiden Katzen vor sowie 30 Minuten (min), 60 min, 90 min, 120 min und 24 h nach dem Eingriff Blut abgenommen und jeweils die aktuelle T4-Konzentration bestimmt. Diese war nach 24 h bei beiden Katzen auf $< 0,5 \mu\text{g/dl}$ abgesunken (REIMERS et al., 1981).

Auch diese Ergebnisse veranlassten die Autoren, den RIA als valide für die Bestimmung von T4 in Katzenserum zu bezeichnen (REIMERS et al., 1981).

1.1.3. Coat-A-Count® Total T4 beim Hund

Der erste kommerziell erhältliche RIA-Untersuchungs-Kit zur T4-Bestimmung

stammte aus der Humanmedizin (Coat-A-Count® Total T4, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika). In diesem Kit wurden in zwei unbeschichteten Röhrchen (T-Röhrchen) die Gesamtcounts pro Minute des ^{125}I -markierten T4 gemessen, in weiteren beschichteten Röhrchen kamen Kalibrierungslösungen mit bekannter T4-Konzentration (in sechs Konzentrationsstufen von 0 bis 24 $\mu\text{g}/\text{dl}$) zum Einsatz. Für jeden Ansatz wurden pro Kalibrierungsröhrchen je 25 μl Kalibrierungslösung sowie je 1 ml der Lösung mit dem ^{125}I -markierten T4 benötigt. Eine Ausnahme bildeten die T-Röhrchen, welche ohne Kalibrierungslösung angesetzt wurden. Ebenfalls je 25 μl der zu untersuchenden Serumproben wurden in zusätzliche, antikörperbeschichtete Röhrchen pipettiert und nach Zugabe von 1 ml der Lösung mit dem ^{125}I -markierten T4 zusammen mit den Kalibrierungsröhrchen prozessiert. Im Anschluss wurde die Radioaktivität in allen Röhrchen gemessen. Mit Hilfe der Messwerte der T-Röhrchen und der Röhrchen mit Kalibrierungslösung konnte die Standardkurve erstellt werden. Der Zielbereich für diesen Test lag zwischen 4,5 und 12,5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ und damit eigentlich oberhalb des für den Hund interessanten Bereichs, der zwischen 0,8 und 4,5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ liegt. Dennoch wurde dieser Test bei diversen Studien beim Hund eingesetzt. Die erste Erwähnung dieses Tests in der Tiermedizin findet sich in einer Studie von KEMPPAINEN und SARTIN (1984). Sie bedienten sich, wie später auch die Autoren anderer Studien, dem Vergleichsprinzip von REIMERS und Mitarbeitern (1981), um dieses System zu validieren. KEMPPAINEN und SARTIN (1984) gaben die Intra-Assay-Präzision mit „ca. 5 %“ und die Inter-Assay-Präzision mit „ca. 10 %“ an. Die untere Nachweisgrenze wurde mit 1,9 nmol/l (0,14 $\mu\text{g}/\text{dl}$) berechnet. Die Inhibitionskurven mit absteigenden Konzentrationen wurden aus einem caninen Serumpool erstellt und die Steigung mit derjenigen, die für Inhibitionskurven aus der Standardlösung erstellt wurde, verglichen. Sie wurde als „ähnliche Kurve mit einem P-Wert von $> 0,05$ “ angegeben. Der Korrelationskoeffizient beider Kurven wurde mit $r = 0,99$ angegeben. Die Kreuzreaktivität blieb bei allen untersuchten Substanzen unter 2,5 % (KEMPPAINEN und SARTIN, 1984).

Basierend auf diesen Ergebnissen bezeichneten unter anderem KEMPPAINEN und SARTIN (1984), SINGH und Mitarbeiter (1997), HORNEY und Mitarbeiter (1999) und LYRIE und Mitarbeiter (2002) den Coat-A-Count® als „validierte Standardmethode“. Dies wurde auch von KEMPPAINEN und BIRCHFIELD

(2006) so angegeben. Sie untersuchten, ob es einen Unterschied in den Messergebnissen bei vier in der Tiermedizin eingesetzten T4-Messmethoden gibt (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Die neben dem Coat-A-Count® Total T4 eingesetzten Systeme waren der Coat-A-Count® Canine T4 (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika), der Immulite® Total T4 (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) sowie der Snap® T4 Test (Idexx Laboratories, Westbrook, Maine, Vereinigte Staaten von Amerika). KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) verwendeten Serumproben von 98 Hunden in ihrer Studie. Von den Hunden wurden 41 Tiere wegen des klinischen Verdachts einer Hypothyreose und 39 zur Kontrolle der Substitutionstherapie mit Thyroxin untersucht. Der Grund der Untersuchung der restlichen 18 Serumproben war unbekannt (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Die Serumproben waren zur Analyse auf dem Coat-A-Count® Total T4 an ein Labor verschickt worden.

Die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Methoden untereinander lagen zwischen 0,91 und 0,95 (Tabelle 1). Bei visueller Betrachtung der Regressionsgeraden wurde deutlich, dass bei niedrigen bis mittleren T4-Konzentrationen (bis etwa 4 µg/dl) eine gute Übereinstimmung aller vier Messmethoden vorlag, danach wichen die Messergebnisse allerdings stark voneinander ab (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Die Bland-Altman Plots verdeutlichten dies. Sie wurden angefertigt, indem die Differenz der Messwerte zweier Messmethoden auf die y-Achse und der Mittelwert der Messwerte auf die x-Achse aufgetragen wurden. Bei T4-Konzentrationen über 4 µg/dl lagen höhere Abweichungen zwischen allen Messergebnissen vor als darunter, und zwar um bis zu 3 µg/dl (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Das mittlere Bias lag für alle Messmethoden bei „etwa 0“. KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) hatten drei verschiedene Probenpools gebildet, diese umfassten eine nicht näher bezeichnete Anzahl an Proben mit niedrigen (0,8 – 1,5 µg/dl, Pool 1), normalen (2 – 4 µg/dl, Pool 2) und erhöhten (5 – 7 µg/dl, Pool 3) T4-Konzentrationen. Die Autoren gaben für den Coat-A-Count differenziertere VK an als KEMPPAINEN und SARTIN (1984), und zwar für die Intra-Assay-Präzision 13 % für Pool 1, 11 % für Pool 2 und 9 % für Pool 3, sowie Inter-Assay-Präzision von 21 %, 9 % und 7 % für die Pools 1,2 und 3 (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Vor allem die hohe Inter-Assay-

Präzision von 21 % fällt aus der Reihe, sie wurde jedoch von den Autoren nicht weiter kommentiert. Der Referenzbereich für den Coat-A-Count® Total T4 wurde vom Labor mit 1,3 – 4,0 µg/dl angegeben Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,25 µg/dl (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006).

1.1.4. Coat-A-Count® Total T4 bei der Katze

PETERSON und Mitarbeiter (1994) haben für ihre Untersuchung zum Einsatz des Thyrotropin-releasing Hormon (TRH) – Stimulationstests zur Diagnose einer „milden“ Hyperthyreose der Katze auf dem Coat-A-Count® Total T4 auch die Messung von humanem und felinem T4 verglichen. Sie berechneten mittels Regressionsanalyse einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,99$ (PETERSON et al., 1994). Zur Bestimmung von Intra- und Inter-Assay-Präzision für felines T4 wurden auch hier Poolproben mit nicht näher definierten „normalen bis leicht erhöhten T4-Konzentrationen“ eingesetzt, die Werte waren 8,3 % bzw. 8,4 %. Die untere Nachweisgrenze lag bei 2,5 nmol/l (0,19 µg/dl). Ebenfalls wurden Inhibitionskurven aus Verdünnungsreihen der Humanstandards und der feline Serumproben erstellt und der Verlauf dieser Kurven analysiert. Die Steigung der Linearitätsgeraden verlief für Katzenproben parallel zur Steigung der Standardkurve (PETERSON et al., 1994). Aufgrund der Werte für Präzision und Korrelationskoeffizient wurde der Coat-A-Count® Total T4 später als validiert für den Einsatz bei Katzen angesehen (PETERSON et al., 2001).

KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) untersuchten auch feline Serumproben in ihrer oben beschriebenen Studie. Es wurden Proben von 100 Katzen analysiert. Von den Katzen wurden 64 Tiere wegen des klinischen Verdachts auf das Vorliegen einer Hyperthyreose und 17 zur Kontrolle der Therapie mit Methimazol untersucht. Der Grund der Untersuchung der restlichen 19 Serumproben war unbekannt (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Die Serumproben waren zur Analyse auf dem Coat-A-Count® Total T4 ebenfalls an ein Labor verschickt worden.

Die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Methoden untereinander lagen zwischen 0,93 und 0,97 (Tabelle 1). Bei visueller Betrachtung der Regressionsgeraden wurde deutlich, dass bei niedrigen bis mittleren T4-Konzentrationen (bis etwa 4 µg/dl) eine gute Übereinstimmung aller vier Messmethoden vorlag, danach wichen die Messergebnisse allerdings ebenfalls

voneinander ab, wobei die Abweichungen geringer waren als beim Hund (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Die Bland-Altman Plots wurden angefertigt, indem die Differenz der Messwerte zweier Messmethoden auf die y-Achse und der Mittelwert der Messwerte auf die x-Achse aufgetragen wurden. Sie verdeutlichten, dass bei T4-Konzentrationen über 4 µg/dl höhere Abweichungen zwischen allen Messergebnissen vorlagen als darunter, und zwar um bis zu 3 µg/dl (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Das mittlere Bias lag für alle Messmethoden bei „etwa 0“ (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Der Referenzbereich wurde vom Labor mit 1,0 – 5,0 µg/dl für die Katze angegeben. Eigene Untersuchungen zum VK oder der unteren Nachweisgrenze wurden für die Katze nicht durchgeführt (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006).

1.1.5. Coat-A-Count® Canine T4 beim Hund

Da der Zielbereich des Coat-A-Count®, wie bereits erwähnt, mit 4,5 – 12,5 µg/dl oberhalb des für den Hund interessanten Bereichs von 0,8 – 4,5 µg/dl liegt, wurde später ein RIA speziell für den Hund entwickelt (Coat-A-Count® Canine T4, Diagnostic Products, Los Angeles, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) und verwendet (PETERSON et al., 1997; KANTROWITZ et al., 2001). Im Wesentlichen unterschied er sich durch die Anwendung eines anderen Konzentrationsbereiches, welcher sich in den Standards (sieben Konzentrationsstufen von 0 bis 15 µg/dl) wiederfand. Das restliche Testprotokoll wurde unverändert übernommen.

Der Hersteller gab für den Coat-A-Count® Canine T4 folgende Eigenschaften an: Messbereich 0,5 bis 15 µg/dl, Intra-Assay-Präzision von 3,1 % (bei median 3,2 µg/dl) bis 9,3 % (bei median 0,43 µg/dl). Für die Inter-Assay-Präzision wurde kein Wert angegeben. Die Wiederfindungsraten für Konzentrationen zwischen 1,4 – 5,4 µg/dl lagen bei 86 – 100 %. Die untere Nachweisgrenze wurde mit 0,22 µg/dl angegeben, Linearität war von 0,86 – 5,9 µg/dl gegeben. Bei einem vom Hersteller durchgeführten und in der Bedienungsanleitung angegebenen Vergleich des Coat-A-Count® Canine T4 mit dem Immulite® Canine T4 wurden Doppelmessungen von 46 caninen Serumproben mit T4-Konzentrationen zwischen 0,8 und 11,5 µg/dl auf beiden Testsystemen durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient wurde mit $r = 0,96$ angegeben, Bias-Plots wurden nicht angefertigt. Diese Daten sind nicht publiziert.

PETERSON und Mitarbeiter (1997) haben den Coat-A-Count® Canine T4 für ihre Studie eingesetzt. Ihre Studienpopulation bestand aus 258 Hunden, von denen 54 Hunde eine auf Basis von klinischen Symptomen, routinemäßig durchgeführten Laboruntersuchungen, TSH-Stimulationstests, Ausschluss von nicht-thyreoidalen Erkrankungen (non-thyroidal illness, NTI) und gutem Ansprechen auf Substitutionstherapie mit L-Thyroxin diagnostizierte Hypothyreose aufwiesen. Weitere 54 Hunde hatten eine Euthyreose, zeigten jedoch klinische Anzeichen, die auf eine Hypothyreose hätten hindeuten können. Die restlichen 150 Hunde wurden als klinisch normal beschrieben (PETERSON et al., 1997). Proben mit nicht näher definierten „hohen T4-Konzentrationen“ wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen analysiert und die dadurch erhaltenen Ergebnisse grafisch als Linearitätsgerade mit der Standardkurve verglichen. Da beide Kurven parallel zueinander verliefen, wurde die Linearität für den Coat-A-Count® Canine T4 bestätigt. Aus vier caninen Serumpools mit ebenfalls nicht näher definierten „niedrigen bis leicht erhöhten T4-Werten“ wurde durch jeweils sechs Wiederholungsmessungen die Intra-Assay-Präzision mit 8,0 % berechnet. Für die Inter-Assay-Präzision wurden Aliquots aus diesen vier Serumpools an vier aufeinander folgenden Tagen analysiert und ein Wert von 5,0 % berechnet. Aus den Proben der 150 unauffälligen Tiere wurde ein Referenzbereich für den Test berechnet, der mit 12 – 52 nmol/l (0,9 – 4,0 µg/dl) angegeben wurde. Die untere Nachweisgrenze gaben PETERSON und Mitarbeiter (1997) mit 2,5 nmol/l (0,19 µg/dl) an. Die Sensitivität eines erniedrigten T4-Wertes für eine Hypothyreose betrug 0,89, die Spezifität betrug 0,82. Die Richtigkeit definierten sie als Maß der Übereinstimmung der Messwerte mit dem klinischen Status der Tiere (hypothyreot oder euthyreot), sie betrug 0,85 (PETERSON et al., 1997).

KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) verwendeten den Coat-A-Count® Canine T4 ebenfalls in ihrer Studie wie in Kapitel 1.1.3. bereits beschrieben. Die Serumproben waren zur Analyse auf dem Coat-A-Count® Canine T4 an ein Labor verschickt worden.

Die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Methoden untereinander lagen zwischen 0,71 und 0,95 (Tabelle 1). Die Regressionsanalyse zeigte ebenfalls eine signifikante Korrelation aller Messwerte an, wobei bei der visuellen Evaluierung der Regressionsgeraden auffällt, dass vor allem oberhalb von 4 µg/dl deutliche Abweichungen zu beiden Seiten der Regressionsgeraden auftraten. Die visuelle

Auswertung der Bland-Altman Plots zeigt auch hier, dass das mediane Bias bei „ungefähr 0“ liegt und die Messwerte um bis zu 3 µg/dl voneinander abweichen (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Die aus den drei verschiedenen Probenpools bestimmten VK lauteten wie folgt: Intra-Assay-Präzision von 9 % für Pool 1 und von je 5 % für Pool 2 und 3, sowie Inter-Assay-Präzision von 10 % für Pool 1, 7 % für Pool 2 und 6 % für Pool 3 (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Für den Coat-A-Count® Canine T4 wurde vom Labor ein Referenzbereich von 1,6 – 4,3 µg/dl angegeben. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,15 µg/dl (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Auffällig war, dass der Coat-A-Count® Canine T4 stets signifikant ($P = 0,01$) niedrigere T4-Konzentrationen ermittelte als die anderen in der Studie eingesetzten Testsysteme (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Die Autoren führten dies auf den niedrigeren Referenzbereich des Tests und die Verwendung von Standardproben, die auf caninem anstelle von humanem Plasma basierten, zurück (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006).

1.1.6. Coat-A-Count® Canine T4 bei der Katze

KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) untersuchten auch feline Serumproben auf dem Coat-A-Count® Canine T4 in ihrer unter 1.1.4. beschriebenen Studie. Die Serumproben waren zur Analyse auf dem Coat-A-Count® Canine T4 an ein Labor verschickt worden.

Die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Methoden untereinander lagen zwischen 0,91 und 0,95 (Tabelle 1). Die Regressionsanalyse zeigte ebenfalls eine signifikante Korrelation aller Messwerte an. Bei der visuellen Evaluierung der Regressionsgeraden fällt auf, dass die Abweichungen der Messergebnisse der einzelnen Methoden untereinander wesentlich weniger stark ausgeprägt sind als beim Hund. Die visuelle Auswertung der Bland-Altman Plots zeigt jedoch, dass das mediane Bias ebenfalls bei „ungefähr 0“ liegt und die Messwerte um bis zu 3 µg/dl voneinander abweichen (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Das Labor gab für den Coat-A-Count® Canine T4 einen Referenzbereich von 1,0 – 3,9 µg/dl für die Katze an. Eigene Untersuchungen zum VK oder der unteren Nachweisgrenze wurden für die Katze nicht durchgeführt (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006).

Tabelle 1. Übersicht über die Validierungsstudien zur Bestimmung von T4 bei Hunden und Katzen mittels Radio-Immunoassay (RIA) (Corp. = Form der Aktiengesellschaft im englischen Sprachraum, et al. = et alii, k. A. = keine Angabe, klin. = klinischen, lt. = laut, µg/dl = Mikrogramm pro Deziliter, n = Patientenzahl, r = Korrelationskoeffizient, ® = Registrierte Handelsmarke, T3 = Trijod-Thyronin, T4 = Gesamt-Thyroxin, TSH = Thyreoidea-stimulierendes Hormon, VK = Variationskoeffizient)

Autor und Jahr	Testsystem (Handelsname und Hersteller), ggf. Analysegerät	Verwendete Vergleichsmethode	Fallzahlen nach Tierart n = Hund/Katze	Korrelationskoeffizient r = Hund/Katze	Intra-Assay-Präzision VK (%)	Inter-Assay-Präzision VK (%)	Untere Nachweisgrenze µg/dl	Referenzbereich des Tests µg/dl	Test als valide bezeichnet (Ja/Nein)	sonstige statistische Auswertungen
Reimers et al., 1981	Autopak (Micromedic Systems)	keine	k. A. n = 12/7 für Stimulations-test	k. A.	4,0 – 16,4	5,8 – 7,5	0,17	k. A.	Ja	Kreuzreaktivität: 100 % mit T4, < 0,1 % mit T3 Inhibitionskurven: parallel zu Standardkurven, Wiederfindungsrate: 100 %, T4-Wertänderung nach TSH-Stimulation: ja, T4-Wertänderung nach Thyreoidektomie: ja
Kempainen & Sartin, 1984	Coat-a-Count® Total T4 (Diagnostic Products Corp.)	keine	k. A.	Korrelation der Inhibitionskurven r = 0,99	ca. 5	ca. 10	0,14	k. A.	Ja	Kreuzreaktivität: < 2,5 % für alle getesteten Substanzen, Inhibitionskurven: parallel zu Standardkurven
Peterson et al., 1994	Coat-a-Count® Total T4 (Diagnostic Products Corp.)	keine	n = 0/1138	Korrelation zu Standardproben aus Humanmedizin r = 0,99	8,3	8,4	0,19	k. A.	Ja	Inhibitionskurven: parallel zu Standardkurven
Peterson et al., 1997	Coat-a-Count® Canine T4 (Diagnostic Products Corp.)	keine	n = 258/0	k. A.	8	5	0,19	0,9 – 4,0	Ja	Inhibitionskurven: parallel zu Standardkurven, Übereinstimmung Messwert mit klin. Status des Tieres: 85 %

Autor und Jahr	Testsystem (Handelsname und Hersteller), ggf. Analysegerät	Verwendete Vergleichsmethode	Fallzahlen nach Tierart n = Hund/Katze	Korrelationskoeffizient r = Hund/Katze	Intra-Assay-Präzision VK (%)	Inter-Assay-Präzision VK (%)	Untere Nachweisgrenze µg/dl	Referenzbereich des Tests µg/dl	Test als valide bezeichnet (Ja/Nein)	sonstige statistische Auswertungen
Kemppainen & Birchfield, 2006	Coat-a-Count® Total T4 (Diagnostic Products Corp.)	RIA, CEIA, ELISA	n = 98/100	r = 0,95/0,93 (RIA Canine T4) r = 0,91/0,94 (ELISA) r = 0,91/0,97 (CEIA)	Nur Hund 13 (< 1,5 µg/dl) 11 (2 – 4 µg/dl) 9 (> 5 µg/dl)	Nur Hund 21 (< 1,5 µg/dl) 9 (2 – 4 µg/dl) 7 (> 5 µg/dl)	0,25	lt. Labor: 1,3 – 4,0 (Hund) 1,0 – 5,0 (Katze)	Ja	Regressionsanalyse: gute Korrelation der Messwerte aller Methoden, Bland-Altman Plots: Bias ~ 0, Abweichung bis zu ± 3 µg/dl
Kemppainen & Birchfield, 2006	Coat-a-Count® Canine T4 (Diagnostic Products Corp.)	RIA, CEIA, ELISA	n = 98/100	r = 0,87/0,95 (ELISA) r = 0,95/0,93 (RIA Total T4) r = 0,71/0,91 (CEIA)	Nur Hund 9 (< 1,5 µg/dl) 5 (2 – 4 µg/dl) 5 (> 5 µg/dl)	Nur Hund 10 (< 1,5 µg/dl) 7 (2 – 4 µg/dl) 6 (> 5 µg/dl)	0,15	lt. Labor: 1,6 – 4,3 (Hund) 1,0 – 3,9 (Katze)	Ja	Regressionsanalyse: gute Korrelation der Messwerte aller Methoden, Bland-Altman Plots: Bias ~ 0, Abweichung bis zu ± 3 µg/dl

1.2. Chemilumineszenz-Systeme

Mit der Validierung von Chemilumineszenz-Immunoassays (CIA, heute CLIA) und Chemilumineszenz-Enzym-Immunoassays (CEIA) für den Einsatz bei Tieren sollte neben dem RIA eine weitere Methode zur Messung von T4 für Tierärzte zur Verfügung stehen (SINGH et al., 1997). Unter Lumineszenz versteht man die Emission von Licht, die dadurch entsteht, dass ein Elektron eines Moleküls zuerst durch Anregung von seinem Grund-Energiestatus in einen höheren Energie-Status versetzt wurde und es bei der Rückkehr in seinen Grund-Energiestatus Energie als Photon abgibt. Bei der Chemilumineszenz wird die Energie zur Anregung des Elektrons durch eine chemische Reaktion erzeugt (KRICKA, 1991; DODEIGNE et al., 2000). Zu den Vorteilen der Chemilumineszenz gehört, dass die Photonenemission sehr lange linear verläuft und sehr schnell auftreten kann (bis hin zu einem reinen Aufblitzen), dass die Reagenzien sehr lang stabil bleiben und nur eine sehr kurze Inkubationszeit benötigen, bis sie zur Chemilumineszenz angeregt werden (RONGEN et al., 1994; DODEIGNE et al., 2000).

Die Geräte, auf welchen die Tests durchgeführt werden, arbeiten ohne Radioaktivität, wodurch ihr Einsatz mit weniger bürokratischem Aufwand verbunden und ein automatisierter Testablauf möglich ist (BABSON et al., 1991; DODEIGNE et al., 2000; KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Allerdings sind sie relativ teuer in Anschaffung und Unterhalt und müssen daher stark ausgelastet sein, um wirtschaftlich sinnvoll genutzt zu werden (HIGGS et al., 2014). Außerdem sind sie technisch anspruchsvoll (HIGGS et al., 2014).

Bereits 1877 hatte RADZISZEWSKI (1877) das Auftreten von künstlich erzeugter Chemilumineszenz bei einer chemischen Reaktion beschrieben. Fünfzig Jahre später beschrieb ALBRECHT (1928) das Luminol (3-Aminophthalsäurehydrazid), eine gelblich bis grün schimmernde, feste chemische Verbindung. In protischen Lösungen wie bspw. Wasser, wässrigen Lösungen oder niederen Alkoholen wurde ein Katalysator für die Oxidation des Luminols benötigt (ROSWELL und WHITE, 1978). Dies konnte bspw. die Meerrettich-Peroxidase, Katalase, Alkalische Phosphatase oder β -D-Galaktosidase sein (ROSWELL und WHITE, 1978; SCHROEDER und YEAGER, 1978; RONGEN et al., 1994; DODEIGNE et al., 2000). Weitere chemilumineszenz-fähige Substanzen, die für Immunassays eingesetzt wurden, waren Derivate von Acridinium und Dioxetan (GLEU und

PETSCH, 1935; MCCAPRA und RICHARDSON, 1964; KOPECKY und MUMFORD, 1969; RONGEN et al., 1994; DODEIGNE et al., 2000). Der große Vorteil der Acridinium-Ester war, dass sie keinen Katalysator für die chemische Reaktion benötigten und bei der Konjugation mit organischen Molekülen, wie bspw. Antikörpern, an einer exponierten Stelle ansetzten, sodass die emittierten Photonen ungehindert detektiert werden können (DUDLEY, 1990). Dadurch erhoffte man sich eine höhere Sensitivität als beim RIA, da auch kleinere Konzentrationen der zu suchenden Substanz ausreichend Signale aussendeten, die von den Detektorsystemen erkannt werden konnten (EKINS et al., 1989; DUDLEY, 1990).

1.2.1. Chemilumineszenz-Immunassay

Die erste Untersuchung eines Chemilumineszenz-Immunassays (CLIA) zur Anwendung in der Tiermedizin stammt von SINGH und Mitarbeitern (1997). Der untersuchte CLIA (Total T4 Test, Nichols Analytical Institute Corp., San Juan Capistrano, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika; heute Centaur® T4, Siemens Medical Solutions USA Inc., Malvern, Pennsylvania, Vereinigte Staaten von Amerika) war für die Humanmedizin entworfen worden. Zur Testdurchführung wurde ein modulares System, bestehend aus einem mechanischen Schüttler/Schwenker, einer Waschvorrichtung für die Proben und einem Photometer, verwendet. Die Testkits bestanden aus einem unbeschichteten 12 x 75 mm großen Glasröhrchen und einer antikörperbeschichteten Kunststoffperle als Festphasen-Immunassay. Als Substrat wurde ein Acridinium-Ester verwendet, dessen Hydrolyse einen Lichtblitz erzeugte (SINGH et al., 1997). Fünfundzwanzig Mikroliter der Serumprobe wurden in das Glasröhrchen pipettiert und jeweils eine Kunststoffperle hinzugegeben. Die Proben wurden dann bei Raumtemperatur für 60 min geschüttelt/geschwenkt und im Anschluss mit 1 ml einer Waschlösung versetzt. Die Proben wurden 4 – 5mal mit Wasser gewaschen, um ungebundenes Substrat zu entfernen. Danach wurden die Röhrchen im Photometer ausgemessen. Die Intensität des Lichtblitzes war dabei indirekt proportional zur Hormonkonzentration. Anhand einer Standardkurve, die mittels der mitgelieferten Humanstandards erstellt worden war, wurde die in der Probe enthaltene Hormonkonzentration abgelesen (SINGH et al., 1997).

1.2.1.1. Chemilumineszenz-Immunassay bei Hund und Katze

SINGH und Mitarbeiter (1997) verwendeten den oben beschriebenen CLIA, um damit T4 in Serumproben von Hunden und Katzen zu messen. Ein in Kapitel 1.1. beschriebener RIA (Coat-A-Count® Total T4) diene als Referenzmethode. Für die Studie waren von 40 Versuchshunden sowie von 278 Hunden mit Verdacht auf eine Schilddrüsen- oder Nebennierenerkrankung Blutproben entnommen und zur T4- oder Kortisolbestimmung verschickt worden. Ebenfalls waren von zwölf Versuchskatzen und 150 Katzen mit Verdacht auf eine Schilddrüsen- oder Nebennierenerkrankung Blutproben entnommen und zur T4- oder Kortisolbestimmung verschickt worden. Die genaue Anzahl der T4-Bestimmungen aus diesen Proben wurde in der Studie nicht angegeben. Zuerst wurden die Proben mittels RIA analysiert und danach bei -70°C bis zur Analyse mittels CLIA gelagert (SINGH et al., 1997). Die Kalibrierungskurve wurde mit Humanstandards, die dem Test beilagen, erstellt. Der Korrelationskoeffizient zwischen RIA und CLIA wurde für Hunde und Katzen mit $r = 0,88$ angegeben, dabei handelte es sich vermutlich um eine Mischkalkulation. Die Steigung der Regressionsgeraden von RIA und CLIA betrug 0,63. Damit wurde schon deutlich, dass der CLIA im Vergleich zum RIA niedrigere T4-Ergebnisse in Serumproben von Tieren erzielte (SINGH et al., 1997). Die Regressionsanalyse gefolgt vom Kolmogorov-Smirnov Test zeigte, dass 95 % der Hundeproben und 85 % der Katzenproben Ergebnisse im Bereich von $0 - 2 \mu\text{g/dl}$ aufwiesen, wenn sie mittels CLIA analysiert wurden; hingegen lagen bei Analyse mittels RIA nur 30 – 40 % aller Ergebnisse in diesem Bereich, die anderen Werte waren signifikant ($P < 0,05$) höher und lagen zwischen $1 - 4 \mu\text{g/dl}$ (SINGH et al., 1997). Zur Bestimmung von Intra- und Inter-Assay-Präzision wurden je ein Probenset mit nicht näher definierter T4-Konzentration fünfmal am selben Tag und an 20 aufeinander folgenden Tagen je einmal analysiert. Der CLIA erreichte dabei Werte für Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision von $> 30 \%$ bei Konzentrationen bis zu $0,25 \mu\text{g/dl}$ und $< 20 \%$ bei Konzentrationen zwischen $0,5$ und $25 \mu\text{g/dl}$. Bei der Katze ergaben Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision $> 30 \%$ für Konzentrationen bis $0,5 \mu\text{g/dl}$ und $< 20 \%$ für Konzentrationen über $2,0 \mu\text{g/dl}$ (SINGH et al., 1997). Um die Wiederfindungsrate und Linearität des Tests zu untersuchen, wurde T4-freies Serum von Menschen und Tieren mit einer speziellen T4-Lösung (Sigma Chemical Company, St. Louis, Montana, Vereinigte Staaten von Amerika) versetzt („gespiked“) und dann in neun verschiedene Konzentrationsstufen von $0,25 - 25 \mu\text{g/dl}$ verdünnt. Die verschiedenen Konzentrate

wurden mittels CLIA analysiert und die ermittelte T4-Konzentration mit der berechneten T4-Konzentration verglichen. In humanem Serum konnten über 90 % des hinzugefügten T4 gemessen werden, im Serum von Tieren jedoch nur 60 %. Für beide Serumtypen war Linearität zwischen 0,25 und 25 µg/dl gegeben. SINGH und Mitarbeiter (1997) vermuteten, dass die Anti-T4-Antikörper, die im CLIA verwendet wurden, eine wesentlich höhere Affinität zu humanem T4 als zu T4 von Tieren hatten und die schlechten Werte für Korrelation, Regression und Wiederfindungsrate damit erklärbar seien.

Bei einem nachfolgenden TSH-Stimulationstest wurde fünf Hunden je nach Körpergewicht 1 – 2 IU TSH injiziert und vor sowie sechs Stunden nach der Injektion Blut abgenommen, um einen Anstieg der endogenen T4-Konzentration feststellen zu können. Bei allen Hunden konnte mittels CLIA eine signifikante ($P < 0,05$) Erhöhung der gemessenen T4-Konzentration nach Stimulation festgestellt werden, jedoch waren diese T4-Konzentrationen signifikant ($P < 0,05$) niedriger als die mittels RIA bestimmten Ergebnisse nach Stimulation (SINGH et al., 1997).

Bei einem ebenfalls nachfolgenden T3-Suppressionstest wurden zehn Katzen jeweils 25 µg T3 injiziert und erneut Blut abgenommen, um einen Abfall des endogenen T4 bestimmen zu können. Der genaue Zeitpunkt der erneuten Blutentnahme wurde nicht angegeben. Im T3-Suppressionstest konnte mittels CLIA eine signifikante ($P < 0,05$) Erniedrigung der gemessenen T4-Konzentration nach Suppression festgestellt werden, jedoch waren diese T4-Konzentrationen ebenfalls signifikant ($P < 0,05$) niedriger als die mittels RIA bestimmten Ergebnisse nach Suppression (SINGH et al., 1997).

Die Autoren gaben zusammenfassend an, dass mittels CLIA signifikant niedrigere Ergebnisse erzielt werden als bei Analyse mittels RIA, vor allem bei niedrigen Werten bis 0,5 µg/dl. Jedoch trafen sie keine finale Einschätzung, ob der CLIA für die Bestimmung von caninem und feline T4 geeignet ist (SINGH et al., 1997).

1.2.2. Chemilumineszenz-Enzym-Immunoassay

SINGH und Mitarbeiter (1997) verwendeten auch einen Chemilumineszenz-Enzym-Immunoassay (CEIA) in ihrer Studie. Es handelte sich dabei um den Immulite® Total T4 (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Vereinigte Staaten von Amerika; heute Siemens Medical Solutions USA Inc., Malvern, Pennsylvania,

Vereinigte Staaten von Amerika). Ein wesentlicher Unterschied war, dass die chemische Reaktion, wie oben beschrieben, durch ein Enzym katalysiert werden muss. Bei dem verwendeten CEIA war es die Alkalische Phosphatase (AP) (BABSON et al., 1991; SINGH et al., 1997). Das Analysegerät (Immulate® Analyser, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Vereinigte Staaten von Amerika; heute Siemens Medical Solutions USA Inc., Malvern, Pennsylvania, Vereinigte Staaten von Amerika) umfasste einen Probenteller, auf welchem bis zu 12 Proben gleichzeitig bearbeitet werden konnten, ein Pipettiersystem, eine Wasch- und Trennstation und ein Photomultiplier (Photoelektronenvervielfacher). Dadurch konnte der gesamte Untersuchungsprozess automatisch ablaufen (BABSON et al., 1991).

Wie beim CLIA kamen auch hier ein Reagenzröhrchen (allerdings aus Plastik) sowie eine antikörperbeschichtete Styroporperle zum Einsatz. Im Reagenzröhrchen fanden alle Reaktionsschritte von der Inkubation der Serumprobe über die Waschschriffe bis hin zur Ausmessung der Lichtemission statt. Zunächst wurden die Serumprobe und das mit AP markierte Reagens in das Reagenzröhrchen pipettiert, in welchem sich bereits die Styroporperle befand. Auf dem Probenteller fand dann die Inkubation über 60 min bei 37°C statt. Anschließend wurde das Reagenzröhrchen zur Wasch- und Schleuderstation befördert und die Waschlösung hinzugefügt. Zur Separierung wurde das Reagenzröhrchen bei hoher Geschwindigkeit um die eigene Längsachse rotiert. Durch die leicht konische Konstruktion des Röhrchens lief sämtliche überschüssige Flüssigkeit zu einem speziellen Kompartiment des Reagenzröhrchens ab, wurde dort aufgefangen und konnte nicht zu der Styroporperle zurückfließen. Nun wurde das Substrat (Adamantyl-Dioxetan-Phosphat-Ester) hinzugefügt und das Reagenzröhrchen weitere 10 min bei 37°C inkubiert, bis die maximale Photonenemission erreicht war. Mittels Photomultiplier wurde die Intensität der Emission gemessen und anhand einer gespeicherten Standardkurve die T4-Konzentration in der Probe berechnet (BABSON et al., 1991).

1.2.2.1. Chemilumineszenz-Enzym-Immunoassay bei Hund und Katze

SINGH und Mitarbeiter (1997) verwendeten in ihrer Studie ebenfalls den oben beschriebenen CEIA, um damit T4 in Serumproben von Hunden und Katzen zu messen. Studienprotokoll und Studienpopulation waren identisch mit dem Aufbau für die Untersuchung des CLIA für canine und feline Serumproben (s.o.). Die

genaue Anzahl der T4-Bestimmungen aus den genannten Proben wurde auch für den CEIA nicht angegeben. Da sich die Untersuchung des CEIA zeitlich versetzt an die Untersuchung des CLIA anschloss, waren alle Serumproben nach Untersuchung mit dem CLIA erneut bei -70°C bis zur Analyse mittels CEIA gelagert worden (SINGH et al., 1997). Sie hatten somit bis zur Analyse auf dem CEIA zwei Zyklen von Einfrieren und Auftauen durchlaufen (SINGH et al., 1997). Da die Proben beide Male mittels RIA analysiert wurden und sich Werte der beiden Messungen nicht signifikant voneinander unterschieden, nahm man an, dass die Lagerung bei -70°C und auch zwei Zyklen von Einfrieren und Auftauen die T4-Konzentrationen von Mensch und Tier nicht beeinflussen (SINGH et al., 1997). Die Kalibrierungskurve wurde ebenfalls mit dem Test beiliegenden Humanstandards erstellt. Der Korrelationskoeffizient zwischen RIA und CEIA wurde mit $r = 0,95$ angegeben, auch hier handelte es sich vermutlich um eine Mischkalkulation. Die Steigung der Regressionsgeraden von RIA und CEIA betrug $0,97$. Diese Ergebnisse waren deutlich besser als die des CLIA (SINGH et al., 1997). Die Regressionsanalyse gefolgt vom Kolmogorov-Smirnov Test zeigte, dass bei Messung mittels RIA und CEIA jeweils 95 % der Hunde- und Katzenproben Ergebnisse im Bereich von $1 - 4 \mu\text{g/dl}$ aufwiesen (SINGH et al., 1997). Zur Bestimmung von Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision des CEIA wurde je ein Probenset mit nicht näher definierter T4-Konzentration fünfmal am selben Tag und an 20 aufeinander folgenden Tagen je einmal gemessen. Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision lagen über 20 % bei niedrigen Konzentrationen von $0,25 \mu\text{g/dl}$ und ≤ 20 % bei Konzentrationen von $0,5 - 25 \mu\text{g/dl}$ für canine und feline Proben, auch hier muss man von einer Mischkalkulation ausgehen (SINGH et al., 1997). Um die Wiederfindungsrate und Linearität des CEIA zu untersuchen, wurde ebenfalls das gespikete Serum in den neun Konzentrationsstufen von $0,25 - 25 \mu\text{g/dl}$ verwendet. Sowohl in humanem Serum als auch im Serum von Tieren konnten über 90 % des hinzugefügten T4 gemessen werden und für beide Serumentypen war Linearität zwischen $0,25$ und $25 \mu\text{g/dl}$ gegeben (SINGH et al., 1997).

Die bereits gewonnenen Blutproben des nachfolgenden, oben beschriebenen TSH-Stimulationstests wurden auch mittels CEIA analysiert. Bei allen Hunden konnte mittels CEIA eine signifikante ($P < 0,05$) Erhöhung der gemessenen T4-Konzentration nach Stimulation festgestellt werden, die sich nicht signifikant von den mittels RIA bestimmten T4-Konzentration nach Stimulation unterschieden

(SINGH et al., 1997).

Auch die bereits gewonnenen Blutproben des nachfolgenden, oben beschriebenen T3-Suppressionstests wurden ebenfalls mittels CEIA analysiert. Bei allen Katzen konnte mittels CEIA eine signifikante ($P < 0,05$) Erniedrigung der gemessenen T4-Konzentration nach Suppression festgestellt werden, die sich nicht signifikant von den Ergebnissen des RIA unterschieden (SINGH et al., 1997).

Die Autoren gaben zusammenfassend an, dass die Ergebnisse des CEIA mit denen des bereits validierten RIA vergleichbar waren und der CEIA damit valide für die Bestimmung von caninem und feline T4 sei (SINGH et al., 1997).

In der Studie von KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) wurde der CEIA ebenfalls verwendet, das Studiendesign wurde in Kapitel 1.1.3. (Hund) und 1.1.4. (Katze) bereits beschrieben. Die Serumproben waren zur Analyse auf dem Immulite® Total T4 an ein Labor verschickt worden.

Die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Methoden untereinander lagen zwischen 0,64 und 0,91 beim Hund sowie zwischen 0,91 und 0,97 bei der Katze (Tabelle 2). Bei visueller Betrachtung der Regressionsgeraden wurde deutlich, dass bis etwa 4 µg/dl eine gute Übereinstimmung aller vier Messmethoden vorlag. Danach wichen die Messergebnisse allerdings stark voneinander ab (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Dies war bei der Katze nicht so stark ausgeprägt wie beim Hund. Die Bland-Altman Plots wurden angefertigt, indem die Differenz der Messwerte zweier Messmethoden auf die y-Achse und der Mittelwert der Messwerte auf die x-Achse aufgetragen wurden. Sie verdeutlichten, dass für beide Spezies bei T4-Konzentrationen über 4 µg/dl Abweichungen von bis zu 3 µg/dl zwischen allen Messergebnissen vorlagen (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Das mittlere Bias lag bei „etwa 0“ (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Die aus den drei verschiedenen Probenpools bestimmten VK lauteten für den Hund wie folgt: Intra-Assay-Präzision von 8 % für Pool 1 und 2, 5 % für Pool 3, sowie Inter-Assay-Präzision von 9 % für Pool 1 und jeweils 6 % für Pool 2 und 3 (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Eigene Untersuchungen zum VK oder der unteren Nachweisgrenze wurden für die Katze nicht durchgeführt (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Der Referenzbereich wurde vom Labor mit 1,6 – 5,0 µg/dl für Hunde und mit 0,7 – 5,2 µg/dl für Katzen angegeben (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006).

Tabelle 2. Übersicht über die Validierungsstudien zur Bestimmung von T4 bei Hunden und Katzen mittels Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) und Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay (CEIA) (Corp. = Form der Aktiengesellschaft im englischen Sprachraum, et al. = et alii, k. A. = keine Angabe, lt. = laut, µg/dl = Mikrogramm pro Deziliter, n = Patientenzahl, r = Korrelationskoeffizient, ® = Registrierte Handelsmarke, T3 = Trijod-Thyronin, T4 = Gesamt-Thyroxin, TSH = Thyreoidea-stimulierendes Hormon, VK = Variationskoeffizient)

Autor und Jahr	Testsystem (Handelsname und Hersteller), ggf. Analysegerät	Verwendete Vergleichsmethode	Fallzahlen nach Tierart n = Hund/Katze	Korrelationskoeffizient r = Hund/Katze	Intra-Assay-Präzision VK (%)	Inter-Assay-Präzision VK (%)	Untere Nachweisgrenze µg/dl	Referenzbereich des Tests µg/dl	Test als valide bezeichnet (Ja/Nein)	sonstige statistische Auswertungen
Singh et al., 1997	Total T4 Test (Nichols Analytical Institute Corp.)	RIA	318/162	r = 0,88 (Mischkalkulation)	> 30 (< 0,25 µg/dl) < 20 (0,5 – 25 µg/dl)	> 30 (< 0,25 µg/dl) < 20 (0,5 – 25 µg/dl)	k. A.	k. A.	k. A.	Inhibitionskurven: parallel zu Standardkurven, Wiederfindungsrate: 60 %, T4-Wertänderung nach TSH-Stimulation: ja, T4-Wertänderung nach T3-Suppression: ja
Singh et al., 1997	Immulin® Total T4 (Diagnostic Products Corp.) Immulin® Analyzer (Diagnostic Products Corp.)	RIA	318/162	r = 0,95 (Mischkalkulation)	> 20 (< 0,25 µg/dl) ≤ 20 (0,5 – 25 µg/dl)	> 20 (< 0,25 µg/dl) ≤ 20 (0,5 – 25 µg/dl)	k. A.	k. A.	Ja	Inhibitionskurven: parallel zu Standardkurven, Wiederfindungsrate: 90 %, T4-Wertänderung nach TSH-Stimulation: ja, T4-Wertänderung nach T3-Suppression: ja
Kemppainen & Birchfield, 2006	Immulin® Total T4 (Diagnostic Products Corp.) Immulin® Analyzer (Diagnostic Products Corp.)	RIA, ELISA	n = 98/100	r = 0,64/0,91 (ELISA) r = 0,91/0,97 (RIA Total T4) r = 0,71/0,91 (RIA Canine T4)	Nur Hund 8 (< 1,5 µg/dl) 8 (2 – 4 µg/dl) 5 (> 5 µg/dl)	Nur Hund 9 (< 1,5 µg/dl) 6 (2 – 4 µg/dl) 6 (> 5 µg/dl)	0,15	lt. Labor: 1,6 – 5,0 (Hund) 0,7 – 5,2 (Katze)	Ja	Regressionsanalyse: gute Korrelation der Messwerte aller Methoden, Bland-Altman Plots: Bias ~ 0, Abweichung bis zu ± 3 µg/dl

1.3. Enzyme-linked immunosorbent assay

Bereits 1979 wurden erste Anstrengungen unternommen, die damals noch sehr neue Technik des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) für die Schilddrüsendiagnostik in der Tiermedizin einzusetzen (LARSSON und LUMSDEN, 1980). Im Laufe der Zeit wurden vor allem kleinere Geräte zur In-house Diagnostik auf Basis eines ELISA entwickelt und deren Abschneiden in der Tiermedizin in verschiedenen Studien untersucht (JENSEN et al., 1992; LURYE et al., 2002; HIGGS et al., 2014). Die Ergebnisse der Studien fallen allerdings sehr unterschiedlich aus.

Ein ELISA besteht im Allgemeinen aus einer Festphase, an welche der sich in der zu untersuchenden Probe befindliche Analyt gebunden wird. Dies geschieht entweder unspezifisch durch Adsorption auf die Festphase, oder spezifisch durch auf die Festphase aufgebrauchte monoklonale Antikörper. Nach einer vorgegebenen Inkubationszeit wird die Probe mittels eines Waschschriffs wieder entfernt und danach die Menge an Analyt bestimmt, die an die Festphase gebunden hat. Je nach System werden dazu mit einem Enzym konjugierte Antikörper (direkter ELISA) oder in zwei Schritten zuerst ein weiterer, spezifischer Antikörper und, nach einem erneuten Waschschrift, ein mit einem Enzym konjugierter Anti-Antikörper, welcher nicht an den Analyten, sondern an den gebundenen Antikörper bindet (indirekter ELISA), verwendet. Anstelle des markierten Antikörpers kann auch ein markierter Analyt zu der Probe hinzugefügt werden, welcher dann mit dem Analyt in der Probe um die Bindungsstellen an dem immobilisierten Antikörper konkurriert (kompetitiver ELISA). Bei allen Systemen wird nach einem letzten Waschschrift ein von dem konjugierten Enzym umsetzbares Substrat hinzugefügt. Nach einer erneuten Inkubationszeit wird die Enzymreaktion gestoppt und anhand der Umsetzung des Substrats durch das Enzym die in der Probe befindliche Konzentration des Analyten berechnet. Dies geschieht meist durch einen Farbumschlag, dessen Intensität mit einer Standardkurve verglichen wird.

1.3.1. Enzymun® T4

Der Einsatz des Enzymun® T4 Test (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland; heute Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland) zur Bestimmung von caninem T4 wurde von LARSSON und LUMSDEN (1980) evaluiert. Der Test wurde nach der Bedienungsanleitung des Herstellers

durchgeführt; diese konnte allerdings weder von den Autoren noch von der Herstellerfirma vorgelegt werden. In der unten ausführlich beschriebenen Nachfolgestudie von JENSEN und Mitarbeitern (1992) finden sich einige Angaben zum Test: demnach wurden vier Standards mit Konzentrationen von 0 – 167 nmol/l (0 – 13 µg/dl) mitgeliefert, aus welchen die Standardkurve für den Test erstellt werden konnte. Die Immunreaktion (T4 aus der Probe konkurriert mit enzymmarkiertem T4 in der Testflüssigkeit um Bindungsstellen an spezifischen Antikörpern des ELISA) und auch die Enzymreaktion (das zur Markierung verwendete Enzym setzt ein zur Probe hinzugefügtes Substrat um) wurden nach jeweils 30 min beendet. Die Kreuzreaktivität mit T3 soll laut Hersteller unter 3,5 % liegen (JENSEN et al., 1992). Die Enzymreaktion wurde mit Hilfe eines Photometers (Gilford 300 T1 Spectrophotometer, Gilford Instrument Laboratories, Oberlin, Ohio, Vereinigte Staaten von Amerika) ausgewertet (LARSSON und LUMSDEN, 1980).

Verglichen wurde dieser Test mit einer nicht kommerziell erhältlichen RIA-Methode, für die ein aus Hasen gewonnenes Anti-T4-Antiserum und mit radioaktivem ^{131}I markiertes T4 (Hersteller: New England Nuclear, Boston, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) verwendet wurde. Mit ANS wurde die Bindung von T4 an TBG verhindert und mit Aktivkohle wurde ungebundenes T4 vor der Messung im Gammazähler (Searle Gamma Counter, Modell 1186, Searle Analytical Inc., Des Plaines, Illinois, Vereinigte Staaten von Amerika) aus den Proben entfernt. Mit dieser RIA-Methode soll es möglich gewesen sein, Konzentrationen in einem Bereich von 1 – 100 nmol/l (0,1 – 7,8 µg/dl) sehr akkurat zu messen (LARSSON und LUMSDEN, 1980). Die Kreuzreaktivität von T3 und T4 war zu vernachlässigen (LARSSON und LUMSDEN, 1980). Für die Erstellung der Standardkurve wurde mit Aktivkohle gereinigtes Plasma von hypothyreoten Hunden verwendet, zu welchem nicht näher definierte, „zweckdienliche Mengen“ von T4 hinzugefügt wurden (LARSSON und LUMSDEN, 1980).

Zur Bestimmung der T4-Konzentration durch RIA und ELISA wurden Plasmaproben von Hunden beider Geschlechter verwendet. Diese Hunde konnten sowohl euthyreot als auch hypothyreot sein. Siebzehn Hunden wurden jeweils 10 IU TSH injiziert und vor sowie 4 – 8 h nach Injektion Blut abgenommen. Fünf dieser Hunde wurden mittels TSH-Stimulationstest als primär hypothyreot eingestuft. Die Anzahl der insgesamt untersuchten Hunde oder der analysierten

Proben wurde in der Studie nicht angegeben. Zur Verhinderung einer Gerinnung wurden die Proben mit einem Antikoagulans versehen. Meistens wurde hierzu Heparin verwendet (LARSSON und LUMSDEN, 1980). Durch Zentrifugation wurde das Plasma von den zellulären Blutbestandteilen getrennt und anschließend separiert. Bis zur Analyse mittels RIA wurden die Plasmaproben für 1 Woche bei 4°C aufbewahrt. Nach der Messung mittels RIA wurden die Plasmaproben für einen Zeitraum von 2 Wochen bis 6 Monaten bei -18°C gelagert, bevor die Analyse mittels Enzymun® erfolgte (LARSSON und LUMSDEN, 1980).

Der Korrelationskoeffizient zwischen RIA und ELISA wurde mit $r = 0,86$ angegeben und als hoch signifikant bezeichnet (LARSSON und LUMSDEN, 1980). Die Regressionsanalyse zeigte eine proportionale Abweichung der Ergebnisse des ELISA von den Ergebnissen des RIA an. Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision wurden mit durchschnittlich 14,6 % und 21,3 % angegeben. Für unterschiedliche T4-Konzentrationsbereiche (niedrig = 6,3 – 19,5 nmol/l [0,5 – 1,5 µg/dl], normal = 20,7 – 44,8 nmol/l [1,6 – 3,5 µg/dl], erhöht = 47,3 – 67,5 nmol/l [3,6 – 5,2 µg/dl]) wurden zusätzliche Wiederholungsmessungen durchgeführt; dabei wurde ein VK von bis zu 60 % für den niedrigen, ein VK von bis zu 19,8 % für Werte im normalen und ein VK von bis zu 12,1 % für den erhöhten T4-Konzentrationsbereich bestimmt (LARSSON und LUMSDEN, 1980). Es wurden kein Referenzbereich und keine untere Nachweisgrenze für den Enzymun® T4 berechnet. Für eine Verdünnungsreihe wurde die T4-Konzentration in einer Plasmaprobe mittels RIA bestimmt und danach drei Aliquots dieser Plasmaprobe mit Plasma eines hypothyreoten Hundes auf 75 %, 50 % und 25 % verdünnt. Die T4-Konzentration in der Probe des hypothyreoten Hundes war mittels RIA auf unter 0,1 nmol/l (0,01 µg/dl) bestimmt worden, daher wurde diese Probe zusätzlich als 0-Probe verwendet. Die zu erwartenden Konzentrationen der Verdünnungsstufen wurden berechnet und mit denjenigen Konzentrationen verglichen, die mit dem ELISA bestimmt wurden. Hierbei fiel auf, dass der ELISA in der 0-Probe eine mittlere T4-Konzentration von 12,7 nmol/l (1,0 µg/dl) ermittelte (LARSSON und LUMSDEN, 1980). Bis hin zu einer T4-Konzentration von 20 nmol/l (7 µg/dl) ermittelte der ELISA stets deutlich höhere Werte als der RIA. In höheren Konzentrationsbereichen wurde bei den Ergebnissen des ELISA teilweise eine bis zu dreifache Abweichung von den Ergebnissen des RIA festgestellt. Die Autoren vermuteten eine Hemmung des

Enzymsystems durch bestimmte Probenzusätze (wie das verwendete Antikoagulans, welches bei den Proben mit den hohen Werten nicht Heparin, sondern ein unbekannter anderer Zusatz gewesen sein soll), die zu einer falsch hohen Messung geführt hätten (LARSSON und LUMSDEN, 1980). Trotz der schlechten Ergebnisse für Präzision, Genauigkeit und Übereinstimmung bei niedrigen Werten, die für den Hund ja gerade interessant sind, kommen die Autoren zu dem Schluss, dass der von ihnen untersuchte ELISA eine akzeptable Alternative zum RIA darstellt, da der Anstieg von T4 nach TSH-Injektion mit beiden Methoden gleich gut gemessen werden konnte (LARSSON und LUMSDEN, 1980).

JENSEN und Mitarbeiter (1992) testeten den Enzymun® T4-Test erneut, um T4 in caninen Serum- und Plasmaproben zu bestimmen. Sie änderten das Studienprotokoll in einigen Punkten deutlich ab, da sie das Abschneiden des Tests bei niedrigen T4-Konzentrationen verbessern wollten. So verwendeten sie einen weiteren Standard von 15,8 nmol/l (1,2 µg/dl), dessen Konzentration aus den beiden Standards a (0) und b (47,4) mit der Formel $(2a+b)/3$ errechnet wurde (JENSEN et al., 1992). Damit sollte ein weiterer Standard für den beim Hund interessanten niedrigen Wertebereich zur Verfügung stehen und eine genauere Darstellung der Standardkurve ermöglicht werden. Die Menge des zur Patientenprobe hinzugefügten enzymkonjugierten T4 wurde auf die Hälfte der vom Hersteller empfohlenen Menge reduziert, und die beiden Inkubationsschritte (Immunreaktion und Enzymreaktion) wurden von jeweils 30 min auf jeweils 60 min verlängert (JENSEN et al., 1992). Zur Auswertung der Enzymreaktion war ein spezielles Analysegerät auf den Markt gebracht worden (Enzymun-Test® System ES-33, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland), welches in der Studie verwendet wurde. Auf einen Vergleich der Ergebnisse mit denen eines anderen Testsystems wurde verzichtet. Das restliche Protokoll blieb unverändert. Zur Gewinnung der Plasmaproben für die Studie wurden von gesunden und stationär aufgenommenen (also vermutlich kranken) Hunden Blutproben entnommen. Diese wurden in mit Heparin versetzten Röhrchen aufgefangen und direkt nach der Gewinnung zentrifugiert. Das abgetrennte Plasma wurde dann bei -55°C bis zur Analyse gelagert. Sollten die Proben mehrfach analysiert werden, wurden sie entweder bis zu einer Woche bei 4°C oder bis zu drei Monate bei -55°C gelagert. Für die Durchführung eines Stimulationstests wurde acht männlichen, klinisch gesunden Beagle-Hunden jeweils 100 µg Thyrotropin-releasing Hormon (TRH) injiziert und

vor sowie 3 h nach der Injektion Blut entnommen und die T4-Konzentration bestimmt.

Für die Bestimmung der Intra-Assay-Präzision wurden aus 22 Proben mit niedrigen ($20,5 \pm 1,3$ nmol/l [$1,6$ µg/dl]), aus 24 Proben mit mittleren ($40,6 \pm 1,8$ nmol/l [$3,2$ µg/dl]) und aus acht Proben mit hohen ($60,1 \pm 2,6$ nmol/l [$4,7$ µg/dl]) T4-Konzentrationen jeweils zwei Doppelmessungen durchgeführt. Hier ergab sich ein VK von 6,3 % für die niedrigen und jeweils von 4,4 % für die mittleren und die hohen Proben (JENSEN et al., 1992). Für die Bestimmung der Inter-Assay-Präzision wurden aus Poolproben mit niedrigen ($15,9 \pm 2,0$ nmol/l [$1,2$ µg/dl]) und hohen ($96,1 \pm 3,7$ nmol/l [$7,5$ µg/dl]) T4-Konzentrationen jeweils 16 bzw. sieben Wiederholungsmessungen durchgeführt. Hier lag der VK bei 12,5 % bzw. 3,8 % (JENSEN et al., 1992). Diese Werte lagen deutlich unter den durchschnittlichen Werten der Vorgängerstudie (Intra-Assay-Präzision 14,6 %, Inter-Assay-Präzision 21,3 %). Nach wie vor fielen die VK bei niedrigen T4-Konzentrationen unter 20 nmol/l ($1,6$ µg/dl) höher aus als bei Konzentrationen über 20 nmol/l ($1,6$ µg/dl) (JENSEN et al., 1992). Die untere Nachweisgrenze wurde mit 3,9 nmol/l ($0,3$ µg/dl) berechnet und stellt damit einen sehr niedrigen Wert dar, der noch niedriger liegt als die T4-Konzentrationen, die bei hypothyreoten Hunden routinemäßig auftreten. Die Wiederfindungsrate wurde bestimmt, indem zu einer Poolprobe mit niedriger T4-Konzentration ($13,6$ nmol/l [$1,1$ µg/dl]) definierte Mengen an T4 hinzugegeben und die erreichte T4-Konzentration anschließend gemessen wurde. Aus ermitteltem und berechnetem Wert wurde eine Regressionsgerade erstellt. Die Steigung der Regressionsgeraden wich nicht signifikant ($P = 0,46$) von 1 ab und der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,99$. Mittels logarithmischer Regressionsanalyse wurde ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem hinzugefügten und wiedergefundenen T4 festgestellt, der Korrelationskoeffizient betrug hier $r = 0,98$. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Wiederfindungsrate mit 100 % angegeben (JENSEN et al., 1992). Bei dem nachfolgenden TRH-Stimulationstest konnte bei allen 8 Hunden ein Anstieg der T4-Konzentration nach Stimulation gemessen werden (JENSEN et al., 1992).

JENSEN und Mitarbeiter (1992) führten die Verbesserungen der Ergebnisse vor allem auf ihre Modifikationen zurück. Sie schlossen aber nicht aus, dass das bessere Abschneiden des Enzymun® T4-Tests auch durch Verbesserungen des Testsystems selbst bedingt sein konnte (JENSEN et al., 1992).

1.3.2. SNAP® Total T4

Mit dem SNAP® Total T4 Test (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, Vereinigte Staaten von Amerika) wurde ein Schnelltest für die Praxis auf den Markt gebracht. Zur Auswertung des Tests war allerdings ein weiteres Gerät, der SNAP Reader® (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, Vereinigte Staaten von Amerika) nötig. LURYE und Mitarbeiter (2002) verglichen das System in einer Studie mit dem oben beschriebenen Coat-A-Count® Total T4 (RIA). Bereits vor der Testdurchführung musste angegeben werden, ob sich der erwartete T4-Wert im niedrigen („low dynamic“) Bereich (6,4 – 45 nmol/l [0,5 – 3,5 µg/dl], empfohlen für die Hypothyreoseabklärung) oder im hohen („high dynamic“) Bereich (25,7 – 90 nmol/l [2 – 7 µg/dl], empfohlen für das Hyperthyreosescreening oder die Therapiekontrolle unter Methimazol) befindet (LURYE et al., 2002). Es wurden 65 µl einer Serum- oder Plasmaprobe benötigt. Zu dieser Probe wurden 300 µl einer dem Test beigefügten-enzymmarkierten Konjugatslösung gegeben und die Probe für 5 min inkubiert, wobei sich Antigen-Antikörper-Komplexe zwischen dem in der Probe enthaltenen T4 und enzymmarkierten Anti-T4-Antikörpern bilden konnten. Im Anschluss wurde die Probe auf den SNAP® Testriegel aufgetragen und so lange gewartet, bis die Probe in einem Kontrollfenster des Riegels erschien. Damit hatte sich die Probe auf dem gesamten Reaktionsbereich des Riegels verteilt und konnte an den sich auf der Festphase des Riegels befindlichen Antikörpern binden. Durch Drücken auf den hervorstehenden Druckbereich des Riegels wurde eine Spülflüssigkeit auf dem Testriegel aktiviert und entfernte nicht gebundenes Konjugat aus dem Reaktionsbereich. Zur Analyse musste der Testriegel dann in den SNAP Reader® eingeführt werden. Dort wurde die Menge des gebundenen Konjugats bestimmt und über den Vergleich mit einer gespeicherten Standardkurve quantitativ als Konzentration angegeben.

Die in der Studie verwendeten Serumproben wurden zwischen der Messung auf dem RIA und der Messung mittels ELISA für eine unbekannte Zeit bei -20°C gelagert. Zur Untersuchung der Intra-Assay-Präzision wurden Poolproben gebildet und diese 10fach auf dem ELISA gemessen (LURYE et al., 2002).

Für die statistische Auswertung wurden verschiedene Ansätze gewählt. So wurden Werte, die oberhalb des Messbereichs des ELISA lagen (> 90 nmol/l [7 µg/dl]) als 91 nmol/l gewertet. Analog wurde mit Messwerten des RIA verfahren, die unterhalb des Messbereichs des RIA lagen (< 6,0 nmol/l [0,5 µg/dl]). Diese wurden

als 5 nmol/l gewertet. Keine der gemessenen Proben wies T4-Konzentrationen oberhalb des Messbereichs des RIA (> 120 nmol/l [$9,3$ µg/dl]) auf. Die Daten wurden mittels CUSUM Test auf Linearität untersucht und anschließend mittels linearer Regression miteinander verglichen. Zur Evaluierung der Übereinstimmung der beiden Methoden wurden Bland-Altman Plots angefertigt, wobei die Differenz der Werte von RIA und ELISA gegen die Werte des RIA grafisch aufgetragen wurden, der RIA also als Referenzmethode angesehen wurde. Um die Übereinstimmung unter klinischen Gesichtspunkten zu untersuchen, wurden die Ergebnisse beider Methoden in die verschiedenen T4-Bereiche niedrig, grenzwertig niedrig, normal, grenzwertig erhöht und erhöht eingeordnet und die Übereinstimmung der Zuordnung zu diesen Gruppen in Prozent berechnet. Da der Referenzbereich des RIA keine Kategorie „grenzwertig erhöhte T4-Konzentration“ ausgewiesen hatte, wurden jene Ergebnisse des ELISA, die in diese Kategorie fielen, einmal der Kategorie „normaler T4-Wert“ und ein weiteres Mal der Kategorie „erhöhter T4-Wert“ zugeordnet und die Übereinstimmung jeweils separat neu berechnet. Weiter wurde untersucht, wie häufig sich die klinische Entscheidung (diagnostisch oder therapeutisch) auf Grund verschiedener Ergebnisse für dieselbe Probe unterschieden hätte (LURYE et al., 2002).

1.3.2.1. SNAP® Total T4 beim Hund

LURYE und Mitarbeiter (2002) verwendeten den SNAP® Total T4 zur Bestimmung der T4-Konzentration in caninen Serumproben. Sie werteten Serumproben von 50 Hunden aus. Diese Proben waren zur Bestimmung der T4-Konzentration verschickt worden. Über den klinischen Status der Tiere, von denen die Serumproben stammten, wurden keine Angaben gemacht. Von diesen Proben wiesen fünf eine T4-Konzentration von unter 11 nmol/l ($0,9$ µg/dl), zwölf eine T4-Konzentration von 12 – 19 nmol/l ($0,9$ – $1,5$ µg/dl), 27 eine T4-Konzentration von 20 – 55 nmol/l ($1,6$ – $4,3$ µg/dl) und sechs eine T4-Konzentration von über 55 nmol/l ($> 4,63$ µg/dl) auf. Diese T4-Konzentrationen waren mittels RIA bestimmt worden. Alle 50 Proben wurden anschließend mittels des zu untersuchenden ELISA gemessen (LURYE et al., 2002).

Der Korrelationskoeffizient zwischen ELISA und RIA betrug $r = 0,84$. Die Intra-Assay-Präzision wurde mit 18 % angegeben. Die Regressionsgerade wich zu beiden Seiten von der Idealgeraden ($y = x$) ab, und auch mittels Passing-Bablok Regression wurde eine nicht-lineare Beziehung der Werte festgestellt. Der Bland-Altman Plot

zeigte starke Abweichungen zwischen RIA und ELISA mit drei Extremwerten im oberen Messbereich. Der ELISA über- und unterschätzte die T4-Konzentrationen beim Hund bis zu 40 nmol/l (3,1 µg/dl) und überschätzte die T4-Konzentrationen ab 40 nmol/l (3,1 µg/dl) (LURYE et al., 2002). Bei der Auswertung der Übereinstimmung der Zuordnung zu den einzelnen Gruppen wich die Zuordnung in 24 Fällen (48 %) ab, wenn die mittels ELISA bestimmten grenzwertig hohen T4-Konzentrationen als normal eingestuft wurden und in 29 Fällen (58 %), wenn die mittels ELISA bestimmten grenzwertig hohen T4-Konzentrationen als hoch eingestuft wurden. In 31 von 50 Fällen (62 %) wäre auf Grund der Werte des ELISA eine unangemessene klinische Entscheidung getroffen worden. Aufgrund dieser hohen Abweichungen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass das Gerät canine Proben nicht genau messen kann (LURYE et al., 2002).

1.3.2.2. SNAP® Total T4 bei der Katze

LYRIE und Mitarbeiter (2002) evaluierten ebenfalls Serumproben der Katze mittels des SNAP® Total T4-Tests. Die 50 Serumproben von Katzen waren ebenfalls zur Bestimmung der T4-Konzentration verschickt worden. Zum klinischen Status der Tiere, von denen die Serumproben stammten, wurden wie beim Hund keine Angaben gemacht. Von diesen Proben wiesen fünf eine T4-Konzentration von unter 10 nmol/l (0,8 µg/dl), 18 eine T4-Konzentration von 10 – 30 nmol/l (0,8 – 2,3 µg/dl), 14 eine T4-Konzentration von 30 – 50 nmol/l (2,3 – 3,9 µg/dl) und 13 eine T4-Konzentration von über 50 nmol/l (3,9 µg/dl) auf. Diese T4-Konzentrationen waren mittels RIA bestimmt worden. Alle 50 Proben wurden anschließend ebenfalls auf dem zu untersuchenden ELISA gemessen (LURYE et al., 2002). Bei 20 Proben hatte der Hersteller die Analyse im oberen Messbereich empfohlen, das Ergebnis lag dann allerdings unterhalb des Messbereichs. Die Autoren untersuchten daher, ob die Leistungsfähigkeit des Tests verbessert werden könnte, indem diese 20 Serumproben, unabhängig von der enthaltenen T4-Konzentration, mit der Voreinstellung „unterer Messbereich“ analysiert wurden. Von den 20 Proben wiesen 13 Proben eine T4-Konzentration unter 50 nmol/l (3,9 µg/dl) und sieben Proben eine T4-Konzentration über 50 nmol/l (3,9 µg/dl) auf (LURYE et al., 2002).

Der Korrelationskoeffizient von ELISA und RIA betrug für die Katze $r = 0,59$. Die Intra-Assay-Präzision wurde mit 28 % angegeben. Auch bei der Katze wich die Regressionsgerade von der Idealgeraden ab, hier war allerdings eine überwiegende

Abweichung nach oben zu sehen. Die Autoren schlossen daraus, dass der ELISA die T4-Werte bei Katzen generell überschätzte. Diese Abweichung von der Linearität wurde ebenfalls durch die Passing-Bablok Regression und den Bland-Altman Plot bestätigt. Letzterer zeigte, dass die starken Abweichungen zwischen RIA und ELISA überwiegend durch die Ermittlung höherer T4-Konzentrationen mittels ELISA zustande kamen (LURYE et al., 2002). Bei der Auswertung der Übereinstimmung der Zuordnung zu den einzelnen Gruppen wich die Zuordnung in 18 Fällen (36 %) ab, wenn die grenzwertig hohen Werte des ELISA als normal eingestuft wurden und in 28 Fällen (56 %), wenn die grenzwertig hohen Werte als erhöht eingestuft wurden. In 25 von 50 Fällen (50 %) wäre auf Grund der Werte des ELISA eine unangemessene klinische Entscheidung getroffen worden. Bei der separaten Auswertung der 20 Serumproben, die unabhängig von der enthaltenen T4-Konzentration im unteren Messbereich analysiert wurden, konnte keine Verbesserung der Leistungsfähigkeit festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient unterschied sich mit $r = 0,6$ kaum zu dem der vorherigen Berechnung. Die Beziehung der Messwerte zueinander war nach wie vor nicht linear. Der Bland-Altman Plot zeigte einen Bias von nahezu 0 an, jedoch waren über den gesamten Messbereich weiterhin starke Abweichungen der einzelnen T4-Konzentrationen voneinander zu sehen. Der ELISA überschätzte auch die mittels RIA als niedrig gemessenen T4-Konzentrationen (bis ca. 40 nmol/l [3,1 µg/dl]) und unterschätzte die mittels RIA als hoch gemessenen T4-Konzentrationen (ab ca. 40 nmol/l [3,1 µg/dl]). Bei der Auswertung der Übereinstimmung der Zuordnung zu den einzelnen Messbereichen wich die Zuordnung nun in sieben Fällen (35 %) ab, wenn die mittels ELISA als grenzwertig niedrig gemessenen T4-Konzentrationen als normal eingestuft wurden und in acht Fällen (40 %), wenn die mittels ELISA als grenzwertig niedrig gemessenen T4-Konzentrationen als niedrig eingestuft wurden. Für keine der Proben gab der ELISA eine T4-Konzentration im grenzwertig hohen Bereich an. In 13 von 20 Fällen (65 %) wäre auf Grund der T4-Messungen mittels ELISA eine unangemessene klinische Entscheidung getroffen worden. Aufgrund dieser hohen Abweichungen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass das System feline Proben ebenfalls nicht richtig und präzise misst (LURYE et al., 2002).

1.3.3. SNAP® T4 Test

Der Nachfolger der SNAP® Total T4-Tests war der SNAP® T4 Test (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, Vereinigte Staaten von Amerika). Zur

Auswertung des Tests war wieder ein Analysegerät notwendig, der SNAPshot Dx® Analyser (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, Vereinigte Staaten von Amerika). Der wesentliche Unterschied zum Vorgängertest war, dass man nicht mehr zwischen einem unteren („low dynamic“) und einem oberen („high dynamic“) Bereich unterscheiden musste. Das restliche Testprotokoll blieb erhalten. Der Hersteller machte keine weiteren Angaben dazu, ob und wie der Test an anderer Stelle verändert worden war. Der SNAP® T4 Test wurde im Auftrag des Herstellers von PETERSON und Mitarbeitern (2003) vorgestellt und in einer Vergleichsstudie von KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) näher untersucht. Verglichen wurde er mit drei weiteren Systemen: dem RIA Coat-A-Count® Total T4 (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika), dem RIA Coat-A-Count® Canine T4 (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika), und dem CEIA Immulite® Total T4 (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika).

1.3.3.1. SNAP® T4 Test beim Hund

KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) verwendeten den SNAP® T4 Test ebenfalls in ihrer in Kapitel 1.1.3. beschriebenen Studie. Die Serumproben wurden dieses Mal allerdings nicht an ein Labor verschickt, sondern von den Autoren selber analysiert (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006).

Die Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte eine akzeptable Korrelation zwischen ELISA und CEIA ($r = 0,64$) und eine gute Korrelation zwischen ELISA und beiden RIA ($r = 0,9$). Alle Korrelationskoeffizienten wurden als signifikant ($P < 0,05$) angegeben (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Bei visueller Betrachtung der Regressionsgeraden wurde deutlich, dass bei niedrigen bis mittleren T4-Konzentrationen (bis etwa $4 \mu\text{g/dl}$) eine gute Übereinstimmung aller vier Messmethoden vorlag, danach wichen die Messergebnisse allerdings stark voneinander ab (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Die Bland-Altman Plots wurden angefertigt, indem die Differenz der Messwerte zweier Messmethoden auf die y-Achse und der Mittelwert der Messwerte auf die x-Achse aufgetragen wurden. Sie verdeutlichten, dass bei T4-Konzentrationen über $4 \mu\text{g/dl}$ höhere Abweichungen zwischen allen Messergebnissen vorlagen als darunter, und zwar um bis zu $3 \mu\text{g/dl}$ (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Das mittlere Bias lag für alle Messmethoden bei „etwa 0“ (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD,

2006). Für die Bestimmung von Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision wurden Probenpools gebildet, diese umfassten eine nicht näher bezeichnete Anzahl an Proben mit niedrigen (0,8 – 1,5 µg/dl, Pool 1), normalen (2 – 4 µg/dl, Pool 2) und erhöhten (5 – 7 µg/dl, Pool 3) T4-Konzentrationen. Die intra-Assay-Präzision des ELISA war 10 % für Pool 1 und jeweils 4 % für Pool 2 und 3, die Inter-Assay-Präzision des ELISA war 15 % für Pool 1 und jeweils 8 % für Pool 2 und 3 (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Der Referenzbereich des Tests wurde vom Hersteller mit 1,3 – 4,0 µg/dl angegeben (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006).

Um den Einfluss der Messmethode auf das klinische Vorgehen zu untersuchen, wurden die Proben der 41 hypothyreose-verdächtigen Hunde entsprechend der Referenzbereiche der Tests eingeordnet und überprüft, wie häufig sich der Verdacht bestätigt hätte. In 14 Fällen (34 %) wäre demnach die Verdachtsdiagnose „Hypothyreose“ mittels ELISA bestätigt worden. Da keine weiteren Untersuchungsergebnisse vorlagen, die die Diagnose „Hypothyreose“ bei diesen Hunden bestätigt hätten, war diese Aussage jedoch nur von begrenztem Wert, was die Autoren auch selber diskutierten (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Da die Ergebnisse aller in der Studie verwendeten Messmethoden sehr ähnlich waren, wurde der SNAP® T4 Test als valide für die Bestimmung von caninem T4 bezeichnet (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006).

1.3.3.2. SNAP® T4 Test bei der Katze

KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) verwendeten den SNAP® T4 Test ebenfalls in ihrer in Kapitel 1.1.4. beschriebenen Studie. Die Serumproben wurden dieses Mal nicht an ein Labor verschickt, sondern von den Autoren selber analysiert (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006).

Die Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte durchweg eine sehr gute Korrelation zwischen ELISA und CEIA sowie RIA ($r > 0,9$). Alle Korrelationskoeffizienten wurden als signifikant ($P < 0,05$) angegeben (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Beim Betrachten der Regressionsgeraden wurde deutlich, dass ebenfalls bei niedrigen bis mittleren T4-Konzentrationen (bis etwa 5 µg/dl) eine gute Übereinstimmung aller vier Messmethoden vorlag (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Die Bland-Altman Plots wurden angefertigt, indem die Differenz der Messwerte zweier Messmethoden auf die y-Achse und der Mittelwert

der Messwerte auf die x-Achse aufgetragen wurden. Sie verdeutlichten, dass bei T4-Konzentrationen über 5 µg/dl höhere Abweichungen zwischen allen Messergebnissen vorlagen als darunter; diese Abweichungen waren deutlicher als bei den caninen Proben (bis zu 4 µg/dl) (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Das mittlere Bias lag jedoch auch bei „etwa 0“ (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Für die Katze wurden keine eigenen Untersuchungen zur Bestimmung von Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision durchgeführt (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Der Referenzbereich wurde vom Hersteller des Tests mit 1,0 – 5,0 µg/dl angegeben (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006).

Um den Einfluss der Messmethode auf das klinische Vorgehen zu untersuchen, wurden die Proben der 64 hyperthyreose-verdächtigen Katzen ebenfalls entsprechend der Referenzbereiche der Tests eingeordnet und überprüft, wie häufig sich der Verdacht bestätigt hätte. In 30 Fällen (46 %) wäre demnach die Verdachtsdiagnose „Hyperthyreose“ mittels ELISA bestätigt worden. Da auch hier keine weiteren Untersuchungsergebnisse vorlagen, die die Diagnose „Hyperthyreose“ in diesen Katzen bestätigt hätten, war diese Aussage ebenfalls nur von begrenztem Wert (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Da die Ergebnisse aller in der Studie verwendeten Messmethoden sehr ähnlich waren, wurde der SNAP® T4 Test auch als valide für die Bestimmung von feline T4 bezeichnet (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006).

1.3.4. ST AIA-Pack® T4

Ein weiteres ELISA-System (ST AIA-Pack® T4, Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) wurde von HIGGS und Mitarbeitern (2014) in ihrer Studie untersucht. Der Test wurde auf einem Analysesystem durchgeführt (AIA-360®, Tosoh Corporation, Tokyo, Japan), welches so erstmals die vollautomatische Durchführung aller zur Bestimmung der T4-Konzentration aus Serumproben benötigter Reaktions- und Pipettierschritte in einem In-house-System ermöglichte (HIGGS et al., 2014). Als Vergleichsmethode diente hier der von SINGH und Mitarbeitern (1997) bereits validierte CEIA (Immulate® 1000, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Vereinigte Staaten von Amerika; heute Siemens Medical Solutions USA Inc., Malvern, Pennsylvania, Vereinigte Staaten von Amerika).

Der AIA-360® arbeitet mit einem kompetitiven Fluoreszenz-Enzymassay. Der

gesamte Test läuft in kleinen Einmaltestschalen ab, welche alle benötigten Reagenzien als Lyophilisat enthalten. Für die Analyse sind 150 µl Serum nötig und werden in die Testschale pipettiert. Mit ANS wird die Bindung von T4 an TBG aufgehoben. Auf kleinen Magnetkügelchen sind hormonspezifische Antikörper befestigt, um deren Bindungsstellen das Analyt in der Serumprobe mit einem enzymbeladenen Hormon konkurriert. Nach der Immunreaktion werden die Kügelchen gewaschen, um ungebundenes enzymbeladenes Hormon zu entfernen. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem Fluoreszenz-erzeugenden Substrat 4-Methylumbelliferyl Phosphat (4UMP). Die Menge des an die Kügelchen bindenden Hormons ist umgekehrt proportional zu der Menge an Hormon in der zu untersuchenden Serumprobe (HIGGS et al., 2014). Im Handbuch des Tests werden bereits Daten zur Genauigkeit des Geräts für humanes T4 angegeben: Intra-Assay-Präzision von 3,5 %, Inter-Assay-Präzision von 5,1 %, Referenzbereich 63,2 – 141,9 nmol/l (4,9 – 11,0 µg/dl), untere Nachweisgrenze 6,4 nmol/l (0,5 µg/dl), Wiederfindungsrate 94 %, Kreuzreaktivität mit T3 unter 2 %. Diese Daten wurden nicht in der Studie publiziert. Der Hersteller gibt auch Referenzbereiche für canines T4 (13 – 52 nmol/l [1 – 4 µg/dl]) und felines T4 (10 – 55 nmol/l [0,8 – 4,3 µg/dl]) T4 an. Wie diese berechnet oder bestimmt worden sind, wurde jedoch nicht weiter angegeben (HIGGS et al., 2014).

Die verwendeten Serumproben wurden 1–7 Tage lang bei -20°C gelagert. Am Tag der Analyse wurden sie in einem Wasserbad aufgetaut und auf beiden Testsystemen mit Reagenzien aus der jeweils selben Charge gemessen. Wiesen die Proben Anzeichen starker Hämolyse oder Lipämie auf, wurden sie ausgeschlossen. Mild lipämische Proben wurden durch „harte“ Zentrifugation bei $1751 \times g$ für 10 min „geklärt“ und dann gemessen. Für die Bestimmung der VK wurden Serumpools gebildet und jeweils 10 Messungen am gleichen Tag (Intra-Assay-Präzision) und an 10 aufeinander folgenden Arbeitstagen (Inter-Assay-Präzision) durchgeführt (HIGGS et al., 2014). Auch wurden eigene Referenzbereiche für Hunde und Katzen etabliert (HIGGS et al., 2014).

1.3.4.1. ST AIA-Pack® T4 beim Hund

HIGGS und Mitarbeiter (2014) untersuchten Serumproben von 60 Hunden, die zur Untersuchung vorgestellt worden waren. Dabei stand die Abklärung einer möglichen Hypothyreose nicht im Vordergrund, die Tiere wurden wegen verschiedenster nicht näher benannter Krankheitssymptome vorgestellt (HIGGS et

al., 2014). War diesen Tieren Blut abgenommen und dieses nicht vollständig für andere Untersuchungen verwendet worden, so wurde es zur Analyse mittels ELISA und CEIA herangezogen (HIGGS et al., 2014).

Die Korrelation der Ergebnisse von ELISA und CEIA lag bei $r = 0,94$, was nach DEWHURST und Mitarbeitern (2003) sowie PAPASOULIOTIS und Mitarbeitern (2006; 2008) als exzellente Korrelation gewertet wurde (HIGGS et al., 2014). Die Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision wurde mit durchschnittlich 6,5 % bzw. 7 % angegeben. Zur Untersuchung der Übereinstimmung beider Methoden wurden Bland-Altman Plots angefertigt. Als gute Übereinstimmung wurde es gewertet, wenn es kein reales Bias gab oder das Bias klein, die 95 %-Konfidenzintervalle des Bias eng und keine Ausreißer/Extremwerte vorhanden waren. Kein reales Bias wurde angenommen, wenn das 95 %-Konfidenzintervall des Bias den Wert 0 einschloss (HIGGS et al., 2014). Der Bland-Altman Plot zeigte für den Hund kein reales Bias an. Das 95 %-Konfidenzintervall für das Bias war jedoch weit und sechs der 60 Proben (10 %) wurden als Ausreißer identifiziert. Bei einer dieser Proben war die Diskrepanz so groß, dass auf Grund des niedrigeren Wertes mittels ELISA eine andere klinische Vorgehensweise indiziert gewesen wäre (HIGGS et al., 2014).

Zusätzlich zur Evaluierung wurden auch eigene T4-Referenzwerte für den ELISA ermittelt. Dafür wurde von 66 gesunden Hunden Serum untersucht und ein Referenzbereich mittels der Formel ($\text{Median} \pm 2x \text{ SD}$) mit 12 – 45 nmol/l (1 – 3,5 µg/dl) berechnet. Die Autoren wiesen allerdings darauf hin, dass sie nicht die von der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) (GEFFRE et al., 2009) empfohlene minimale Anzahl von 120 Hunden zur Berechnung des Referenzbereichs herangezogen hatten (HIGGS et al., 2014).

Zusammenfassend gaben HIGGS und Mitarbeiter (2014) an, dass sowohl der ELISA als auch der CEIA auf Grund der exzellenten Korrelation für die Messung von T4 bei Hunden geeignet sind. Die Ergebnisse des Bland-Altman Plots legten jedoch nahe, dass die beiden Systeme nicht untereinander austauschbar sind und daher gerätespezifische Referenzwerte zur Nutzung des ELISA verwendet werden sollten (HIGGS et al., 2014). Für den Einsatz zur Diagnostik der caninen Hypothyreose sei das Gerät unter Vorbehalt geeignet, da noch kein Test zur Bestimmung von caninem TSH auf dem AIA-360® verfügbar war (HIGGS et al., 2014).

1.3.4.2. ST AIA-Pack® T4 bei der Katze

HIGGS und Mitarbeiter (2014) untersuchten zudem Serumproben von 60 Katzen, die wegen verschiedenster, nicht näher benannter Krankheitssymptome zur weiteren Abklärung vorgestellt worden waren. Dabei stand die Abklärung einer möglichen Hyperthyreose nicht im Vordergrund (HIGGS et al., 2014). War diesen Tieren Blut abgenommen und dieses nicht vollständig für andere Untersuchungen verwendet worden, so wurde es zur Analyse mittels ELISA und CEIA herangezogen (HIGGS et al., 2014).

Die Korrelation der Ergebnisse von ELISA und CEIA lag bei $r = 0,97$, was nach DEWHURST und Mitarbeitern (2003) sowie PAPASOULIOTIS und Mitarbeitern (2006; 2008) ebenfalls als exzellente Korrelation gewertet wurde (HIGGS et al., 2014). Die Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision wurde mit durchschnittlich 4,3 % bzw. 6,5 % angegeben. Zur Untersuchung der Übereinstimmung beider Methoden wurde ein Bland-Altman Plot angefertigt. Dieser zeigte für die Katze ein kleines, negatives Bias an. Das 95 %-Konfidenzintervall für das Bias war auch weit und vier der 60 Proben (6 %) wurden als Ausreißer identifiziert (HIGGS et al., 2014). Da die T4-Konzentrationen dieser Proben oberhalb der Referenzbereiche von ELISA und CEIA lagen, wurde angenommen, dass dies keinen Einfluss auf die klinische Vorgehensweise bei diesen Katzen gehabt hätte (HIGGS et al., 2014).

Zusätzlich zur Evaluierung wurden ebenfalls eigene T4-Referenzwerte für den ELISA ermittelt. Dafür wurde von 27 gesunden Katzen Serum untersucht und ein Referenzbereich mittels der Formel (Median \pm 2x SD) mit 13 – 45 nmol/l (1 – 5,5 μ g/dl) berechnet. Die Autoren wiesen allerdings darauf hin, dass sie auch bei der Katze nicht die von der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) (GEFFRE et al., 2009) empfohlene minimale Anzahl von 120 Tieren zur Berechnung des Referenzbereichs herangezogen haben (HIGGS et al., 2014).

Zusammenfassend gaben HIGGS und Mitarbeiter (2014) an, dass sowohl der ELISA als auch der CEIA auf Grund der exzellenten Korrelation ebenfalls für die Messung von T4 bei Katzen geeignet sind (HIGGS et al., 2014). Für den Einsatz zur Diagnostik der felines Hyperthyreose sei das Gerät gut geeignet, da ein hoher T4-Wert zusammen mit entsprechenden klinischen Symptomen eine hinreichend sichere Diagnose erlaube (HIGGS et al., 2014).

Tabelle 3. Übersicht über die Validierungsstudien zur Bestimmung von T4 bei Hunden und Katzen mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Corp. = Form der Aktiengesellschaft im englischen Sprachraum, et al. = et alii, Inc. = Form der Aktiengesellschaft im englischen Sprachraum, k. A. = keine Angabe, lt. = laut, µg/dl = Mikrogramm pro Deziliter, n = Patientenzahl, r = Korrelationskoeffizient, ® = Registrierte Handelsmarke, s. = signifikant, T3 = Trijod-Thyronin, T4 = Gesamt-Thyroxin, TSH = Thyreoidea-stimulierendes Hormon, TRH = Thyrotropin-Releasing Hormon, VK = Variationskoeffizient, ø = Durchschnittlich)

Autor und Jahr	Testsystem (Handelsname und Hersteller), ggf. Analysegerät	Verwendete Vergleichsmethode	Fallzahlen nach Tierart n = Hund/Katze	Korrelationskoeffizient r = Hund/Katze	Intra-Assay-Präzision VK (%)	Inter-Assay-Präzision VK (%)	Untere Nachweisgrenze µg/dl	Referenzbereich des Tests µg/dl	Test als valide bezeichnet (Ja/Nein)	sonstige statistische Auswertungen
Larsson und Lumsden, 1980	Enzymun® T4 (Boehringer Mannheim) Gilford 300 T-1 Spectro-Photometer (Gilford Instrument Laboratories)	RIA	k. A./0 n = 17/0 für Stimulationstest	r = 0,86	> 60 ($< 1,5 \mu\text{g/dl}$) $\leq 19,8$ ($1,6 - 3,5 \mu\text{g/dl}$) $\leq 12,1$ ($> 3,6 \mu\text{g/dl}$)	ø 21,3	k. A.	k. A.	Ja	Regressionsanalyse: proportionale Abweichungen der Messwerte Inhibitionskurven: parallel zu Standardkurven, Kreuzreaktivität: $< 3,5 \%$ mit T3, T4-Wertänderung nach TSH-Stimulation: ja
Jensen et al., 1992	Enzymun® T4 (Boehringer Mannheim) Enzymun® System ES-33 (Boehringer Mannheim)	keine	k. A./0 n = 8/0 für Stimulationstest	k. A.	6,3 ($1,3 \mu\text{g/dl}$) 4,4 ($3,2 - 4,7 \mu\text{g/dl}$)	12,5 ($1,2 \mu\text{g/dl}$) 3,8 ($7,5 \mu\text{g/dl}$)	0,3		Ja	Inhibitionskurven: paralleler Verlauf zu Standardkurven Wiederfindungsrate: 100 %, T4-Wertänderung nach TRH-Stimulation: ja
Lurye et al., 2002	SNAP® T4 Test (Idexx Laboratories Inc.) VetTest SNAP® Reader (Idexx Laboratories Inc.)	RIA	n = 50/50	r = 0,84/0,59	18	k. A.	k. A.	lt. Hersteller: 0,5 – 3,5 („low dynamic“) 2 – 7 („high	Nein	CUSUM Test: s. Abweichung von der Linearität Regressionsanalyse: keine Übereinstimmung der Messwerte Bland-Altman Plot: keine Übereinstimmung der Messwerte, prozentualer Anteil abweichender Entscheidungen: 62 % Hund,

Autor und Jahr	Testsystem (Handelsname und Hersteller), ggf. Analysegerät	Verwendete Vergleichsmethode	Fallzahlen nach Tierart n = Hund/Katze	Korrelationskoeffizient r = Hund/Katze	Intra-Assay-Präzision VK (%)	Inter-Assay-Präzision VK (%)	Untere Nachweisgrenze µg/dl	Referenzbereich des Tests µg/dl	Test als valide bezeichnet (Ja/Nein)	sonstige statistische Auswertungen
								dynamic ⁶⁴)		65 % Katze
Kempainen & Birchfield, 2006	SNAP® Total T4 (Idexx Laboratories Inc.) Snapshot Dx® Analyzer (Idexx Laboratories Inc.)	RIA, CEIA	n = 98/100	r = 0,64/0,91 (CEIA) r = 0,91/0,94 (RIA Total T4) r = 0,87/0,95 (RIA Canine T4)	nur Hund 10 (< 1,5 µg/dl) 4 (2 – 4 µg/dl) 4 (> 5 µg/dl)	nur Hund 15 (< 1,5 µg/dl) 8 (2 – 4 µg/dl) 8 (> 5 µg/dl)	k. A.	lt. Hersteller: 1,3 – 4,0 (Hund) 1,0 – 5,0 (Katze)	Ja	Regressionsanalyse: gute Korrelation der Messwerte aller Methoden, Bland-Altman Plots: Bias ~ 0, Abweichung bis zu ± 3 µg/dl
Higgs et al., 2014	ST AIA-Pack® T4 (Tosoh Corp.)	CEIA	n = 60/60 n = 66/27 für Referenzbereich	r = 0,94/0,97	ø 6,5 (Hund) ø 4,3 (Katze)	ø 7 (Hund) ø 6,5 (Katze)	k. A.	1 – 3,5 µg/dl (Hund) 1 – 5,5 µg/dl (Katze)	Ja	Regressionsanalyse: Geräte nicht untereinander austauschbar Bland-Altman Plot: Bias ~0, hohe Abweichungen, 10 % Ausreißer (Hund), 6 % Ausreißer (Katze)

1.4. Enzym-Immunoassay

Neben der ELISA-Technik besteht noch die Möglichkeit, T4 mittels Enzym-Immunoassay (EIA) zu bestimmen. Hierbei gibt es kein Festphasensystem, an welchem Detektionsantikörper gebunden sind. Es wird weiterhin enzymbeladenes T4 eingesetzt, welches mit dem T4 in der Probe um freie Bindungsstellen an spezifischen, in genau definierter Menge zur Reaktionslösung hinzugefügten Anti-T4 Antikörpern konkurriert. Hat ein enzymbeladenes T4 an den spezifischen Antikörper gebunden, kann das Enzym nicht mehr aktiviert werden. Je mehr T4 also in der Patientenprobe vorhanden ist, desto mehr Enzym kann aktiviert werden. Durch Zugabe eines spezifischen Substrats lässt sich anhand der Umsetzungsmenge die T4-Konzentration in der zu untersuchenden Probe durch Vergleich mit einer Standardkurve quantifizieren. Zur Herstellung der Standardkurve wird bei jedem Messvorgang je ein mitgelieferter Kalibrator mit niedriger und hoher Konzentration mitgetestet. Durch die Kombination mit einem automatisierten photometrischen Analysegerät kann eine Automatisierung des gesamten Messvorgangs erreicht werden (HORNEY et al., 1999).

1.4.1. CEDIA® Total T4 beim Hund

HORNEY und Mitarbeiter (1999) veröffentlichten die erste Validierungsstudie zum Einsatz eines EIA (CEDIA® Total T4, Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Indiana, Vereinigte Staaten von Amerika; heute Micromedic Corp., Fremont, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) zur Bestimmung der T4-Konzentration in caninen Serumproben. Der EIA wurde auf einem automatisierten Analysegerät (Hitachi 911 Automated Analyzer, Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Indiana, Vereinigte Staaten von Amerika; heute Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Das Analyseprotokoll des Geräts wurde dabei geändert, es wurde sowohl die Probenmenge von 10 µl auf 20 µl verdoppelt, als auch ein niedrigerer T4-Standard (130 nmol/l anstatt 260 nmol/l [10,1 µg/dl anstatt 20,2 µg/dl]) verwendet, um den erwarteten Konzentrationsbereichen für canines (und auch felines) T4 besser zu entsprechen (HORNEY et al., 1999). Als Referenzmethode diente ein validierter RIA (Coat-A-Count® Total T4, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) (HORNEY et al., 1999). Die zu untersuchenden Serumproben von Hunden waren für routinemäßige Blutuntersuchungen an das

Labor des Atlantic Veterinary College, Charlottetown, Kanada, geschickt worden. Zwischen Blutentnahme und Eintreffen im Labor vergingen nie mehr als 24 h (HORNEY et al., 1999). Vom Labor der Michigan State University, East Lansing, Michigan, Vereinigte Staaten von Amerika, wurden Serumproben zur Verfügung gestellt, in denen bekannte Konzentrationen an T4-Autoantikörpern enthalten waren und deren TSH-Konzentration ebenfalls bekannt war (HORNEY et al., 1999).

Eine erste Vorläuferstudie wurde mit 105 caninen Serumproben durchgeführt. Die Korrelation zwischen RIA und EIA wurde mit $r = 0,86$ angegeben. Bei der Regressionsanalyse nach der Methode von Deming wurden signifikant positive Abweichungen festgestellt. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden zwischen RIA und ELISA lag bei 5,6 nmol/l (0,4 µg/dl). Als mögliche Ursache der Abweichungen wurden so genannte „Matrix-Effekte“ angeführt (HORNEY et al., 1999). Nach WOOD (1991) und ECKFELDT und COPELAND (1993) werden darunter Einflüsse benannt, die durch Unterschiede in der Beschaffenheit der Serumproben einzelner Spezies hervorgerufen werden können, sei es durch unterschiedliche zelluläre oder Plasma-Bestandteile, durch die hinzugefügten Antikörper, Pufferlösungen oder die enzymmarkierten Analyte. Da die Standardkurve mit humanem Kontrollserum erstellt, die Untersuchung jedoch mit caninem Serum durchgeführt wurde, führten die Autoren für den Hund einen spezies-spezifischen Korrekturfaktor von 5,6 ein und wendeten diesen bei der Auswertung von weiteren 99 caninen Serumproben und der Bestimmung der VK an (HORNEY et al., 1999). Damit sollten die „Matrix-Effekte“ aufgehoben werden (HORNEY et al., 1999).

Nach Anwendung des Korrekturfaktors wurde die Korrelation zwischen RIA und EIA mit $r = 0,92$ angegeben. Die Regressionsanalyse zeigte keine signifikante Abweichung von der Idealgeraden ($y = x$). Zur Bestimmung von Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision wurden sowohl kommerziell erhältliche Human-Kontrollseren, als auch canine Poolproben verwendet. Damit wollten HORNEY und Mitarbeiter (1999) untersuchen, ob sich die oben genannten „Matrix-Effekte“ hier auch bemerkbar machten. Sowohl die Kontrollseren als auch die Poolproben wurden 20fach hintereinander (Intra-Assay-Präzision) und an 20 verschiedenen Tagen (Inter-Assay-Präzision) analysiert (HORNEY et al., 1999). Für die Kontrollproben wurde die Intra-Assay-Präzision mit 4,4 % und für canine

Poolproben mit 7,1 % berechnet. Die Inter-Assay-Präzision betrug 5,3 % für die Kontrollseren und 9,0 % für die caninen Poolproben (HORNEY et al., 1999). Dieses Ergebnis wurde hinsichtlich der „Matrix-Effekte“ nicht näher kommentiert, die Ergebnisse wurden insgesamt als „akzeptabel“ bezeichnet (HORNEY et al., 1999). Die untere Nachweisgrenze von T4 in caninem Serum wurde mit 4 nmol/l (0,3 µg/dl) angegeben. Für die Untersuchung der Linearität des EIA wurden Verdünnungsreihen erstellt, einmal durch Verdünnung der Humanstandards und einmal durch Verdünnung einer caninen Poolprobe. Mit den Humanstandards war Linearität von 0 – 150 nmol/l (0 – 11,6 µg/dl) gegeben, mit der Poolprobe von 10 – 60 nmol/l (0,9 – 4,7 µg/dl). Dieses Ergebnis wurde nicht kommentiert (HORNEY et al., 1999). Die Untersuchung auf Interferenzen durch Hämolyse wurde nach der Methode von GLICK und Mitarbeitern (1986) durchgeführt und ergab keine Interferenzen bei Hämoglobinkonzentrationen ≤ 20 g/L. Zur Untersuchung des Einflusses von Lipämie auf das T4-Ergebnis des EIA wurden lipämische Proben vor und nach Zentrifugation bei $10000 \times g$ für 10 min gemessen und die Werte miteinander verglichen, sie wichen nicht mehr als 5 nmol/l (0,4 µg/dl) voneinander ab (HORNEY et al., 1999).

Die Proben vom Hund, welche T4-Autoantikörper enthielten, wurden auf beiden Systemen analysiert und die erhaltenen Werte ebenfalls miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die mittels EIA bestimmten T4-Konzentrationen häufiger auf das Vorliegen einer Hypothyreose schließen ließen als die mittels RIA bestimmten T4-Konzentrationen. Als Referenz wurden die TSH-Konzentrationen der entsprechenden Proben herangezogen, welche im Falle einer Hypothyreose erhöht sein sollten. In 8 von 14 Fällen (57 %) ermittelte der EIA ein, durch den TSH-Wert bestätigtes, richtiges Ergebnis. Im Gegensatz dazu ermittelte der RIA stets hohe T4-Konzentrationen, wobei nur in einer von 14 Proben (7 %) der TSH-Wert auf das Vorliegen einer „grenzwertigen Hyperthyreose“ hinwies. Die Autoren führten diesen Unterschied auf die Verwendung unterschiedlicher Antikörper gegen T4 zurück. Beim RIA kamen polyklonale Antikörper zum Einsatz, beim EIA dagegen monoklonale Antikörper (HORNEY et al., 1999). Daraus wurde abgeleitet, dass der EIA weniger anfällig für Interferenzen durch T4-Autoantikörper war (HORNEY et al., 1999).

Zusätzlich wurde die Stabilität von T4 in caninen Serumproben bei unterschiedlicher Lagerung untersucht. Dazu wurden Poolproben bei 4°C oder

- 20°C für jeweils 35 Tage gelagert und die T4-Konzentration an verschiedenen Tagen der Lagerung erneut bestimmt. Die festgestellten Konzentrationsänderungen lagen unter 7 nmol/l (0,5 µg/dl) und waren damit klinisch vernachlässigbar (HORNEY et al., 1999).

Abschließend wurde der EIA als präzise und akkurate Methode zur Bestimmung von caninem T4 bezeichnet (HORNEY et al., 1999).

1.4.2. CEDIA® Total T4 bei der Katze

HORNEY und Mitarbeiter (1999) analysierten auch feline Serumproben auf dem EIA. Eine erste Vorläuferstudie wurde mit 102 feline Serumproben durchgeführt. Die Korrelation zwischen RIA und EIA wurde hier mit $r = 0,97$ angegeben. Bei der Regressionsanalyse nach der Methode von Deming (SMITH et al., 1980) wurden ebenfalls signifikant positive Abweichungen festgestellt. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden zwischen RIA und ELISA lag bei 19,5 nmol/l (1,5 µg/dl). Als mögliche Ursache der Abweichungen wurden auch hier die so genannten „Matrix-Effekte“ angeführt (HORNEY et al., 1999). Es wurde auch für die Katze ein spezies-spezifischer Korrekturfaktor von 19,5 eingeführt und dieser bei der Auswertung von weiteren 77 feline Serumproben und der Bestimmung der VK angewendet (HORNEY et al., 1999). Damit sollten ebenfalls die „Matrix-Effekte“ aufgehoben werden (HORNEY et al., 1999).

Nach Anwendung des Korrekturfaktors wurde die Korrelation zwischen RIA und EIA mit $r = 0,94$ angegeben. Die Regressionsanalyse zeigte keine signifikante Abweichung von der Idealgeraden ($y = x$). Zur Bestimmung von Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision wurden neben den kommerziell erhältlichen Human-Kontrollseren und den caninen Poolproben zusätzlich feline Poolproben verwendet. Für die feline Poolproben wurde die Intra-Assay-Präzision mit 6,2 % und die Inter-Assay-Präzision mit 8 % berechnet (HORNEY et al., 1999). Dieses Ergebnis wurde hinsichtlich der „Matrix-Effekte“ ebenfalls nicht näher kommentiert, die Ergebnisse wurden insgesamt als „akzeptabel“ bezeichnet (HORNEY et al., 1999). Die untere Nachweisgrenze von T4 in feline Serum wurde mit 6 nmol/l (0,5 µg/dl) angegeben. Für die Untersuchung der Linearität des EIA wurden auch aus einer feline Poolprobe Verdünnungsreihen erstellt. Mit der feline Poolprobe war Linearität von 0 – 94 nmol/l (0 – 7,3 µg/dl) gegeben. Dieses Ergebnis wurde nicht kommentiert (HORNEY et al., 1999). Die Untersuchung auf Interferenzen durch

Hämolyse wurde nach der Methode von GLICK und Mitarbeitern (1986) durchgeführt und ergab auch bei feline Proben keine Interferenzen bei Hämoglobinkonzentrationen ≤ 20 g/L. Ebenfalls wichen die Ergebnisse in lipämischen Proben vor und nach Zentrifugation nicht mehr als 5 nmol/l (0,4 µg/dl) voneinander ab (HORNEY et al., 1999). Die Untersuchung der Stabilität von T4 in feline Serumproben bei unterschiedlicher Lagerung wurde analog zu der bei caninen Proben durchgeführt und kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die festgestellten Konzentrationsänderungen klinisch vernachlässigbar waren (HORNEY et al., 1999).

Abschließend wurde der EIA als präzise und akkurate Methode auch zur Bestimmung von feline T4 bezeichnet (HORNEY et al., 1999).

1.4.3. DRI® Thyroxine Assay bei der Katze

Ein alternatives EIA-Analyse-System für T4-Bestimmungen wurde kürzlich von WILLIAMS und ARCHER (2016) für den Einsatz bei Katzen untersucht. Als Grund wurde angegeben, dass der oben beschriebene EIA (CEDIA® Total T4) gegenwärtig nicht verfügbar sei und es auch noch keine Validierungsstudie mit speziellen Referenzbereichen von erwachsenen und geriatrischen Katzen gab (WILLIAMS und ARCHER, 2016). FRIEDRICHS und Mitarbeiter (2012) erarbeiteten einen Leitfaden zur Erstellung von neuen Referenzbereichen in der Tiermedizin und gaben an, dass „die demographische Situation der Referenzpopulation repräsentativ sein sollte hinsichtlich der Patientenpopulation, für welche der neue Referenzbereich etabliert wird“ (WILLIAMS und ARCHER, 2016). Bei dem untersuchten EIA handelte es sich um den DRI® Thyroxine Assay (Microgenics Corp., Fremont, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika), der auf einem automatisierten Analysegerät (Olympus AU400, Beckman Coulter, High Wycombe, Großbritannien) durchgeführt wurde. Als Vergleichsmethoden dienten ein RIA (Gamma Coat M (¹²⁵I) Total T4 Radioimmunoassay Kit, DiaSorin Inc., Stillwater, Minnesota, Vereinigte Staaten von Amerika) und ein CEIA (Immulite® Total T4, Siemens Medical Solutions USA Inc., Malvern, Pennsylvania, Vereinigte Staaten von Amerika) (WILLIAMS und ARCHER, 2016).

Für die Studie wurden Blutproben aus mehreren verschiedenen Tierkliniken und Tierarztpraxen verwendet. Aus der Population der in den Tierarztpraxen vorgestellten Tieren (n = 134) wurden 49 Katzen, basierend auf Vorbericht und den

Ergebnissen einer klinischen und hämatologischen Untersuchung, als klinisch gesund eingestuft und deren Serumproben für die Erstellung des Referenzbereichs verwendet. Das mediane Alter dieser Katzen lag bei 14,8 Jahren. Sämtliche Serumproben standen auch für die Bestimmung von Präzision und Linearität zur Verfügung (WILLIAMS und ARCHER, 2016). Bei den 117 Katzen, die in den teilnehmenden Tierkliniken vorgestellt worden waren, wurden die T4-Konzentration mittels RIA (36 Tiere) und CEIA (81 Tiere) bestimmt. Diese wurden im Rahmen der Studie erneut mittels EIA analysiert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Der erneuten Analyse ging eine Lagerung bei -80°C für bis zu 18 Monate voraus (WILLIAMS und ARCHER, 2016).

Der Korrelationskoeffizient zwischen EIA und RIA wurde mit $r = 0,95$ und der zwischen EIA und CEIA mit $r = 0,99$ angegeben. Die Regressionsanalyse zwischen EIA und RIA sowie zwischen EIA und CEIA wurde nach der Methode von Deming durchgeführt. Sie zeigte, dass zwischen den Ergebnissen von EIA und RIA ein proportionaler, aber kein konstanter Fehler vorlag. Zwischen den Ergebnissen des EIA und CEIA lag sowohl ein proportionaler als auch ein konstanter Fehler vor (WILLIAMS und ARCHER, 2016). Die Bland-Altman Plots zeigten, dass die Ergebnisse von EIA und RIA um bis zu -69% (median $-21,7\%$) und die Ergebnisse von EIA und CEIA um bis zu -112% (median $-3,6\%$) voneinander abwichen, der EIA also oft niedrigere Ergebnisse ermittelte als RIA und CEIA (WILLIAMS und ARCHER, 2016). Auf Grund dieser Ergebnisse folgerten WILLIAMS und ARCHER (2016), dass die Referenzbereiche des RIA und der CEIA nicht auf die neue Methode angewendet werden konnten und ein eigener Referenzbereich für den EIA etabliert werden musste.

Für die Bestimmung der Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision wurden Poolproben mit niedrigen (median 11 nmol/l [$0,9\text{ }\mu\text{g/dl}$]), normalen (median 55 nmol/l [$4,3\text{ }\mu\text{g/dl}$]) und erhöhten (median 138 nmol/l [$10,7\text{ }\mu\text{g/dl}$]) T4-Konzentrationen gebildet und diese je 3fach gemessen. Die Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision für die Pools mit niedrigen Konzentrationen war mit 11 bzw. $10,5\%$ wesentlich höher als Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision für die anderen Pools ($\leq 4,5\%$) (WILLIAMS und ARCHER, 2016). Die untere Nachweisgrenze wurde mit $6,9\text{ nmol/l}$ ($0,5\text{ }\mu\text{g/dl}$) berechnet. Linearität war von $5,6 - 151\text{ nmol/l}$ ($0,4 - 11,7\text{ }\mu\text{g/dl}$) gegeben (WILLIAMS und ARCHER, 2016). Anhand der T4-Konzentrationen der 49 als klinisch gesund eingestuften, erwachsenen Katzen

wurde ein Referenzbereich von 7,1 – 45,1 nmol/l (0,6 – 3,5 µg/dl) für den EIA berechnet. Dieser sollte bei der Hyperthyreose-Diagnostik mittels des untersuchten EIA angewandt werden (WILLIAMS und ARCHER, 2016). Die Autoren diskutierten, dass der cut-off Wert des EIA mit 45,1 nmol/l (3,5 µg/dl) niedriger war als der des RIA (65 nmol/l [5,1 µg/dl]) und des CEIA (55 nmol/l [4,3 µg/dl]). Sie gaben an, dass dies dem Umstand geschuldet sein könnte, dass sie nur 45 Referenztiere zur Erstellung des Referenzbereichs verwendet hatten. Allerdings könne es auch sein, dass wegen der Einbeziehung vor allem älterer Katzen dieser Referenzbereich genauer sei als die für die anderen beiden Systeme etablierten Referenzbereiche (WILLIAMS und ARCHER, 2016).

Zusammenfassend gaben die Autoren an, dass der DRI® Thyroxine Assay valide zur Diagnose einer Hyperthyreose bei erwachsenen und geriatrischen Katzen war, wenn der eigens etablierte Referenzbereich verwendet wurde (WILLIAMS und ARCHER, 2016). Sie stützten sich auf die Tatsache, dass die mittels RIA bestimmten, und als erhöht eingestuften, T4-Konzentrationen zu 86 % auch mittels EIA als erhöht eingestuft wurden. Die mittels CEIA bestimmten, und als erhöht eingestuften, T4-Konzentrationen wurden zu 100 % mittels EIA als erhöht eingestuft (WILLIAMS und ARCHER, 2016).

Tabelle 4. Übersicht über die Validierungsstudien zur Bestimmung von T4 bei Hunden und Katzen mittels Enzym-Immunoassay (EIA) (Corp. = Form der Aktiengesellschaft im englischen Sprachraum, et al. = et alii, k. A. = keine Angabe, µg/dl = Mikrogramm pro Deziliter, n = Patientenzahl, r = Korrelationskoeffizient, ® = Registrierte Handelsmarke, s. = signifikant, T3 = Trijod-Thyronin, T4 = Gesamt-Thyroxin, TSH = Thyreoidea-stimulierendes Hormon, VK = Variationskoeffizient)

Autor und Jahr	Testsystem (Handelsname und Hersteller), ggf. Analysegerät	Verwendete Vergleichsmethode	Fallzahlen nach Tierart n = Hund/Katze	Korrelationskoeffizient r = Hund/Katze	Intra-Assay-Präzision VK (%)	Inter-Assay-Präzision VK (%)	Untere Nachweisgrenze µg/dl	Referenzbereich des Tests µg/dl	Test als valide bezeichnet (Ja/Nein)	sonstige statistische Auswertungen
Horney et al., 1999	CEDIA® Total T4 (Boehringer Mannheim Corp.) Hitachi 911 Automated Analyzer (Boehringer Mannheim Corp.)	RIA	n = 204/179	r = 0,92/0,94	7,1 (Hund) 6,2 (Katze)	9 (Hund) 8 (Katze)	0,3 (Hund) 0,5 (Katze)	k. A.	Ja	Regressionsanalyse: keine s. Abweichungen von Idealgeraden, Inhibitionskurven: paralleler Verlauf zu Standardkurven, Autoantikörper in caninen Proben: weniger Interferenzen bei Analyse durch EIA (57 % richtig niedriger T4-Wert) als durch RIA (7 % richtig niedriger T4-Wert)
Williams et al., 2016	DRI® Thyroxine (Microgenics Corp.) Olympus AU 400 (Beckman Coulter)	RIA, CEIA	n = 0/117 n = 0/49 für Referenzbereich	r = 0,95 (RIA) r = 0,99 (CEIA)	11 (0,9 µg/dl) < 4,5 (4,3 – 10,7 µg/dl)	10,5 (0,9 µg/dl) < 4,5 (4,3 – 10,7 µg/dl)	0,5	0,6 – 3,5	Ja	Inhibitionskurven: parallel zu Standardkurven, Regressionsanalyse: proportionaler (RIA, CEIA) und konstanter (CEIA) Fehler, Bland-Altman Plots: Abweichungen um bis zu 69 % (RIA) und 112 % (CEIA)

2. Einsatz des miniVidas® Automated Analyzer in der Tiermedizin

Der miniVidas® Automated Analyzer (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) ermöglicht die Bestimmung zahlreicher Hormone aus Serumproben. Eines davon ist Progesteron (P4). BRUGGER und Mitarbeiter (2011) untersuchten, ob sich die P4-Konzentrationen im Blut von Hündinnen mit dem Progesterontest Vidas® P4 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) sicher und genau bestimmen lassen.

2.1. Progesteronbestimmung mittels Vidas® P4 bei Hunden

BRUGGER und Mitarbeiter (2011) verwendeten in ihrer Studie Serumproben von 27 Hündinnen, die zu Routinekontrollen in der Chirurgischen und Gynäkologischen Tierklinik, Ludwig-Maximilian Universität, München, Deutschland vorgestellt worden waren. Sieben dieser Hündinnen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung läufig und es sollte der Deckzeitpunkt bestimmt werden. Bei neun Hündinnen stand die Geburt kurz bevor, hier sollte der Geburtszeitpunkt vorhergesagt werden (BRUGGER et al., 2011). Von diesen Proben wurden 15 Stück sowohl mittels Vidas® P4-Test als auch mit einer, für die P4-Bestimmung genutzten RIA-Methode nach HOFFMANN und Mitarbeitern (1973; 1992) analysiert.

Der Korrelationskoeffizient zwischen Vidas® P4 und RIA wurde mit $r = 0,99$ angegeben. Die mittlere Abweichung der absoluten Werte des Vidas® P4 von den Werten des RIA betrug 15 %, dabei wichen die Werte des Vidas® P4 sowohl nach oben als auch nach unten von den Werten des RIA ab (BRUGGER et al., 2011). Zur Bestimmung der Intra-Assay-Präzision wurden Probenpools mit P4-Konzentrationen von 1,1 – 61,8 ng/ml 10fach analysiert. Die Intra-Assay-Präzision wurde mit $\leq 6,6$ % angegeben, mit Ausnahme des Probenpools mit der niedrigsten Konzentration, dort betrug sie 25,4 % (BRUGGER et al., 2011). Zur Bestimmung der Inter-Assay-Präzision wurden Probenpools mit P4-Konzentrationen von 15,1 – 49,1 ng/ml 10fach analysiert. Die Inter-Assay-Präzision wurde mit $\leq 3,1$ % für alle Pools angegeben (BRUGGER et al., 2011).

Zur Untersuchung der Einsetzbarkeit des Vidas® P4 unter klinischen Gesichtspunkten wurde bei den sieben läufigen Hündinnen eine Deckzeitpunktbestimmung durchgeführt. Bei allen sieben Hündinnen konnte ein Anstieg der P4-Konzentration im Blut festgestellt werden. Vier dieser Hündinnen

wurden zwei Tage nach dem errechneten Ovulationstermin gedeckt und drei der gedeckten Hündinnen wurden trächtig (BRUGGER et al., 2011). Dies werteten die Autoren als Beweis, dass der Zeitpunkt der Ovulation mittels P4-Bestimmung mit dem Vidas® P4-Test richtig bestimmt worden war (BRUGGER et al., 2011). Weiter wurde bei den neun trächtigen Hündinnen eine Bestimmung des Geburtseintritts mittels P4-Bestimmung durchgeführt. Der am Tag vor der Geburt auftretende, rasante Abfall der Plasma-P4-Konzentration in Blut konnte bei allen neun Tieren mittels Vidas® P4-Test nachgewiesen werden (BRUGGER et al., 2011). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass der Vidas® P4-Test, trotz der hohen Abweichungen bei Bestimmung der absoluten P4-Konzentrationen, aus klinischer Sicht für die Bestimmung von Deckzeitpunkt und Geburtstermin bei Hündinnen verwendet werden kann (BRUGGER et al., 2011).

III. PUBLIKATION

Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent assay for thyroxine measurement in cat and dog sera

Rouven Anderson¹

Ralf Mueller¹

Sven Reese²

Astrid Wehner¹

1) Clinic of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University Munich, Germany

2) Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University Munich, Germany

The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, veröffentlicht

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2017 May; 29(3).

<https://doi.org/10.1177/1040638717696442>



Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent assay for thyroxine measurement in cat and dog sera

Rouven Anderson, Ralf Mueller, Sven Reese, Astrid Wehner¹

Abstract. Measurement of total thyroxine (T4) is the first testing step in the work-up of thyroid disease in small animals. We evaluated an enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) as an in-house method to measure T4 in cats and dogs. We compared the T4 concentration in sera of 122 cats and 176 dogs measured by the ELFA with an enzyme immunoassay (EIA) to assess the concordance of the 2 methods. Bias of the ELFA in cats was -11.4% and in dogs 1.4% . Using Bland–Altman plots, limits of agreement were -81.5 to 58.7% in cats and -71.4 to 74.4% in dogs. Imprecision was calculated for both methods. Intra- and interassay coefficients of variation (CVs) of the ELFA in feline sera were 0.7 and 3.4% and of the EIA 7.6 and 15.7% , respectively. Intra- and interassay CVs of both ELFA and EIA in canine sera were $<9.5\%$. Reference intervals for the ELFA method were established and were 13.3 – 49.5 nmol/L for cats and 10.1 – 42.9 nmol/L for dogs. Accuracy of the EIA and ELFA was scored by assessing if the measured T4 value would identify the expected T4 range (low, normal, or elevated) of patients, based on history, clinical presentation, other diagnostic means, and response to therapy. This was possible for 75 cats and 50 dogs. Both methods yielded acceptable results, but the EIA was more accurate compared to the ELFA (percentage of true-positives in cats and dogs: EIA: 97% and 100% ; ELFA: 92% and 94%).

Key words: Cats; dogs; enzyme-linked fluorescent assay; method comparison; thyroxine; thyroxine measurement.

Introduction

Endocrine testing of dogs and cats is routinely performed in veterinary practice. Canine hypothyroidism and feline hyperthyroidism are frequently encountered endocrinopathies, and measurement of baseline total thyroxine (T4) concentration has become a valuable tool for the initial evaluation of thyroid function.^{8,10,27,28}

In cats suspected of being hyperthyroid, an increased T4 concentration confirms the diagnosis if appropriate clinical signs are present.²⁷ Concentrations of T4 in the mid- to upper portion of the reference interval (RI) in cats suspected of hyperthyroidism are considered suspicious and should lead to further testing, such as measurement of free T4 by equilibrium dialysis (fT4d) or endogenous thyroid-stimulating hormone (TSH).^{11,27,29} In dogs, T4 measurement is most often used to exclude a diagnosis of hypothyroidism or to assess the treatment response to thyroxine replacement therapy.^{24,30} For confirmation of suspected hypothyroidism, additional tests, such as the determination of TSH or fT4d may be necessary if T4 is low or the clinical suspicion is high in cases in which the T4 is within normal limits or even elevated.^{2,8,18} Thyroxine concentrations can vary during the day, and a one-time low value does not prove hypothyroidism.^{13,19}

Various studies have investigated different methods to determine T4 concentrations in serum samples from dogs and cats (Supplemental Table 1, available online at <http://vdi.sagepub.com/content/by/supplemental-data>).

The first immunologic method used was radioimmunoassay (RIA).^{4,10} The assay uses a solid-phase system in which radioactive iodine (¹²⁵I or ¹³¹I)-labeled T4 competes with the T4 in the sample for antigen-binding sites of specific anti-T4 antibodies immobilized on the solid phase. Following incubation and washing, radioactivity is measured with a gamma counter, and the amount of T4 in the sample is calculated. Several validation studies have been performed.^{31,19,27} RIA can be used for the diagnosis of thyroid disorder in dogs^{19,31} and cats.²⁷ Validation criteria were high correlation coefficients,²⁷ coefficients of variation (CVs) of $<10\%$ ^{19,27} to 16.5% ,³¹ alignment of inhibition curves to the test's standard curves,^{27,31} change of hormone concentration after injection of stimulating hormones,³¹ accuracy measured by recovery rate of T4,^{27,31} and cross-reactivity of antibodies.³¹ Other validation studies tested chemiluminescent- and chemiluminescent enzyme immunoassays (CIA/CEIA),³³ enzyme immunoassay (EIA),¹⁴ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),^{16,20} and fluorescent enzyme immunoassay (FEIA).¹²

Clinic of Small Animal Medicine (Anderson, Mueller, Wehner) and Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology (Reese), Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany.

¹Corresponding author: Astrid Wehner, Clinic of Small Animal Medicine, LMU University Munich, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany. a.wehner@medizinische-kleintierklinik.de

These various methods have been compared to the validated RIA methods, except for the FEIA, which was compared to the CEIA.¹² Initially, the ELISA did not fulfill the validation criteria.²⁰ However, by adapting the test protocol (introduction of an additional standard, prolongation of the incubation period, and reduction of the amount of T4 conjugate), the authors were able to produce precise and accurate results in a follow-up study.¹⁶

All these measurement methodologies share the disadvantage that, in general, samples must be sent to an external reference laboratory. This implies a delay in results. Although it is not crucial to obtain test results for hypothyroidism in dogs and hyperthyroidism in cats within a short period of time, practitioners and animal owners may still be interested in a fast turnaround for the submitted samples. Also, the cost for the determination of T4 measured with an in-house system could be significantly lower than that of a reference laboratory. To our knowledge, the only evaluations of in-house test systems reported to date have been for the ELISA²¹ and the FEIA.¹² Substantial discrepancies between ELISA and RIA results led to the conclusion that the in-house ELISA was not accurate for the determination of T4 in dogs and cats.²¹ Usefulness of the FEIA for clinical practice was proven.¹²

We evaluated an ELFA^a method for the in-house measurement of T4 concentrations in feline and canine serum prior to the potential release of the ELFA to veterinary practitioners. This test system has been validated and is available to practitioners for measurement of canine progesterone.⁷ It would be of interest if the measurement of feline and canine T4 could be performed on the same device, thus increasing its usability. The study design was 4-fold. We 1) evaluated whether the ELFA can be used interchangeably with an established and previously validated EIA^b; 2) assessed the imprecision for both tests; 3) established RIs for the ELFA method; and 4) evaluated the accuracy of the EIA and ELFA methods.

Materials and methods

Assays

An EIA^b method for feline and canine T4 measurement was used as the assay to which the new method was compared. The EIA was performed on an automated analyzer^d at a commercial laboratory as described previously.^{14,15}

We performed the ELFA^a on an in-house automated analyzer.^b The assay principle combines an immunoassay competition method with fluorescence detection. Reagents for the assay are ready-to-use and predispensed in sealed reagent strips. The solid-phase receptacle (SPR) serves as the solid phase as well as the pipetting device for the assay. The reaction medium is cycled in and out of the SPR several times. First, the serum sample is aspirated into the SPR and the T4 in the sample binds to the specific monoclonal antibodies coated on the interior of the SPR. Next, the conjugate containing an alkaline phosphatase-labeled T4 derivative is cycled in and out of the SPR, saturating the remaining free

antibody sites. Unbound components are eliminated during washing stages. Alkaline phosphatase hydrolyses the substrate (4-methyl-umbelliferyl phosphate) into a fluorescent product (4-methyl-umbelliferone), and the fluorescence is measured at 450 nm. The intensity of the fluorescence signal is inversely proportional to the concentration of T4 present in the sample. At the end of the assay, results are automatically calculated by the instrument in relation to the calibration curve stored in memory, and then printed out. With each batch of reagents, a calibrator, a control, and batch-specific reference data are provided. After initial calibration of the instrument for each batch, recalibration is necessary at 14-d intervals. Following computation by the instrument, the results are expressed in nmol/L; the range covered is 6–320 nmol/L. Each kit contains 60 assays. The T4 assays and the blood samples were allowed to equilibrate at room temperature for 30 min before the assay was performed with 200 μ L of serum for each sample. The test was carried out according to the manufacturer's instructions.

Prospective study

The study design was approved by the ethics committee of the Centre of Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University Munich (LMU; accession 21-12-02-2014). Informed owner consent was obtained.

Blood samples were included from cats and dogs that were presented to the Clinic of Small Animal Medicine, LMU (Munich, Germany), and where T4 measurements were performed as part of the workup or to assess response to therapy. If the blood sample volume was insufficient for analysis (<1 mL), the animal was excluded. Blood samples were collected from the cephalic, jugular, or lateral saphenous veins in anticoagulant-free tubes. Blood was allowed to clot for 15 min at room temperature and subsequently centrifuged at 1,520 \times g for 5 min. Serum was obtained, and T4 was analyzed by the EIA. Surplus serum of 200 μ L was stored at -20°C until analysis by the ELFA. On the day of analysis by the ELFA, frozen samples were allowed to thaw at room temperature. Imprecision estimates for the ELFA and EIA were conducted for both cats and dogs. Fifteen milliliters of blood were collected from 1 cat and 1 dog. The serum harvested was also stored in aliquots of 200 μ L at -20°C until analysis. To assess linearity, samples were serially diluted with phosphate-buffered saline to concentrations of 0.75, 0.5, and 0.25 of the original concentration. For the determination of intra-assay CV for both EIA and ELFA, aliquots of each species were assayed on the same day; for the determination of interassay CV, aliquots were assayed on consecutive days. To establish RIs for the ELFA, serum samples from healthy cats and dogs were analyzed. These animals were presented to the Clinic of Small Animal Medicine for annual health checks and showed no signs of illness on history and physical examination. Complete blood count (CBC) and biochemistry profiles of those patients were obtained and were unremarkable.

To assess accuracy of the EIA and ELFA, all records of patients included in the study were reviewed by one of the authors (Diplomate of the European College of Veterinary Internal Medicine–Companion Animals and member of the European Society of Veterinary Endocrinology). Wherever possible, the expected T4 range of a patient was estimated, based on the patient's history, clinical presentation, other laboratory tests (usually hematologic and biochemical evaluation and other endocrine test results [endogenous TSH and fT4]), and response to therapy. Patients were grouped into disease categories. Cat groups consisted of healthy cats (normal T4 expected), cats with non–thyroidal illness (NTI; normal or low T4 expected), cats with untreated hyperthyroidism (increased T4 expected), and cats with diagnosed hyperthyroidism that were currently under medical therapy (normal or slightly low T4 expected). Dog groups consisted of healthy dogs (normal T4 expected), dogs with NTI (normal or low T4 expected), dogs with untreated hypothyroidism (low T4 expected), dogs with hypothyroidism that were currently under medical therapy (normal or slightly increased T4 expected), as well as dogs with iatrogenic hyperthyroidism (increased T4 expected). We determined in how many cases the measured T4 value of both tests would match the expected range.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a commercial software package.^c T4 values obtained by the EIA method were converted to SI units (from $\mu\text{g/dL}$ to nmol/L) using the following formula: $\text{nmol/L} = (\mu\text{g/dL}) \times 12.9$. Values that were below the minimum detection limit in both methods (<6.0 nmol/L for ELFA and <9.0 nmol/L [<0.7 $\mu\text{g/dL}$] for EIA) or above the maximum detection limit (>320 nmol/L for ELFA and >167 nmol/L [>13 $\mu\text{g/dL}$] for EIA) were excluded from statistical analysis. This was the case in 14 dogs and 1 cat.

T4 values obtained by the EIA and ELFA methods were compared using Pearson correlation analysis, and Passing–Bablok regression analysis including CUSUM test for linearity. For Passing–Bablok regression analysis, the 95% confidence interval (CI) examines if their value differs from 0 for intercept and 1 for slope only by chance. Thus, if the 95% CI for intercept includes 0, it can be concluded that there is no significant difference between the obtained intercept value and 0, and there is no constant difference between 2 methods. As well, if the 95% CI for slope includes 1, it can be concluded that there is no significant difference between the obtained slope value and 1, and there is no proportional difference between 2 methods. If the CUSUM test for linearity shows significant deviations from linearity, one may assume that the 2 methods cannot be used interchangeably and that no further tests of agreement are needed.^{1,17} As linearity was proven, agreement between the 2 methods was further evaluated by Bland–Altman plots, where bias is defined as the mean difference between methods. The difference of the EIA and ELFA methods was plotted against the mean value of the EIA and ELFA methods, as no good

standard was available. Results of the Passing–Bablok regression analysis indicated that the relative bias had to be used for the Bland–Altman plots. Agreement was considered good if there was no bias or if the bias was small, the 95% CI were narrow, and no outliers were present. No bias was present if the 95% CI included 0.^{5,17}

To assess imprecision of both tests, linearity and CVs were measured. Linearity under dilution was investigated by diluting the samples to concentrations of 0.75, 0.50, and 0.25 of the original concentration, followed by linear regression analysis. CVs were calculated for multiple runs (intra- and interassay variation). According to CLSI guidelines for the establishment of reference intervals, the “robust method” was used in cats (sample size <120), and the nonparametric percentile method was used in dogs (sample size >120).³⁴ For determination of accuracy, we determined the number of cases in which the measured T4 value of both tests would match the expected range. Results are expressed as true-positives by an absolute number and a percentage value. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

T4 concentration was determined in serum samples from 122 cats and 176 dogs using both methods. For the method comparison (Pearson correlation, Passing–Bablok regression, and Bland–Altman plots), data from 121 cats and 162 dogs were analyzed. Pearson correlation analysis showed highly significant ($p < 0.0001$) results between both assays, with $r = 0.84$ for cats and $r = 0.58$ for dogs. Because r was <0.975 , Passing–Bablok regression analysis was performed (Figs. 1, 2; Table 1). The CUSUM test for linearity showed no significant deviation from linearity for either cat or dog sera. Bland–Altman bias plots revealed a mean bias of -11.4 for cats and 1.4 for dogs (Figs. 3, 4). However, the 95% CI showed that the 2 methods would differ by up to 81%. Standard deviation was 33.3 for cats and 37.2 for dogs.

Serial dilutions showed very good linearity of the ELFA in cats and good linearity in dogs (Table 2). Intra- and interassay imprecision was determined for each species and for each assay (Table 3).

In order to establish T4 RIs for the ELFA, sera from an additional 81 healthy cats and 121 healthy dogs were examined. The cats were 2–20 y of age, with a median age of 11 y. The cats' T4 values were 10.1–51.2 nmol/L . The calculated RI for cats was set at 13.3–49.6 nmol/L . The dogs were 1–13 y of age, with a median age of 4 y. The dogs' T4 values were 7.4–44.4 nmol/L . The calculated RI for dogs was set at 10.1–42.9 nmol/L . T4 RIs for the EIA method provided by the external laboratory were 9–61.8 nmol/L for cats and 12.9–51.5 nmol/L for dogs.

Of the animals used for the method comparison study, 27 cats had been presented to the Clinic of Small Animal Medicine for routine annual health evaluation and were assessed to be healthy. They showed no signs of illness and no abnormalities on CBC and biochemistry profile. In these cats, we

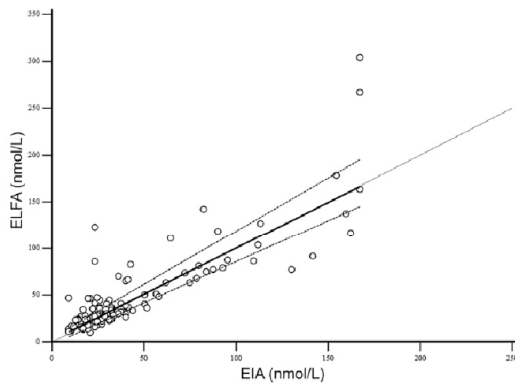


Figure 1. Passing-Bablok regression plots of enzyme immunoassay (EIA) versus enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) for feline T4 (total thyroxine). The dotted line represents the line of equality, the solid lines represent the regression equation, and the dashed lines represent the 95% confidence intervals of the regression equation.

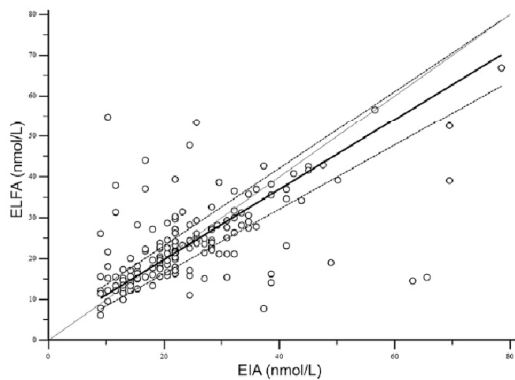


Figure 2. Passing-Bablok regression plots of enzyme immunoassay (EIA) versus enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) for canine T4 (total thyroxine). The dotted line represents the line of equality, the solid lines represent the regression equation, and the dashed lines represent the 95% confidence intervals of the regression equation.

expected the T4 value to be in the normal range of the RI. The EIA provided T4 values in the expected range in all 27 cases (100%) and the ELFA in 24 of 27 cases (89%). Elevated T4 values were present in 3 cats.

Fourteen cats were assessed to have NTI. These cats were diagnosed with diseases other than hyperthyroidism, namely neoplasia ($n = 8$), gastrointestinal disease ($n = 3$), dermatologic disease ($n = 1$), and other diseases ($n = 2$). Their underlying disease was treated, and during the course of treatment no signs of hyperthyroidism were present. The EIA T4 values were

within the RI in all 14 cases (100%) and the ELFA in 13 of 14 cases (93%). The T4 was increased in 1 cat.

Twenty-three cats were assessed as having untreated hyperthyroidism. Blood sampling took place when those patients were presented with signs consistent with hyperthyroidism. In 17 of these cats, fT4d had been measured and was elevated in all 17 (RI for fT4d: 9–30.1 pmol/L, range: 41.2–128 pmol/L, median: 101 pmol/L). Cats were treated orally with methimazole or carbimazole and showed resolution of their clinical and laboratory abnormalities on follow-up visits. The EIA T4 values were in the expected elevated range in 21 of 23 cases (91%) and the ELFA in 22 of 23 cases (96%). All other results of both methods were in the normal range of the RI.

Eleven cats were diagnosed with hyperthyroidism earlier and were currently under treatment with oral methimazole or carbimazole. The cats had complete resolution of their clinical and laboratory abnormalities at the time of blood sampling. These cats were expected to have a T4 value within the RI or slightly below. The EIA T4 values were in the expected range in all 11 cases and the ELFA in 10 of 11 cases (Table 4). The T4 was still elevated in 1 cat. Once clinical signs are controlled under treatment, one would expect the T4 value to be in the lower half of the RI. The EIA provided such results in 7 cases and the ELFA in 6 cases. In 8 of 11 cats, the results were within the same span of the RI when measured with the EIA and ELFA (in 5 cases both results were in the lower range and in 3 patients in the upper range).

Thirty-two dogs had been presented to the Clinic of Small Animal Medicine for routine annual health evaluation and were categorized as healthy. The dogs showed no signs of illness and no abnormalities on CBC and biochemistry profile. We expected the T4 value to be within the RI. The EIA provided T4 values in the RI in all 32 cases and the ELFA in 31 of 32 cases.

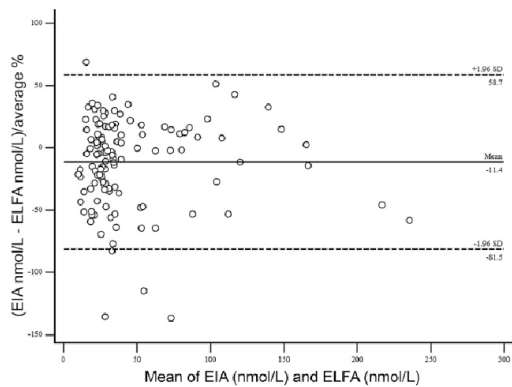
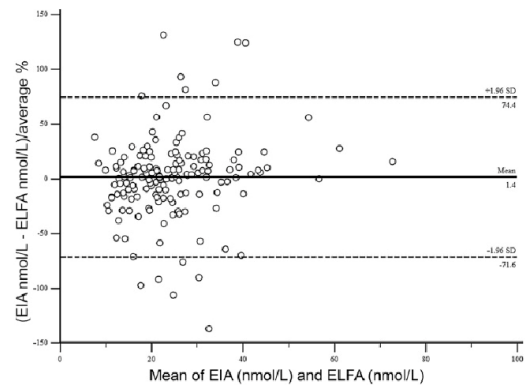
Six dogs were assessed to have NTI. These dogs were diagnosed with diseases other than hypothyroidism, namely cardiac disease ($n = 3$), other endocrine diseases ($n = 2$), and other diseases ($n = 1$). In 2 of the dogs, TSH was measured and yielded a low result (<0.5 ng/mL), and in 3 dogs, a TSH stimulation test had been performed 6 mo prior to our study and yielded normal stimulation. Their underlying disease was treated, and during the course of treatment no signs of hypothyroidism were present. In these dogs, we expected the T4 values to be within the RI or slightly below. Both the EIA and ELFA T4 values were as expected in all 6 cases. The EIA identified 3 of 6 dogs below RI and the ELFA 2 of 6. Both tests identified a low value in only 1 dog. Both tests identified a normal value in 2 dogs. In the other 3 patients, test results did not identify the same range (normal or below RI).

Three dogs were assessed as having untreated hypothyroidism. Blood sampling took place when those patients were presented with typical signs consistent with hypothyroidism. Of these, 1 had a normal TSH value but a low fT4d

Table 1. Median values, range, and Passing–Bablok regression analysis results for the enzyme immunoassay (EIA) and enzyme-linked fluorescent assay (ELFA).*

Species	EIA (nmol/L)		ELFA (nmol/L)		Intercept estimate	Slope estimate
	Median	Range	Median	Range		
Feline	25.7	9.0–68.6	29.1	10.1–85.9	1.59 (–2.37 to 4.81)	0.98 (0.88 to 1.14)
Canine	21.9	9.0–78.5	22.1	6.0–209.3	2.54 (0.61 to 4.25)	0.86 (0.79 to 0.95)

* Numbers in parentheses are 95% confidence intervals.

**Figure 3.** Bland–Altman difference plots using the enzyme immunoassay (EIA) and enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) for feline T4 (total thyroxine). The dashed lines indicate the 95% limits of agreement (mean of the differences \pm 1.96 standard deviation).**Figure 4.** Bland–Altman difference plots using the enzyme immunoassay (EIA) and enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) for canine T4 (total thyroxine). The dashed lines indicate the 95% limits of agreement (mean of the differences \pm 1.96 standard deviation).

value (<4.8 pmol/L), and 1 had an elevated TSH concentration (1.06 μ g/L). The third dog was diagnosed with macroadenoma of the pituitary gland, ischemic infarcts, and secondary Addison's disease. Secondary hypothyroidism was highly suspected. Thus, its TSH concentration was low. The first 2 dogs were treated with oral thyroxine and showed resolution of their clinical and laboratory abnormalities. In all 3 dogs, we expected the T4 values to be low. The EIA T4 values were below the RI in all 3 cases and the ELFA in 2 of 3 cases. One test result was within the RI.

Seven hypothyroid dogs were currently under treatment with oral thyroxine. When the diagnosis was originally established, 5 dogs had an elevated TSH (>0.5 μ g/L), and 2 dogs had a TSH within the RI. FT4d in those 2 dogs was low (<4.8 pmol/L). The dogs had complete resolution of their clinical and laboratory abnormalities at the time of blood sampling. These dogs were expected to have a T4 value within the RI or slightly above. The EIA T4 values were within the RI in all 7 cases and the ELFA in 6 of 7 cases. In 1 dog, the test result was below the RI. Two results were above the RI of the EIA and ELFA (same dogs).

Two dogs were diagnosed with iatrogenic hyperthyroidism (Table 5). Both had been diagnosed with hypothyroidism earlier by means of a TSH stimulation test. Both dogs were

on a high dose of thyroxine (>20 mg/kg twice a day) and were fed with bone and raw food. Both dogs showed signs consistent with hyperthyroidism at the time of blood sampling. These signs resolved after a reduction of the thyroxine dose and a change to commercial dog food. In these dogs, elevated T4 values were expected. Both the EIA and ELFA T4 values were above RIs in both cases.

Discussion

In cats and dogs, determination of total T4 concentration is accepted as the initial laboratory test when hypothyroidism or hyperthyroidism is suspected, and history, physical examination findings, and clinicopathologic data are indicative of either disease.^{22,25,27} Our study showed that the ELFA is a fast in-house method with high precision in feline and canine sera, and that its accuracy is acceptable given that the measured values correspond with the expected values in the majority of cases. The EIA precision for canine sera is very good, but is just on the edge of being acceptable in feline sera. However, its accuracy does not differ significantly from the accuracy of the ELFA. The methods cannot be used interchangeably, and individual RIs are needed.

Table 2. Serial dilutions of T4 (total thyroxine) measured by enzyme-linked fluorescent assay.

Species	Dilution (%)	Value calculated (nmol/L)	Value measured (nmol/L)	
Feline	100		30.9	$y = 0.9418x + 2.7329$
	75	23.2	24.7	$r = 0.9996$
	50	15.5	17.7	$R^2 = 0.9992$
	25	7.7	10.1	
Canine	100		22.6	$y = 0.771x + 5.4291$
	75	17.0	19.2	$r = 0.9663$
	50	11.3	12.8	$R^2 = 0.9336$
	25	5.7	10.5	

Table 3. Coefficients of variation (CVs) for the measurement of T4 (total thyroxine) using the enzyme immunoassay (EIA) and enzyme-linked fluorescent assay (ELFA).

Variation/Method	Aliquots measured* (<i>n</i>)	CV* (%)
Intra-assay		
EIA	5/5	6.0/7.5
ELFA	10/10	5.8/3.4
Interassay		
EIA	5/5	9.5/15.7
ELFA	9/10	5.8/2.4

* Data presented as canine/feline.

Various method comparison studies have been performed using different criteria for the evaluation of agreement (Supplemental Table 1). A previous study¹⁷ introduced guidelines for method comparison studies based on the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) Initiative⁶ that is widely accepted and has been used in more recent studies.²³ The correlation coefficient should not be used as a measure of agreement as it does not assess agreement but association, and a high correlation does not necessarily guarantee good agreement.⁵ Nevertheless, a high correlation was often interpreted as good agreement in early method comparison studies.^{14,20,27} As the Pearson method is still mentioned in the majority of agreement studies, it was also performed in our study. Although significant results were obtained, the correlation coefficients were not high enough to suggest good agreement between the 2 methods. Unlike linear regression, Passing–Bablok regression is considered useful for comparing clinical methods because it allows measurement errors (imprecision) in both the *X* and *Y* variables, does not assume that measurement errors occur in normally distributed data, and is robust against outliers.^{1,26} The authors of a method comparison review paper¹⁷ suggest the usage of Passing–Bablok regression when Pearson $r < 0.975$, which was the case in our study. For both species, the CUSUM test did not show significant deviations from linearity. Only in dogs, examination of Passing–Bablok regression analysis revealed that the ELFA showed both constant and proportional error when compared to the EIA. Bland–Altman analysis was

performed because linear regression analysis alone is not always suitable for method agreement studies. The difference between the methods was plotted against the mean of the methods. This is recommended especially in cases in which none of the methods is considered to be a “gold standard.”¹⁷ Currently, most laboratories use nonradioactive CIAs to measure T4 in dogs and cats.¹⁸ In the past, RIA was considered to be a criterion-referenced standard.^{19,27,30}

Data obtained by the Bland–Altman plot identified no overall bias in cats. But the 95% limits of agreement for all feline T4 values were clinically unacceptable. In dogs, data obtained by the Bland–Altman plot also identified no overall bias. The 95% limits of agreement for all canine T4 values were also wide, hampering acceptability of this test if results of the ELFA are compared directly to the EIA. Therefore, judging from the 95% limits of agreement in both Bland–Altman plots, the EIA and ELFA methods would neither agree in cats nor in dogs, and the methods cannot be used interchangeably.

As a direct comparison of test results was not possible, a full validation of the ELFA and, in parts, also of the EIA, was performed, implying assessment of imprecision and accuracy. When aliquots of the same sample are analyzed by 2 different methods, a variation in results of >15% is considered inappropriate according to most of the industry’s bio-analytical guidelines (<https://goo.gl/VhxQ62>). The CVs in our study were very low for the ELFA (2.4–5.8%) and low for the EIA (6.0–9.5%). Only the CV for the EIA inter-assay variation in cats (15.7%) was somewhat higher, and is above the maximum acceptable CV of 15%. The CVs of the ELFA indicate very good precision as they were markedly below the maximum acceptable CV and also below the CVs of many previous T4 method comparison studies.^{14,18,31,33} The ELFA and EIA both measure T4 linearly if samples are being diluted.

The calculated RI for the ELFA and the given RI for the EIA (provided by the reference laboratory) overlapped, but for both species the range for the ELFA was narrower. Standards of minimal patient numbers for calculating RIs have been met for dogs, but were not possible for cats. Therefore, in order to set up a RI, a robust statistical method was used.

Table 4. Age and T4 (total thyroxine) range and median values for the enzyme immunoassay (EIA) and enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) for the different groups in cats.

Group	Age (y)		EIA (nmol/L)		ELFA (nmol/L)	
	Range	Median	Range	Median	Range	Median
Healthy	1–15	9	9.0–42.5	25.7	10.5–86.0	30.1
NTI*	8–9	11	14.2–39.9	22.5	14.5–70.2	24.8
Hyperthyroid						
Untreated	10–20	14	41.2–169	92.7	48.7–304	86.6
Treated	11–19	15	10.3–51.5	27.0	13.9–123	24.8

* NTI = non-thyroidal illness.

Table 5. Age and T4 (total thyroxine) range and median values for the enzyme immunoassay (EIA) and enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) for the different groups in dogs.

Group	Age (y)		EIA (nmol/L)		ELFA (nmol/L)	
	Range	Median	Range	Median	Range	Median
Healthy	1–11	6	15.4–41.2	25.7	12.6–53.4	24.4
NTI*	5–12	7.5	9.0–23.2	14	6.1–31.4	14.1
Hyperthyroid						
Untreated	10–13	11.5	78.5–169	123.6	67.0–209	138.1
Treated	5–10	6	32.2–69.5	37.3	7.7–56.6	38.3
Hyperthyroid (iatrogenic)	2–10	4	7.7–7.7	7.7	6.0–15.2	9.9

* NTI = non-thyroidal illness.

The clinical significance of a method's accuracy is most important when a method is being evaluated.⁹ From a clinical standpoint, it would be sufficient if an animal is correctly identified as being healthy or diseased. This approach has been implemented in our study by assessing if the measured T4 value would correspond with the expected T4 range of a patient that was based on history, clinical presentation, other laboratory tests (usually hematologic and biochemical evaluation and other endocrine test results [endogenous TSH and fT4d]), as well as response to therapy assessed at follow-up visits. Overall, both methods yielded acceptable results, but the EIA was more accurate than the ELFA.

For the 75 cats, EIA results matched the expected range in 97% of cases and ELFA results in 92% of cases. For the 50 dogs, EIA results matched the expected range in 100% of cases and ELFA results in 94% of cases. However, fewer than 10 patients were available for the untreated and treated hypothyroid and iatrogenic hyperthyroid group in dogs. This low case number makes an adequate judgement of test accuracy in the dog more difficult. In all other animals that were used for the method comparison, the expected T4 range could not be predicted retrospectively with certainty because follow-up was not available, clinical signs (potentially being associated with thyroid disease) persisted, or concurrent disease was present. In most of the remaining cats at the time of T4 analysis with the EIA, hyperthyroidism was excluded based on a normal T4 result and identification of another disease process explaining the presenting signs. However, those

cats were excluded from the accuracy analysis if no follow-up was available, as it is possible that hyperthyroidism was present concurrently with another disease. The majority of dogs that were excluded from accuracy analysis had been presented for dermatologic problems. At the time of submission of the T4 by the EIA method, endogenous TSH was also assessed. If TSH was low and T4 was in the RI or slightly below, hypothyroidism was not thought to be a differential diagnosis. If clinical signs persisted or follow-up was not available, it was not possible to score the expected T4 in those animals as dogs with hypothyroidism can have normal or low TSH levels. Other dogs were already receiving thyroxine replacement therapy but had uncontrolled concurrent disease. In those dogs, it was also not possible to predict their T4 status. Overall, the EIA and ELFA methods can be recommended for the determination of T4 in feline and canine sera; however, the EIA will more often yield results that are consistent with the expected value.

The price for one T4 measurement obtained by the ELFA is ~7€ (~8 US\$ at the time of manuscript preparation) per test, which is considerably lower than the price of an analysis with conventional methods performed at a commercial laboratory in our area.

The following limitations of the study must be addressed. First, the 2 methods have slightly different measurement ranges. The minimum detectable limit of the ELFA was lower than that of the EIA (ELFA: 6.0 nmol/L [0.46 µg/dL] vs. EIA: 9.0 nmol/L [0.7 µg/dL]). The ELFA measured T4 concentrations

below the detection limit of the EIA in 10 cases. For statistical analysis, these measurements had to be removed from analysis because no absolute number was available for the EIA method. Second, the samples for the ELFA had been frozen and stored at -20°C until analysis. Previous studies indicate that sample storage in plastic tubes at -20°C for up to 3 mo as well as repeated freezing and thawing of samples over a period of 8 d does not alter T4 values in dogs.^{3,32} Moreover, stability of T4 was proven in samples stored at 4°C and room temperature ($22\text{--}26^{\circ}\text{C}$) for up to 5 d.³ None of the samples have been stored at room temperature for >36 h as collection and analysis of the samples was performed within 36 h by the commercial laboratory. Third, the ELFA was only compared with the EIA method, and we did not use any other method of measurement for T4 (RIA or CEIA) in our method comparison study. In previous studies, both RIA and CEIA have served as standard methods. To overcome the problem of an unavailable gold standard, we compared results of both methods to an expected T4 range (low, normal, or elevated) of a patient. This expected range was based on history, clinical presentation, other laboratory tests, and response to therapy. Fourth, the RI of the ELFA in cats was calculated with less than the recommended number of ≥ 120 patients. This was addressed by using a robust method within the statistical software. This method has been established especially for studies where <120 patients are available. Fifth, there were only small numbers of patients for some groups in dogs ($n < 10$), potentially hampering adequate assessment of accuracy in both methods.

Acknowledgments

We thank the laboratory staff members of the Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University for their support.

Sources and manufacturers

- a. Vidas T4, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France.
- b. miniVidas automated analyser, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France.
- c. DRI thyroxine (T4) assay, Microgenics, Thermo Scientific, Fremont, CA.
- d. Modular P-Module, Roche, Basel, Switzerland.
- e. MedCalc for Windows v. 14.12.0, MedCalc Software, Ostend, Belgium.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

1. Bablok W, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures

- for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:783–790.
2. Beale KM. Current diagnostic techniques for evaluating thyroid function in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990;20:1429–1441.
3. Behrend EN, et al. Effect of storage conditions on cortisol, total thyroxine, and free thyroxine concentrations in serum and plasma of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1998;212:1564–1568.
4. Belshaw BE, Rijnberk RA. Radioimmunoassay of plasma T4 and T3 in the diagnosis of primary hypothyroidism in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1979;15:17–23.
5. Bland JM, Altman DG. Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;22:85–93.
6. Bossuyt PM, et al. Toward complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy. The STARD initiative. *Am J Clin Pathol* 2003;119:18–22.
7. Brugger N, et al. Quantitative determination of progesterone (P4) in canine blood serum using an enzyme-linked fluorescence assay. *Reprod Domest Anim* 2011;46:870–873.
8. Chastain CB. Canine hypothyroidism. *J Am Vet Med Assoc* 1982;181:349–353.
9. Clarke WL, et al. Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood glucose. *Diabetes Care* 1987;10:622–628.
10. Ferguson DC. Testing for hypothyroidism in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007;37:647–669.
11. Graves TK, Peterson ME. Diagnostic tests for feline hyperthyroidism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1994;24:567–576.
12. Higgs P, et al. Measurement of thyroxine and cortisol in canine and feline blood samples using two immunoassay analysers. *J Small Anim Pract* 2014;55:153–159.
13. Hoh WP, Oh TH. Circadian variations of serum thyroxine, free thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine concentrations in healthy dogs. *J Vet Sci* 2006;7:25–29.
14. Horney BS, et al. Evaluation of an automated, homogeneous enzyme immunoassay for serum thyroxine measurement in dog and cat serum. *Vet Clin Pathol* 1999;28:20–28.
15. Horowitz GL, et al. MODULAR ANALYTICS: a new approach to automation in the clinical laboratory. *J Autom Methods Manag Chem* 2005;2005:8–25.
16. Jensen AL, et al. Adaptation of a commercially available enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of thyroxine in canine plasma samples. *Zentralbl Veterinarmed A* 1992;39:741–746.
17. Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol* 2006;35:276–286.
18. Kemppainen RJ, Birchfield JR. Measurement of total thyroxine concentration in serum from dogs and cats by use of various methods. *Am J Vet Res* 2006;67:259–265.
19. Kemppainen RJ, Sartin JL. Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *J Endocrinol* 1984;103:219–226.
20. Larsson M, Lumsden JH. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of plasma thyroxine in dogs. *Zentralbl Veterinarmed A* 1980;27:9–15.
21. Lurye JC, et al. Evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative measurement of serum

- total thyroxine concentration in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002;221:243–249.
22. Miller AB, et al. Serial thyroid hormone concentrations in healthy euthyroid dogs, dogs with hypothyroidism, and euthyroid dogs with atopic dermatitis. *Br Vet J* 1992;148:451–458.
 23. Monti P. Method of comparison—making the right choice. *J Small Anim Pract* 2014;55:125–126.
 24. Nachreiner RF, Refsal KR. Radioimmunoassay monitoring of thyroid hormone concentrations in dogs on thyroid replacement therapy: 2,674 cases (1985–1987). *J Am Vet Med Assoc* 1992;201:623–629.
 25. Panciera DL. Hypothyroidism in dogs: 66 cases (1987–1992). *J Am Vet Med Assoc* 1994;204:761–767.
 26. Passing H, Bablok W. Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes. Application of linear regression procedures for method comparison studies in *Clinical Chemistry, Part II*. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984;22:431–445.
 27. Peterson ME. Feline focus: Diagnostic testing for feline thyroid disease: hyperthyroidism. *Compend Contin Educ Vet* 2013;35:E3.
 28. Peterson ME. Feline hyperthyroidism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1984;14:809–826.
 29. Peterson ME, et al. Evaluation of serum thyroid-stimulating hormone concentration as a diagnostic test for hyperthyroidism in cats. *J Vet Intern Med* 2015;29:1327–1334.
 30. Peterson ME, et al. Measurement of serum total thyroxine, triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations for diagnosis of hypothyroidism in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1997;211:1396–1402.
 31. Reimers TJ, et al. Validation of radioimmunoassay for triiodothyronine, thyroxine, and hydrocortisone (cortisol) in canine, feline, and equine sera. *Am J Vet Res* 1981;42:2016–2021.
 32. Reimers TJ, et al. Effects of storage, hemolysis, and freezing and thawing on concentrations of thyroxine, cortisol, and insulin in blood samples. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982;170:509–516.
 33. Singh AK, et al. Validation of nonradioactive chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats, and horses. *J Vet Diagn Invest* 1997;9:261–268.
 34. Wayne P. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. CLSI document C28-A3c.

Erratum

JVDM 29:278–286 (May 2017)

In the article entitled “Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent assay for thyroxine measurement in cat and dog sera” by Rouven Anderson, Ralf Mueller, Sven Reese, and Astrid Wehner, on page 284, Table 5, the information for hypothyroid and hyperthyroid dogs is incorrect. The corrected table is as follows:

Table 5. Age and T4 range and median values for the enzyme immunoassay (EIA) and enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) for the different groups in dogs.

Group	Age (y)		EIA (nmol/L)		ELFA (nmol/L)	
	Range	Median	Range	Median	Range	Median
Healthy	1–11	6	15.4–41.2	25.7	12.6–53.4	24.4
NTI	5–12	7.5	9.0–23.2	14	6.1–31.4	14.1
Hypothyroid						
Untreated	2–10	4	7.7–7.7	7.7	6.0–15.2	9.9
Treated	5–10	6	32.2–69.5	37.3	7.7–56.6	38.3
Hyperthyroid (iatrogenic)	10–13	11.5	78.5–169	123.6	67.0–209	138.1

* NTI = non-thyroidal illness.

Supplemental Table**Table: Test principles and evaluation methods used in T4 measurement studies published for dogs and cats.**

Test principle	Test considered validated (yes/no)	Evaluation method
CEIA*/CIA†	yes	ANOVA, coefficient of variation, inhibition curves, recovery rate, regression analysis, t-test
CEIA*	yes	ANOVA, coefficient of variation, difference plots, regression analysis, % discordant results
EIA‡	yes	coefficient of variation, correlation coefficient, inhibition curves, regression analysis
ELISA§	no	coefficient of variation, correlation coefficient, inhibition curves, regression analysis
ELISA§	yes	coefficient of variation, cross reactivity, recovery rate, regression analysis, T4 change if stimulated
ELISA§	no	coefficient of variation, difference

		plots, regression analysis, % discordant results
ELISA§	yes	ANOVA, coefficient of variation, difference plots, regression analysis, % discordant results
FEIA‡	no	coefficient of variation, correlation coefficient, difference plots, regression analysis
RIA#	yes	coefficient of variation, cross reactivity, inhibition curves, recovery rate, T4 change if stimulated
RIA#	yes	coefficient of variation, correlation coefficient, inhibition curves, recovery rate, T4 change when stimulated
RIA#	yes	ANOVA, coefficient of variation, difference plots, regression analysis, % discordant result

*chemiluminescent enzyme immunoassay, †chemiluminescent immunoassay, ‡enzyme immunoassay, §enzyme-linked immunosorbent assay, ‡fluorescent enzyme immunoassay, #radioimmunoassay

IV. DISKUSSION

Die Bestimmung der T4-Konzentration im Blut von Hunden und Katzen hat sich als erster Labortest etabliert, wenn auf Grund von Anamnese und klinischer Untersuchung der Verdacht auf eine Unter- oder Überfunktion der Schilddrüse vorliegt. Heute gibt es viele verschiedene Möglichkeiten, die T4-Konzentration im Blut zu quantifizieren. Die meisten der dazu verwendeten Geräte und Testkits wurden für die Humanmedizin entwickelt. Vor einem Einsatz dieser Testverfahren in der Tiermedizin sollten sie für die zu untersuchende Tierart validiert werden (REIMERS et al., 1981; MONTI, 2014). Mit dem Aufkommen von enzymbasierten Testmethoden (ELISA, EIA) konnten kleine Geräte zur In-House Diagnostik entwickelt werden, die eine Bestimmung der T4-Konzentration innerhalb kürzester Zeit und vor Ort ermöglichen (LARSSON und LUMSDEN, 1980; JENSEN et al., 1992; LURYE et al., 2002; HIGGS et al., 2014). Da Hormonmessungen eine wichtige Rolle bei der Diagnosestellung von Endokrinopathien spielen, muss auch eine In-House Methode verlässliche und richtige Ergebnisse ermitteln (LURYE et al., 2002). Wie bei fast allen Testverfahren zur Messung von Gesamt-Thyroxin wurden auch die meisten In-House Geräte für den Einsatz in der Humanmedizin konzipiert. Sollen diese bei einer anderen Spezies eingesetzt werden, müssen sie vorher für jede Spezies validiert werden (REIMERS et al., 1981). Bislang wurden diese In-House Methoden jedoch als nicht oder wenig valide zur Bestimmung von caninem und felinem T4 getestet (LARSSON und LUMSDEN, 1980; LURYE et al., 2002). Ziel dieser Studie war es daher, einen ELFA als In-House Methode zur Bestimmung von caninem und felinem T4 zu validieren und Referenzbereiche für diesen Test zu etablieren. Bei der Validierung einer neuen Methode müssen deren Präzision und Richtigkeit bestimmt werden. Präzision ist dabei die Übereinstimmung zweier oder mehrerer Messergebnisse unter festen Bedingungen. Je dichter die Messergebnisse beieinander liegen, desto höher ist die Präzision der Methode. Dies allein sagt aber noch nicht aus, dass die Messergebnisse auch richtig sind. Die Richtigkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung eines Messergebnisses mit einem anerkannten Referenzergebnis. Je höher Präzision und Richtigkeit sind, desto genauer stimmt das Messergebnis mit dem wahren Wert der Messgröße überein.

Um die Präzision einer Messmethode zu bestimmen, werden im Allgemeinen

Wiederholungsmessungen mit Aliquots derselben Probe durchgeführt und der VK berechnet. Dabei kann zwischen einem VK der Wiederholung und einem VK der Reproduzierbarkeit unterschieden werden (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). Der VK der Wiederholung wird auch Intra-Assay-Präzision genannt. Er wird durch die Wiederholung der Messung einer Probe unter identischen Bedingungen innerhalb eines kurzen Zeitintervalls bestimmt. Der VK der Reproduzierbarkeit wird auch Inter-Assay-Präzision genannt und durch Wiederholung der Messung einer Probe unter unterschiedlichen Bedingungen (anderes Labor, anderer Bediener, längeres Zeitintervall) bestimmt (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). Für die Bestimmung des VK einer quantitativen Messmethode können Proben verwendet werden, in denen sich die Konzentration des gesuchten Analyts in der Nähe eines Grenzwerts befindet, bei dessen Über- oder Unterschreitung die Patienten unter klinischen Gesichtspunkten unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). Als Grenzwert kann bspw. der untere und obere Referenzbereich verwendet werden (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). Alternativ können verschiedene Einzel- oder Poolproben verwendet werden, in denen Analytkonzentrationen aus dem unteren, mittleren und oberen Referenzbereich enthalten sind (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). In der vorliegenden Studie wurden von jeweils einem Hund und einer Katze 15 ml Blut entnommen und das daraus gewonnene Serum in Aliquots von 200 µl aufgeteilt. Aus dem Serum des Hundes konnten 29 und aus dem Serum der Katze 30 Aliquots gebildet werden. Zur Bestimmung der Intra-Assay-Präzision wurden für Hund und Katze jeweils zehn Aliquots mittels ELFA und jeweils fünf Aliquots mittels EIA analysiert. Zur Bestimmung der Inter-Assay-Präzision wurden für den Hund neun und für die Katze zehn Aliquots mittels ELFA sowie jeweils fünf Aliquots mittels EIA analysiert. Auf die Bildung von Probenpools wurde verzichtet, da es noch keine Studien zur Verteilung der Blutbestandteile in gepoolten Proben gibt und daher nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine etwaige ungleiche Verteilung derselben den VK fälschlicherweise erhöht. Die im Rahmen der Bestimmung von Intra-Assay-Präzision ermittelten VK betragen für den EIA 6,0 % beim Hund und 7,5 % bei der Katze. Für den ELFA lauten sie 5,8 % für den Hund und 3,4 % für die Katze. Diese VK sind deutlich unter 10 % und können daher als sehr gut angesehen werden. Die im Rahmen der Bestimmung von Inter-Assay-Präzision berechneten VK sind für den EIA 9,5 % beim Hund und 15,7 % bei der Katze. Für

den ELFA wurden 5,8 % für den Hund und 2,4 % für die Katze ermittelt. Die VK des ELFA sind ebenfalls deutlich unter 10 % und werden daher als sehr gut bewertet. Nur der Wert für die Inter-Assay-Präzision des EIA (15,7 %) war oberhalb des empfohlenen Grenzwertes von 15 %. Für RIA-Methoden lagen die meisten in der Literatur berichteten VK unter 10 %. Eine Ausnahme stellten einzelne VK in der Studie von REIMERS und Mitarbeitern (1981) dar, in der ein Intra-Assay-VK von 16,4 % für nicht näher definierte „niedrige“ T4-Konzentrationen bestimmt wurde. Auch in der Studie von KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) wurden vereinzelte VK von über 10 % für eine RIA-Methode berichtet. Bei Untersuchung von Probenpools mit einer T4-Konzentration unter 1,5 µg/dl wurde der Intra-Assay-VK mit 13 % und der Inter-Assay-VK mit 21 % ermittelt (KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Für ELISA-Methoden wurde von LARSSON und LUMSDEN (1980) ein VK von 12 bis über 60 % berechnet, LURYE und Mitarbeiter (2002) ermittelten einen Intra-Assay-CV von 18 %. Bei JENSEN und Mitarbeitern (1992) waren alle VK unterhalb von 13 %. Für EIA-Methoden waren die berichteten VK unterhalb (HORNEY et al., 1999) oder knapp oberhalb (WILLIAMS und ARCHER, 2016) von 10 %. Die höchsten Abweichungen wurden für CIA und CEIA-Systeme von SINGH und Mitarbeitern (1997) mit bis zu über 30 % berichtet. KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) hingegen veröffentlichten für ein CEIA-System durchweg VK von unter 10 %. Dieser Diskrepanz könnte eine eventuelle Veränderung des Tests zwischen 1999 und 2016 zu Grunde liegen. In der vorliegenden Studie kommt als Erklärung für den etwas höheren Inter-Assay-VK der Katze folgendes in Betracht: die Proben wurden zur Analyse mittels EIA an ein externes Labor verschickt und nicht, wie beim ELFA, vor Ort gemessen. Allerdings vergingen laut Labor zwischen Probengewinnung und Eintreffen im Labor nicht mehr als 48 h. Für bis zu fünf Tage ist die Stabilität von T4 auch bei Raumtemperatur (22 – 26°C) nachgewiesen worden (BEHREND et al., 1998). Da es sich um die Bestimmung der Inter-Assay-Präzision handelte, waren die dafür verwendeten Aliquots bei -20°C gelagert und an unterschiedlichen Tagen aufgetaut worden. Die Bestimmung der Inter-Assay-Präzision wurde in einem Zeitraum von 20 Tagen durchgeführt. Für einen Zeitraum von bis zu drei Monaten ist die Stabilität von T4 bei -20°C ebenfalls bereits nachgewiesen worden (REIMERS et al., 1982; REIMERS et al., 1983; BEHREND et al., 1998). Mit Ausnahme von REIMERS und Mitarbeitern (1981), KEMPPAINEN und SARTIN (1984), PETERSON und Mitarbeitern (1994; 1997)

sowie KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) berichteten die Autoren der oben beschriebenen Studien von einer Lagerung der Proben bei -18°C bis -80°C für einen Zeitraum von 7 Tagen bis zu 18 Monaten (LARSSON und LUMSDEN, 1980; HORNEY et al., 1999; LURYE et al., 2002; HIGGS et al., 2014; WILLIAMS und ARCHER, 2016). Sie diskutierten, dass die erfolgte Lagerung möglicherweise einen Einfluss auf die T4-Konzentration gehabt haben könnte, gaben jedoch an, dass entsprechende Untersuchungen von REIMERS und Mitarbeitern (1982; 1983) sowie BEHREND und Mitarbeitern (1998) eine Stabilität von T4 unter diesen Lagerungsbedingungen ergeben hatten (LARSSON und LUMSDEN, 1980; HORNEY et al., 1999; LURYE et al., 2002; HIGGS et al., 2014; WILLIAMS und ARCHER, 2016). Dadurch wird eine Änderung der T4-Konzentration durch die Lagerung unwahrscheinlich. HORNEY und Mitarbeiter (1999) führten eigene Untersuchungen zur Stabilität von T4 bei unterschiedlich langer Lagerung durch und stellten fest, dass sich die T4-Konzentration der Proben auch bei Lagerung über 34 Tage bei -20°C nicht signifikant verändert hatte (HORNEY et al., 1999). SINGH und Mitarbeiter (1997) lagerten die Proben bei -70°C für einen unbekanntem Zeitraum. Sollte dieser länger als 3 Monate betragen haben, ließen sich die hohen VK in ihrer Studie eventuell damit erklären. Eine Lagerung länger als drei Monate war nach bisherigem Kenntnisstand noch nicht Gegenstand einer wissenschaftlichen Studie.

In der Literatur wurden verschiedene Probenpools mit niedrigen, mittleren und hohen T4-Konzentrationen, abhängig vom jeweiligen Untersuchungsintervall, untersucht. Dabei war auffällig, dass bei der Mehrheit der Studien der VK am höchsten bei Analyse der Serumpools mit niedrigen T4-Konzentrationen war. Besonders deutlich wurde dies bei LARSSON und Mitarbeiter (1980), sie hatten mit einem VK von 60 % für den niedrigen Pool die höchsten Abweichungen verzeichnet. REIMERS und Mitarbeiter (1981) gaben den VK für den niedrigen Pool mit 16,4 % und für den mittleren und hohen Pool mit 4,0 % an. Ebenfalls starke Abweichungen waren bei KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) zu sehen: der VK für den niedrigen Pool betrug 21 % und für den mittleren und hohen Pool < 9 %. Ein Problem stellt hier dar, dass mit Ausnahme von KEMPPAINEN und BIRCHFIELD (2006) niemand die absoluten Konzentrationsbereiche dieser Probenpools angegeben hatte. Es bleibt also unklar, in welchem Bereich genau die Messmethoden einen solch hohen VK aufwiesen, da die Bezeichnung „niedriger

Konzentrationsbereich“ hier eher subjektiv zu bewerten ist. In der vorliegenden Studie betrug die T4-Konzentration der Hundeprobe 1,7 µg/dl und für die Katzenprobe 2,4 µg/dl. Diese T4-Konzentrationen wären dem „normalen“ Konzentrationsbereich der für beide Tiere etablierten Referenzbereiche zuzuordnen. Damit wurde der Empfehlung von JENSEN und KJELGAARD-HANSEN (2006) nicht vollständig nachgekommen. Sie hatten die Verwendung von Proben mit Analytkonzentrationen am unteren und am oberen Referenzbereich des jeweiligen Analyts empfohlen (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). Für die vorliegende Studie standen keine Tiere zur Verfügung, deren T4-Werte im Grenzbereich der jeweiligen Referenzbereiche gelegen hätten und denen eine ausreichende Menge an Blut hätte entnommen werden können, um mindestens 20 Wiederholungsmessungen durchzuführen. Die Blutproben wurden von einem gesunden Hund und einer gesunden Katze entnommen. Dadurch waren die ermittelten T4-Konzentrationen im „normalen“ Bereich. Es ist nicht auszuschließen, dass bei T4-Konzentrationen unter 1,0 µg/dl ein noch höherer VK für den ELFA ermittelt worden wäre. Er hätte allerdings bei sehr hohen T4-Konzentrationen auch niedriger ausfallen können.

Die Bestimmung der Richtigkeit wurde in der vorliegenden Studie zunächst mit einem Methodenvergleich durchgeführt. Am Einfachsten fällt die Bestimmung der Richtigkeit, wenn es bereits einen Test gibt, der als Referenzmethode oder Goldstandard gilt, und der dann bei der Durchführung eines Methodenvergleichs verwendet wird. Dies ist bspw. bei der Bestimmung des Blutglukosespiegels mittels Hexokinase-Methode (PASSEY et al., 1977; BURRIN und PRICE, 1985) der Fall. Die Ergebnisse der neuen Methode können direkt mit den Ergebnissen der Referenzmethode verglichen werden. Für die Bestimmung der T4-Konzentration im Blut wurde der RIA oft als Goldstandard bezeichnet (GERBER et al., 1994; SINGH et al., 1997; LURYE et al., 2002; PETERSON, 2006). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Europäischen Gesellschaft für Veterinärmedizinische Endokrinologie (European Society of Veterinary Endocrinology, ESVE). Sie rief ein europäisches Qualitätssicherungs-Schema (European Veterinary Endocrine Quality Assurance Scheme, EVE-QAS) ins Leben. Teilnehmende Labors können hierbei Proben, die von der Gesellschaft verschickt werden, auf deren Hormongehalt untersuchen und erhalten Rückmeldungen zu den von ihnen bestimmten Ergebnissen. Sämtliche Proben werden gefriergetrocknet und an die

teilnehmenden Labors versendet; diese sollen die Proben noch am Tag des Eintreffens mit den von ihnen angewandten Analysemethoden untersuchen. Ihre Ergebnisse melden die Labors – zusammen mit Daten zu der von ihnen angewandten Messmethode – in anonymisierter Form an die ESVE. Diese wertet die Ergebnisse aller teilnehmenden Labore vergleichend aus und veröffentlicht sie auf ihrer Homepage (<http://www.esve-payments.org/esve/eve-qas/default.aspx>, aufgerufen am 29.01.2017). Die bislang veröffentlichten Ergebnisse zeigen, dass die Ergebnisse bei fast allen Hormontests nicht nur zwischen den einzelnen Messmethoden, sondern auch innerhalb der gleichen Messmethode variieren. Die, zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit, aktuellsten Ergebnisse von November 2015 zeigen, dass für die T4-Konzentration in der verschickten Probe Werte von 12,2 – 35,3 nmol/l (1 – 2,7 µg/dl) bestimmt wurden. Da alle Labors einen Teil derselben Probe zur Analyse erhalten haben, würde man auch das jeweils gleiche Ergebnis erwarten. Wendet man diese Messwerte bei einem Hund an, würde sich bei Vorliegen der unteren Werte der hochgradige Verdacht auf eine Hypothyreose ergeben. Bei Erhalt von Werten im oberen Bereich wäre hingegen eine Hypothyreose zwar möglich, aber nicht ganz so wahrscheinlich. Die meisten Labore ermittelten eine T4-Konzentration von 18,8 – 25,4 nmol/l (1,5 – 2,0 µg/dl), das entspricht einer Abweichung von bis zu 25 %. Der Variationskoeffizient zwischen allen teilnehmenden Laboren und den von ihnen eingesetzten Messmethoden liegt bei 19,8 %. Diese Zahlen liegen oberhalb der Grenze von 15 %, die in gängigen Leitfäden zur Qualitätsanforderungen bei Bioanalysen ausgegeben wird. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei anderen Hormonuntersuchungen, wie bspw. Insulin, erzielt. Diese Ergebnisse zeigen, dass man bei der Durchführung von Hormonanalysen keine absolute Übereinstimmung der Messergebnisse verschiedener Messmethoden erwarten kann.

Eine Gruppe von Wissenschaftlern erarbeitete einen Leitfaden, anhand welchem ein Methodenvergleich in der klinischen Labormedizin durchgeführt werden sollte (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006; MONTI, 2014). Es handelt sich bei diesem Leitfaden um die so genannte STARD (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy) Initiative (BOSSUYT et al., 2003). Basierend auf diesem Leitfaden wurden die statistischen Untersuchungen für die vorliegende Studie ausgewählt.

Zunächst wurde, wie in der überwiegenden Mehrheit früherer Vergleichsstudien,

die Korrelation zwischen ELFA und EIA bestimmt. Die Korrelation sollte dabei aber nicht als Maß der Übereinstimmung, sondern als Maß der Assoziierung verwendet werden (ALTMAN und BLAND, 1983; BLAND und ALTMAN, 2003). Eine hohe Korrelation der Werte garantiert nicht notwendigerweise auch eine gute Übereinstimmung (ALTMAN und BLAND, 1983; BLAND und ALTMAN, 2003). Der Korrelationskoeffizient sollte vielmehr einen Hinweis darauf geben, ob weiterführende statistische Analysen mittels linearer Regression sinnvoll sind (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). Wenn die Ergebnisse der beiden Methoden keine gute Korrelation aufweisen, kann bereits von einer schlechten Übereinstimmung ausgegangen werden (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). Dies war bei den in dieser Studie ermittelten, signifikanten Korrelationskoeffizienten nach Pearson von $r = 0,58$ bei Hunden und $r = 0,84$ bei Katzen nicht der Fall.

Die Anwendung der Regressionsanalyse nach PASSING und BABLOK (PASSING und BABLOK, 1983) wird bei klinischen Methodenvergleichen als sinnvoll erachtet, da sowohl für die X- als auch die Y-Variable Messfehler auftreten können und keine Annahme zum Auftreten von Messfehlern bei normalverteilten Daten getroffen wird (PASSING und BABLOK, 1984; BABLOK et al., 1988). Zudem wird sie nicht durch das Vorliegen von Extremwerten (Ausreißern) beeinflusst (PASSING und BABLOK, 1983; BABLOK et al., 1988; LUDBROOK, 2010). In einer weiteren Studie wird die Verwendung der Passing-Bablok-Regression bei einem Korrelationskoeffizienten von unter 0,975 empfohlen (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). Allerdings sind mindestens 50 Probensets erforderlich, um eine verlässliche Analyse zu erlauben (LUDBROOK, 2010), was in der vorliegenden Studie mit 126 Hunde- und 121 Katzenproben der Fall war. Dieser Regressionsanalyse geht eine Überprüfung der Linearität mittels CUSUM Test voraus. In der vorliegenden Studie konnten weder beim Hund noch bei der Katze signifikante Abweichungen von der Linearität festgestellt werden. Die Regressionsanalyse zeigte nur für den Hund das Vorliegen eines konstanten Fehlers des ELFA, da das 95 %-Konfidenzintervall der Steigung (0,79 – 0,95) nicht den Wert 1 umfasste. Auch ein proportionaler Fehler lag nur beim Hund für den ELFA vor, da das 95 %-Konfidenzintervall des Schnittpunkts der Regressionsgeraden mit der y-Achse (0,61 – 4,25) nicht den Wert 0 umfasste. Dies war bereits ein erster Anhaltspunkt dafür, dass ELFA und EIA beim Hund

nicht untereinander austauschbar verwendet werden können (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006).

In einer früheren Studie wurden wegen des Vorliegens konstanter Fehler Korrekturfaktoren eingeführt und auf die nachfolgenden Messergebnisse bei Hunden und Katzen angewendet (HORNEY et al., 1999). Dadurch verbesserten sich Korrelationskoeffizient und die Steigung der Regressionsgeraden. Die Übereinstimmung der Methoden wurde in der Studie anhand dieser beiden Faktoren als gut gewertet (HORNEY et al., 1999). Ein Bland-Altman Plot wäre hier sicherlich hilfreich gewesen, die Übereinstimmung der Methoden genauer zu untersuchen, da eine hohe Korrelation, wie bereits ausgeführt, nicht gleichbedeutend mit einer guten Übereinstimmung ist (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). Eine Regressionsanalyse allein ist auch nicht immer aussagekräftig genug, wenn es um die Übereinstimmung zweier Messmethoden geht und keine dieser Methoden als Goldstandard angesehen wird (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). Die Regression versucht dann, den ermittelten Wert von Y anhand des ermittelten Wertes von X vorherzusagen. Der ermittelte Wert ist aber nicht immer gleich dem wahren Wert, und Messfehler beim Wert X führen somit ebenfalls zu einem Fehler beim Wert Y, ohne dass dies bei der Regressionsanalyse als fehlerhaft auffallen würde (BLAND und ALTMAN, 2003).

In früheren Studien zu Validierung oder Methodenvergleich von Messmethoden zur T4-Wertbestimmung bei Hunden und Katzen wurde meistens eine einfache lineare Regressionsanalyse gewählt (LARSSON und LUMSDEN, 1980; SINGH et al., 1997; LURYE et al., 2002; KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006). Dieser Ansatz setzt allerdings voraus, dass die Vergleichsmethode frei von Messfehlern ist und die Messfehler der neuen Methode normalverteilt sind (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006; LUDBROOK, 2010). Die Autoren der genannten Studien gaben alle den RIA als Referenz- oder Standardmethode an und gingen deshalb vermutlich davon aus, dass die mittels RIA bestimmten T4-Konzentrationen nicht fehlerbehaftet seien. Somit erschloss sich für sie kein Grund, eine andere Regressionsanalyse zu verwenden. Heute wird von einer Verwendung der einfachen linearen Regression für Methodenvergleiche in der Bioanalytik abgeraten, da die wenigsten Messmethoden frei von Fehlern sind oder die Messfehler nicht immer normalverteilt sind (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006; LUDBROOK, 2010).

Die Regressionsanalyse nach Deming wurde ebenfalls in vorherigen, neueren Studien verwendet (HORNEY et al., 1999; HIGGS et al., 2014; WILLIAMS und ARCHER, 2016). Wie auch bei der Passing-Bablok Regression wird für beide Variablen X und Y eine Fehlerbehaftung akzeptiert. Diese hat keinen Einfluss auf die Analyse. Im Gegensatz zur Passing-Bablok Regression wird die Deming-Regression von Extremwerten beeinflusst (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006; LUDBROOK, 2010). In der vorliegenden Studie wurde bereits bei der Betrachtung der Rohdaten deutlich, dass es einzelne Extremwerte gibt. Um diese nicht von der statistischen Analyse ausschließen zu müssen, wurde die Passing-Bablok-Regression gewählt.

Die lineare Regressionsanalyse allein ist, wie oben bereits beschrieben, zur Durchführung eines Methodenvergleichs allerdings nicht immer geeignet (BLAND und ALTMAN, 2003; JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006). In der vorliegenden Studie wurden daher zusätzlich Bland-Altman Plots angefertigt. Diese zeigen die Grenzen an, innerhalb welcher sich die Messergebnisse von 95 % aller Proben befinden würden, die mit einer Methode bestimmt werden (ALTMAN und BLAND, 1983; BLAND und ALTMAN, 1986; 2003). Diese Grenzen sind die so genannten „Limits of Agreement“. Sie werden anhand der SD beider Messmethoden ermittelt (ALTMAN und BLAND, 1983; BLAND und ALTMAN, 1986; 2003). Bei Betrachtung der Grenzen unter klinischen Gesichtspunkten kann nun eine Einschätzung dahingehend erfolgen, ob diese Abweichungen klinisch akzeptabel sind. In der vorliegenden Studie wurde die Differenz der Messwerte von EIA und ELFA gegen den Mittelwert der Messwerte aufgetragen. Dieses Vorgehen wird empfohlen, wenn keine der beiden Messmethoden als Goldstandard erachtet wird (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006).

Um in der vorliegenden Studie eine bessere Einordnung der Abweichungen zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse in Prozent angegeben. Für die Bestimmung der T4-Konzentration bei Hunden wurde kein signifikantes Bias zwischen ELFA und EIA festgestellt. Das 95 %-Konfidenzintervall lag allerdings mit Werten von - 71,6 – 74,4 % in einem klinisch inakzeptablen Bereich. Für die Bestimmung der T4-Konzentrationen bei Katzen wurde ebenfalls kein signifikantes Bias zwischen ELFA und EIA festgestellt, allerdings lag das 95 %-Konfidenzintervall (- 81,5 – 58,7 %) wie beim Hund im klinisch inakzeptablen Bereich. Somit konnten ELFA und EIA nicht untereinander austauschbar verwendet werden. Zu ähnlichen

Ergebnissen kamen die Autoren von vier früheren Studien, in denen bereits Testmethoden zur Bestimmung von T4-Konzentrationen bei Hund und Katze verglichen wurden (LURYE et al., 2002; KEMPPAINEN und BIRCHFIELD, 2006; HIGGS et al., 2014; WILLIAMS und ARCHER, 2016). In keinem Fall waren die 95 %-Konfidenzintervalle für sie klinisch akzeptabel. Bei den anderen Validierungsstudien wurden keine Bland-Altman Plots angefertigt.

Wenn beim Vergleich zweier Messmethoden deutlich wird, dass sie nicht untereinander austauschbar verwendet werden können, und die neue Messmethode soll dennoch angewendet werden, so muss für die neue Methode ein eigener Referenzbereich etabliert werden (JENSEN und KJELGAARD-HANSEN, 2006; MONTI, 2014). Ein Leitfaden dazu wurde vom „Clinical Laboratory Standards Institute“ (CLSI) herausgegeben (WAYNE, 2008; GEFFRE et al., 2009; FRIEDRICHS et al., 2012). Es handelt sich dabei um die 95-Perzentil-Methode für nicht-parametrische Daten (WAYNE, 2008). Im Wesentlichen werden darin drei verschiedene Möglichkeiten der Referenzbereichs-Erstellung aufgezeigt: die De-Novo-Erstellung von Referenzbereichen, die Übertragung eines Referenzbereichs einer Methode auf eine andere (neue) Methode und die Validierung von bereits etablierten Referenzbereichen. Die De-Novo-Erstellung von Referenzbereichen stellt dabei die bevorzugte Methode dar (WAYNE, 2008; GEFFRE et al., 2009; FRIEDRICHS et al., 2012). Für die Etablierung eines Referenzbereichs ist eine Population „gesunder“ Individuen in ausreichender Zahl nötig. Bis heute gibt es allerdings keine allgemein gültige Definition von „gesund“, weder im Human-, noch im Veterinärbereich (GEFFRE et al., 2009). Für die Veterinärmedizin wurde daher die Evaluierung von Vorgeschichte und klinischer Untersuchung als minimale Information definiert (FRIEDRICHS et al., 2012). Als Anhaltspunkt für eine ausreichend große Referenzpopulation werden 120 Individuen genannt (WAYNE, 2008; GEFFRE et al., 2009; FRIEDRICHS et al., 2012). Wenn nicht genügend Individuen zur Verfügung stehen, kann auch eine robuste Methode zur Berechnung des Referenzbereichs verwendet werden, wenngleich die Autoren des Leitfadens „zögern, dieses Vorgehen mit weniger als 80 Individuen zu empfehlen“ (WAYNE, 2008). In der vorliegenden Studie standen 121 gesunde Hunde für die Erstellung des Referenzbereichs des ELFA zur Verfügung. Bei der Katze konnte nur auf 81 gesunde Tiere zurückgegriffen werden, daher wurde hier eine robuste Methode zur Berechnung des Referenzbereichs gewählt. Das mediane Alter der

untersuchten Hunde betrug 4 Jahre und das der Katzen 11 Jahre. Damit wurde der Forderung nachgekommen, die Referenzpopulation „gemäß der demografischen Patientenpopulation, auf welche die Methode angewendet wird“ (FRIEDRICHS et al., 2012) auszuwählen. Die in dieser Studie berechneten Referenzbereiche des ELFA sind etwas enger als die vom Labor verwendeten Referenzbereiche für den EIA. In dieser Studie wurde kein eigener Referenzbereich für den EIA etabliert. Die vom Labor verwendete Referenzpopulation ist unbekannt. PETERSON und Mitarbeiter (1997) etablierten ebenfalls Referenzbereiche für das von ihnen untersuchte RIA-System. Sie konnten dabei auf 150 gesunde Hunde mit einem medianen Alter von 5 Jahren zurückgreifen (PETERSON et al., 1997). HIGGS und Mitarbeiter (2014) etablierten Referenzbereiche für Hunde und Katzen für das von ihnen untersuchte FEIA-System. Allerdings konnten sie nur auf eine Referenzpopulation von 66 Hunden und 27 Katzen zurückgreifen (HIGGS et al., 2014). Sie verwendeten zwar eine robuste Methode zur Berechnung, jedoch ist nach dem CLSI-Leitfaden fraglich, ob diese Berechnung Gültigkeit besitzt. Der Hersteller des FEIA hatte allerdings bereits Referenzbereiche für Hunde (1,0 – 4,0 µg/dl) und Katzen (0,7 – 4,3 µg/dl) angegeben und diese unterschieden sich nur geringfügig von den berechneten Referenzbereichen des Hundes (0,9 – 3,5 µg/dl) und etwas stärker von denen der Katze (1,0 – 3,5 µg/dl) (HIGGS et al., 2014). WILLIAMS und Mitarbeiter (2016) etablierten einen Referenzbereich speziell für ältere Katzen mit einem medianen Alter von 14,5 Jahren. Sie konnten ebenfalls nur auf eine geringe Anzahl von 49 Referenztieren zurückgreifen, wodurch die Gültigkeit des berechneten Referenzbereichs ebenfalls in Frage gestellt wird (WILLIAMS und ARCHER, 2016). Generell muss daran erinnert werden, dass für jedes Gerät, auch wenn es ein bereits etabliertes Analyseprinzip (bspw. EIA) verwendet, ein eigenständiger Referenzbereich etabliert werden sollte (WAYNE, 2008).

Da die Bland-Altman Plots in der vorliegenden Studie keine untereinander unabhängige Verwendung der beiden Messmethoden erlaubten und es, wie bereits dargelegt, keinen Goldstandard zur Messung von Gesamt-T4 bei Hund und Katze gibt, wurde eine eigenständige Validierung des ELFA durchgeführt. Da bei der Evaluierung einer Methode die klinische Signifikanz der Richtigkeit der Methode am wichtigsten ist (CLARKE et al., 1987), wurden die untersuchten Tiere anhand ihrer klinischen Präsentation und den Daten zur Krankheitsvorgeschichte, weiteren

durchgeführten Untersuchungen (v.a. Blutuntersuchungen und weiteren Hormontests wie endogenes TSH und oder freies T4) und ggf. anhand des Ansprechens auf die eingeleitete Therapie als Patienten eingestuft, bei denen entweder erniedrigte, normale oder erhöhte T4-Konzentrationen erwartet wurden. Für den ELFA wurden die in dieser Studie erstellten Referenzwerte verwendet. Für den EIA wurden die vom Labor erstellten Referenzbereiche (1,0 – 4,0 µg/dl beim Hund und 1,0 – 4,8 µg/dl bei der Katze) verwendet. Es wurde dann untersucht, wie häufig die beiden Methoden ELFA und EIA ein Ergebnis erzielten, welches dieser klinischen Einschätzung entsprach. Hierbei wurde also untersucht, ob beide Testmethoden einen gewissen T4-Wertebereich (normal, erniedrigt, erhöht) erfassen. Beim Hund konnten anhand der o.g. Daten bei 50 von 176 Tieren eine Vorhersage des T4-Wertes getroffen werden. Die Tiere wurden folgenden Gruppen zugeordnet: gesunde Tiere (normaler T4-Wert), Tiere mit NTI (normaler oder erniedrigter T4-Bereich), behandelte und gut eingestellte (normaler bis leicht erhöhter T4-Bereich) und nicht behandelte hypothyreote Tiere (erniedrigter T4-Wert), sowie iatrogen hyperthyreote (erhöhter T4-Wert) Tiere. Die bestimmten T4-Konzentrationen mittels EIA stimmten in 100 % aller Fälle mit den erwarteten T4-Konzentrationsbereichen überein, die mittels ELFA bestimmten T4-Konzentrationen in 94 % der Fälle. Bei der Katze konnte bei 75 von 122 Tieren eine Vorhersage des T4-Wertes getroffen werden. Bei diesen Tieren wurde zwischen gesunden Tieren (normaler T4-Wert) und Tieren mit NTI (normaler bis leicht erniedrigter T4-Bereich) sowie Tieren mit behandelter (normaler bis leicht erniedrigter T4-Bereich) oder unbehandelter (erhöhter T4-Wert) Hyperthyreose unterschieden. Die bestimmten T4-Konzentrationen mittels EIA stimmten hier in 97 % der Fälle überein und mittels ELFA in 92 % der Fälle. Daraus kann gefolgert werden, dass aus klinischer Sicht sowohl EIA als auch ELFA für die Bestimmung von T4 bei Hunden und Katzen geeignet sind, da beide Tests > 90 % der Patienten richtig zuordnen konnten.

Bei den anderen Patienten dieser Studie war eine retrospektive Einschätzung bezüglich des zu erwartenden T4-Wertes nicht mit hinreichender Sicherheit möglich, da entweder keine weiteren Hormonanalysen zur Bestimmung der Schilddrüsenfunktion (endogenes TSH und oder freiem T4 (gemessen mit der Equilibriumsdialyse)) durchgeführt worden waren, die Tiere unter weiteren Erkrankungen litten oder keine Daten zu Kontrolluntersuchungen vorlagen.

Eine solch ausführliche Einschätzung des klinischen-labordiagnostischen Status der untersuchten Tiere ist bisher in keiner der bisher veröffentlichten Validierungsstudien für die Messung von caninem oder felinem T4 durchgeführt worden. Eine weitere Studie, in der mit einem klinischen Score gearbeitet wurde, war die von PETERSON und Mitarbeitern (1997). Sie hatten bei 54 der 258 in der Studie untersuchten Hunden auf Basis von klinischen Symptomen, routinemäßig durchgeführten Laboruntersuchungen, TSH-Stimulationstests, Ausschluss von NTI und gutem Ansprechen auf Substitutionstherapie mit L-Thyroxin eine Hypothyreose diagnostiziert (PETERSON et al., 1997). Die Ergebnisse des von ihnen verwendeten RIA stimmten in 85 % der Fälle mit der Zuordnung eines hypothyreoten oder euthyreoten Zustandes überein (PETERSON et al., 1997).

Einige Autoren verwendeten einen TSH-Stimulationstest, um einen klinisch-labordiagnostischen Aspekt zur Validierung in ihre Auswertung einzubetten. So führten LARSSON und LUMSDEN (1980), REIMERS und Mitarbeiter (1981) sowie SINGH und Mitarbeiter (1997) diesen Test bei – zuvor als gesund definierten – Tieren durch. JENSEN und Mitarbeiter (1992) verwendeten einen TRH-Stimulationstest. Bei allen Tieren konnte ein signifikanter Anstieg der T4-Konzentration nach Stimulation mittels der verwendeten Messsysteme nachgewiesen werden. Dies wurde einheitlich als zusätzlicher Beweis dafür angesehen, dass das jeweils untersuchte Messsystem für die untersuchte Tierart eingesetzt werden kann (LARSSON und LUMSDEN, 1980; REIMERS et al., 1981; JENSEN et al., 1992; SINGH et al., 1997). Bei als gesund definierten Katzen wurden ein T3-Suppressionstest (SINGH et al., 1997) oder eine Thyreoidektomie (REIMERS et al., 1981) durchgeführt. In beiden Studien konnte ein Abfall der T4-Konzentration nachgewiesen werden, was auch hier als weiterer Beweis für die klinische Nutzbarkeit der Messsysteme gewertet wurde (REIMERS et al., 1981; SINGH et al., 1997). Diese Argumentation ist jedoch nicht sehr akkurat. Die Tatsache, dass mit einem Messsystem der Anstieg oder der Abfall eines zu untersuchenden Analyten gemessen werden kann, sagt nichts über die Richtigkeit der Methode an sich aus. Die bestimmten T4-Konzentrationen können für sich genommen trotzdem, auch aus klinisch-labordiagnostischer Sicht, inakkurat sein. Hinzu kommt, dass in den genannten Studien kein klinischer Status der untersuchten Tiere und auch keine weiteren labordiagnostischen Untersuchungen genannt werden, die die Richtigkeit der ermittelten Werte unterstreichen würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der ELFA, durchgeführt mit dem Vidas® T4 Test und analysiert auf dem miniVidas® Automated Analyzer, aufgrund seiner guten Werte für Präzision und Richtigkeit, für die Bestimmung von T4 im Serum von Hunden und Katzen eingesetzt werden kann. Die In-house Methode liefert innerhalb von 45 Minuten ein Ergebnis und bietet dadurch dem Tierarzt den Vorteil, eine Einschätzung oder sogar Diagnose während des Praxisbesuches zu stellen und mit dem Besitzer zu besprechen. Der Zeitaufwand zum Verschicken einer Blutprobe und für ein Besitzertelefonat zum Durchgeben der Befunde entfällt.

Die bestimmten VK für den ELFA waren mit unter 10 % sehr gut. Die Abweichungen der Messergebnisse von ELFA und einem validierten EIA lassen keine untereinander austauschbare Verwendung der Systeme zu. Für den ELFA wurden eigene Referenzbereiche für die Bestimmung der T4-Konzentration bei Hund und Katze bestimmt. Diese sind ähnlich zu den für den EIA berichteten Referenzbereichen. Anhand einer klinisch-labordiagnostischen Einschätzung von 50 Hunden und 75 Katzen wurde der zu erwartende T4-Wert dieser Tiere als erniedrigt, normal oder erhöht eingestuft. Dann wurde überprüft, wie häufig EIA und ELFA eine T4-Konzentration ermittelten, die mit der erwarteten T4-Konzentration übereinstimmte. Die Ergebnisse des ELFA stimmten bei 92 % der Katzen und 94 % der Hunde mit dem erwarteten Wert überein. Die Ergebnisse des EIA stimmten bei 97 % der Katzen und bei 100 % der Hunde mit dem erwarteten Wert überein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Als erster diagnostischer Schritt zur Abklärung einer Schilddrüsenfunktionsstörung hat sich die Bestimmung des Gesamt-Thyroxins (T4) etabliert. Die Bestimmung des Gesamt-T4 wird beim Hund meistens zum Ausschluss einer Hypothyreose oder zur Therapiekontrolle bei Substitution mit Schilddrüsenhormonen verwendet. Bei Katzen reicht die Feststellung einer erhöhten T4-Konzentration zur Diagnose einer Hyperthyreose aus, wenn ein entsprechender klinischer Verdacht besteht. Ziel dieser Studie war es, einen enzyme-linked fluorescence assay (enzymgebundenen Fluoreszenz-Assay, ELFA) zur Bestimmung von caninem und felinem T4 als In-house-Methode prospektiv zu evaluieren. Die neue Methode wurde mit einem etablierten enzyme immunoassay (Enzym-Immunoassay, EIA) verglichen. Da bisher mehrere Methoden zur Messung von caninem und felinem T4 validiert wurden und es keinen Goldstandard gibt, wurden die Ergebnisse beider Nachweismethoden in einem zweiten Schritt mit einer klinisch-labordiagnostischen Einschätzung der Schilddrüsenfunktion bestehend aus den Daten der Vorgeschichte, klinischen Untersuchung, den Ergebnissen weiterer labordiagnostischer Parameter und Hormonwerten sowie dem Ansprechen auf eine Therapie der untersuchten Tiere überprüft. Hierfür wurden Referenzbereiche für die neue Methode etabliert.

Für den Methodenvergleich wurden Serumproben von 176 Hunden und 122 Katzen mittels EIA und ELFA analysiert. Eine klinisch-labordiagnostische Einschätzung der Schilddrüsenfunktion konnte bei 50 Hunden und 75 Katzen getroffen werden. Zur Erstellung der Referenzbereiche konnten Serumproben von weiteren 121 gesunden Hunden und 81 gesunden Katzen untersucht werden. Für die Bestimmung der Präzision wurden Mehrfachmessungen auf beiden Systemen durchgeführt und der VK berechnet. Die Korrelation der Messwerte des EIA und des ELFA wurde nach der Methode von Pearson bestimmt. Mittels CUSUM Test wurden die Daten auf Linearität überprüft, und mittels Regressionsanalyse nach Passing-Bablok und der Erstellung von Bland-Altman Plots die Übereinstimmung der beiden Messmethoden untersucht.

Die Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision betrug bei Katzenserum 3,4 % und 2,4 % für den ELFA sowie 7,5 % und 15,7 % für den EIA. Bei Hundeseren lagen sowohl Intra-Assay- als auch Inter-Assay-Präzision bei < 9,5 % für ELFA und EIA.

Die Korrelationskoeffizienten waren $r = 0,58$ beim Hund und $r = 0,84$ bei der Katze. Der CUSUM Test zeigte keine signifikanten Abweichungen von der Linearität. Die Regressionsanalyse nach Passing-Bablok zeigte, dass beide Methoden nicht untereinander austauschbar verwendet werden konnten. Dies wurde durch die Bland-Altman Plots bestätigt. Das mittlere Bias lag zwar nur bei 1,4 für Hunde und -11,4 für Katzen, jedoch waren die 95 % Übereinstimmungsgrenzen mit -71,6 – 74,4 % bei Hunden und -81,5 – 58,7 % bei Katzen sehr weit und klinisch damit nicht akzeptabel. Daher wurde eine klinisch-labordiagnostische Validierung des ELFA nach Etablierung von Referenzbereichen angeschlossen. Die Referenzbereiche wurden nach der 95-Perzentil-Methode für nicht-parametrische Daten errechnet und lauten für den ELFA 10,1 – 42,9 nmol/l (0,8 – 3,3 µg/dl) bei Hunden und 13,3 – 49,5 nmol/l (1,0 – 3,8 µg/dl) bei Katzen. Bei der Überprüfung der Messergebnisse mit der zuvor genannten klinisch-labordiagnostischen Einschätzung, bei der untersucht wurde, ob die Testsysteme erniedrigte, normale oder erhöhte T4-Konzentrationen richtig erfassen, stimmten die Ergebnisse beim Hund in 100 % (EIA) bzw. 94 % (ELFA) der Fälle überein, bei der Katze in 97 % (EIA) bzw. 92 % (ELFA) der Fälle.

Somit kann der ELFA, durchgeführt mit dem Vidas® T4 Test und analysiert auf dem miniVidas® Automated Analyzer, als In-house-Methode für die Bestimmung von T4 im Serum von Hunden und Katzen eingesetzt werden.

VI. SUMMARY

Measurement of baseline total thyroxine (T4) concentration has become a valuable tool for the initial evaluation of thyroid function. In cats suspected of being hyperthyroid, an increased T4 concentration confirms the diagnosis if appropriate clinical signs are present. In dogs, T4 measurement is most often used to exclude a diagnosis of hypothyroidism or to assess the treatment response to thyroxine replacement therapy. The aim of this study was to evaluate an enzyme-linked fluorescence assay (ELFA) method for the in-house measurement of T4 concentrations in feline and canine serum. It was compared to an established EIA method that had been validated previously.

Various methods for measurement of canine and feline T4 have been validated. As there is no “gold standard” available, the accuracy of the EIA and ELFA methods was evaluated by assessing if the measured T4 concentration would identify the expected T4 range (low, normal, or elevated) of patients, based on history, clinical presentation, other laboratory and endocrine parameters, and response to therapy. For this purpose, reference intervals (RI) were established for the ELFA method.

For the method comparison study, the T4 concentration in sera of 122 cats and 176 dogs was determined by both the ELFA and EIA method. Upon examination of patient records it was possible to predict the T4 range (low, normal, elevated) in 50 dogs and 75 cats. It was then assessed if the T4 values measured with the ELFA would match the expected T4 range in these animals. An additional 81 healthy cats and 121 healthy dogs were available for calculation of a RI. The coefficient of variation (CV) was calculated from multiple measurements of cat and dog sera with both methods. Pearson’s correlation coefficient was calculated and CUSUM Test for linearity was performed. Concordance of both methods was assessed by Passing-Bablok regression analysis and the construction of Bland-Altman Plots.

The CV for intra-assay and inter-assay in cats were 3.4% and 2.4% for the ELFA and 7.5% and 15.7% for the EIA, respectively. In dogs, both the CV for intra-assay and inter-assay were < 9.5% for ELFA and EIA, respectively. Correlation coefficients were $r = 0.84$ in cats and $r = 0.58$ in dogs. The CUSUM Test showed no significant deviations from linearity. Passing-Bablok regression showed that both methods cannot be used interchangeably. This was further supported by

construction of Bland-Altman Plots. The mean bias was -11.4 in cats and 1.4 in dogs. However, the 95% limits of agreement were -81.5 – 58.7% in cats and - 71.6 – 74.4% in dogs. This was clinically not acceptable. Thus a full validation of the EFLA method was performed. The RI was calculated by the 95% nonparametric ranking method. It was 13.3 – 49.5 nmol/l (1.0 – 3.8 µg/dl) for cats and 10.1 – 42.9 nmol/l (0.8 – 3.3 µg/dl) for dogs.

When assessing if the measured T4 concentration would identify the expected T4 range of patients, concordant results were obtained in 97% (EIA) and 92% (ELFA) of cats, and in 100% (EIA) and 94% (ELFA) of dogs, respectively.

Overall, the ELFA method, performed with the Vidas® T4 Test and analyzed on the miniVidas® Automated Analyzer, can be used as an in-house method for the determination of T4 in canine and feline sera.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Albrecht H. Chemiluminescence of aminophthalic hydrazide. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 1928; 136: 321.

Altman DG, Bland JM. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *The Statistician* 1983; 32: 307-17.

Anderson JH, Brown RE. Serum thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) uptake values in normal adult cats as determined by radioimmunoassay. *American Journal of Veterinary Research* 1979; 40: 1493-4.

Bablok W, Passing H, Bender R, Schneider B. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1988; 26: 783-90.

Babson AL, Olson DR, Palmieri T, Ross AF, Becker DM, Mulqueen PJ. The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. *Clinical Chemistry* 1991; 37: 1521-2.

Beale KM. Current diagnostic techniques for evaluating thyroid function in the dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1990; 20: 1429-41.

Behrend EN, Kemppainen RJ, Young DW. Effect of storage conditions on cortisol, total thyroxine, and free thyroxine concentrations in serum and plasma of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1998; 212: 1564-8.

Belshaw RA. Radioimmunoassay of plasma T4 and T3 in the diagnosis of primary hypothyroidism in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1979; 15: 17-23.

Berson SA, Yalow RS. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *Journal of Clinical Investigation* 1959; 38: 1996-2016.

Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet* 1986; 327: 307-10.

Bland JM, Altman DG. Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2003; 22: 85-93.

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Lijmer JG, Moher D, Rennie D, de Vet HC. Toward complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy. The STARD initiative. *American Journal of Clinical Pathology* 2003; 119: 18-22.

Brugger N, Otzdorff C, Walter B, Hoffmann B, Braun J. Quantitative determination of progesterone (P4) in canine blood serum using an enzyme-linked fluorescence assay. *Reproduction in domestic animals* 2011; 46: 870-3.

Burrin JM, Price CP. Measurement of blood glucose. *Annals of Clinical Biochemistry* 1985; 22: 327-42.

Chastain CB. Canine hypothyroidism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1982; 181: 349-53.

Clarke WL, Cox D, Gonder-Frederick LA, Carter W, Pohl SL. Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood glucose. *Diabetes Care* 1987; 10: 622-8.

Dewhurst EC, Crawford E, Cue S, Dodkin S, German AJ, Pappasoulitis K. Analysis of canine and feline haemograms using the VetScan HMT analyser. *Journal of Small Animal Practice* 2003; 44: 443-8.

Dodeigne C, Thunus L, Lejeune R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta* 2000; 51: 415-39.

Dudley RF. Chemiluminescence immunoassay: an alternative to RIA. *Laboratory*

Medicine 1990; 21: 216-22.

Eckersall PD, McEwan NA, Mooney C. An assessment of the CITE T4 immunoassay. *Veterinary Record* 1991; 129: 532-3.

Eckfeldt JH, Copeland KR. Accuracy verification and identification of matrix effects. The College of American Pathologists' Protocol. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 1993; 117: 381-6.

Ekins R, Chu F, Micallef J. High specific activity chemiluminescent and fluorescent markers: their potential application to high sensitivity and 'multi-analyte' immunoassays. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 1989; 4: 59-78.

Ferguson DC. Thyroid function tests in the dog. Recent concepts. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1984; 14: 783-808.

Ferguson DC. Testing for hypothyroidism in dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2007; 37: 647-69.

Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology* 2012; 41: 441-53.

Geffre A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. Reference values: a review. *Veterinary Clinical Pathology* 2009; 38: 288-98.

Gerber H, Peter H, Ferguson DC, Peterson ME. Etiopathology of feline toxic nodular goiter. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1994; 24: 541-65.

Gleu K, Petsch W. Die Chemilumineszenz der Dimethyl-diacridyliumsalze.

Angewandte Chemie 1935; 48: 57-9.

Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clinical Chemistry* 1986; 32: 470-5.

Graves TK, Peterson ME. Diagnostic tests for feline hyperthyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1994; 24: 567-76.

Higgs P, Costa M, Freke A, Papasouliotis K. Measurement of thyroxine and cortisol in canine and feline blood samples using two immunoassay analysers. *Journal of Small Animal Practice* 2014; 55: 153-9.

Hoffmann B, Kyrein HJ, Ender ML. An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma. *Hormone Research* 1973; 4: 302-10.

Hoffmann B, Hoveler R, Hasan SH, Failing K. Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. *Journal of Reproduction and Fertility* 1992; 96: 837-45.

Horney BS, MacKenzie AL, Burton SA, Olexson DW, Mitton KL, Coty WA, Rinne SG. Evaluation of an automated, homogeneous enzyme immunoassay for serum thyroxine measurement in dog and cat serum. *Veterinary Clinical Pathology* 1999; 28: 20-8.

Jensen AL, Hoier R, Poulsen JS. Adaptation of a commercially available enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of thyroxine in canine plasma samples. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* 1992; 39: 741-6.

Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Veterinary Clinical Pathology* 2006; 35: 276-86.

Kantrowitz LB, Peterson ME, Melian C, Nichols R. Serum total thyroxine, total triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations in dogs with

nonthyroidal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001; 219: 765-9.

Kemppainen RJ, Sartin JL. Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *Journal of Endocrinology* 1984; 103: 219-26.

Kemppainen RJ, Behrend EN. Diagnosis of canine hypothyroidism. Perspectives from a testing laboratory. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2001; 31: 951-62.

Kemppainen RJ, Birchfield JR. Measurement of total thyroxine concentration in serum from dogs and cats by use of various methods. *American Journal of Veterinary Research* 2006; 67: 259-65.

Kennedy RL, Thoday KL. Autoantibodies in feline hyperthyroidism. *Veterinary Record* 1984; 114: 575.

Kohler I, Ballhausen BD, Stockhaus C, Hartmann K, Wehner A. Prevalence of and risk factors for feline hyperthyroidism among a clinic population in Southern Germany. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere* 2016; 44: 149-57.

Kopecky KR, Mumford C. Luminescence in the thermal decomposition of 3, 3, 4-trimethyl-1, 2-dioxetane. *Canadian Journal of Chemistry* 1969; 47: 709-11.

Kricka LJ. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clinical Chemistry* 1991; 37: 1472-81.

Kyzar JR, Chester DK, Hightower D. Comparison of T-3, T-4 tests and radioactive iodine uptake determinations in the dog. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician* 1972; 67: 321-2.

Larsson M, Lumsden JH. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay

(ELISA) for determination of plasma thyroxine in dogs. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* 1980; 27: 9-15.

Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 2005; 51: 2415-8.

Ludbrook J. Linear regression analysis for comparing two measurers or methods of measurement: but which regression? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2010; 37: 692-9.

Lurye JC, Behrend EN, Kempainen RJ. Evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative measurement of serum total thyroxine concentration in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2002; 221: 243-9.

McCapra F, Richardson D. The mechanism of chemiluminescence: a new chemiluminescent reaction. *Tetrahedron Letters* 1964; 5: 3167-72.

McLean JL, Lobetti RG, Schoeman JP. Worldwide prevalence and risk factors for feline hyperthyroidism: A review. *Journal of the South African Veterinary Association* 2014; 85: 1097.

Miles LE, Hales CN. Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature* 1968; 219: 186-9.

Monti P. Method of comparison-making the right choice. *Journal of Small Animal Practice* 2014; 55: 125-6.

Nachreiner RF, Refsal KR. Radioimmunoassay monitoring of thyroid hormone concentrations in dogs on thyroid replacement therapy: 2,674 cases (1985-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992; 201: 623-9.

Nesbitt GH, Izzo J, Peterson L, Wilkins RJ. Canine hypothyroidism: a retrospective

study of 108 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1980; 177: 1117-22.

Papasouliotis K, Dodkin S, Murphy K, Woloszczuk G, Fleming M. Analysis of canine and feline blood samples using the Kuadro in-house wet-reagent chemistry analyser. *Journal of Small Animal Practice* 2006; 47: 190-5.

Papasouliotis K, Dodkin S, Murphy KF, Sladen A. Comparison of measurements of 18 analytes in canine and feline blood samples using the in-practice Falcor 350 and the reference KoneLab 30i analysers. *Journal of Small Animal Practice* 2008; 49: 494-501.

Passey RB, Gillum RL, Fuller JB, Urry FM, Giles ML. Evaluation and comparison of 10 glucose methods and the reference method recommended in the proposed product class standard (1974). *Clinical Chemistry* 1977; 23: 131-9.

Passing H, Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1983; 21: 709-20.

Passing H, Bablok W. Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part II. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1984; 22: 431-45.

Peterson M, Johnson G, Andrews L. Spontaneous hyperthyroidism in the cat. *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine Forum*; 1979: 108.

Peterson M, DeMarco D, Sheldon K. Total thyroxine testing: Comparison of an in-house test-kit with radioimmuno and chemiluminescent assays [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2003; 17: 396.

Peterson ME, Kintzer PP, Cavanagh PG, Fox PR, Ferguson DC, Johnson GF, Becker DV. Feline hyperthyroidism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 131 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1983; 183: 103-10.

Peterson ME. Feline hyperthyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1984; 14: 809-26.

Peterson ME, Graves TK, Cavanagh I. Serum thyroid hormone concentrations fluctuate in cats with hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1987; 1: 142-6.

Peterson ME, Broussard JD, Gamble DA. Use of the thyrotropin releasing hormone stimulation test to diagnose mild hyperthyroidism in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1994; 8: 279-86.

Peterson ME, Melian C, Nichols R. Measurement of serum total thyroxine, triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations for diagnosis of hypothyroidism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1997; 211: 1396-402.

Peterson ME, Melian C, Nichols R. Measurement of serum concentrations of free thyroxine, total thyroxine, and total triiodothyronine in cats with hyperthyroidism and cats with nonthyroidal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001; 218: 529-36.

Peterson ME. Diagnostic tests for hyperthyroidism in cats. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 2006; 21: 2-9.

Peterson ME. More than just T(4): diagnostic testing for hyperthyroidism in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2013; 15: 765-77.

Peterson ME, Guterl JN, Nichols R, Rishniw M. Evaluation of Serum Thyroid-

Stimulating Hormone Concentration as a Diagnostic Test for Hyperthyroidism in Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2015; 29: 1327-34.

Radziszewski B. Untersuchungen über Hydrobenzamid, Amarin und Lophin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 1877; 10: 70-5.

Reimers TJ, Cowan RG, Davidson HP, Colby ED. Validation of radioimmunoassay for triiodothyronine, thyroxine, and hydrocortisone (cortisol) in canine, feline, and equine sera. *American Journal of Veterinary Research* 1981; 42: 2016-21.

Reimers TJ, McCann JP, Cowan RG, Concannon PW. Effects of storage, hemolysis, and freezing and thawing on concentrations of thyroxine, cortisol, and insulin in blood samples. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1982; 170: 509-16.

Reimers TJ, McCann JP, Cowan RG. Effects of storage times and temperatures on T3, T4, LH, prolactin, insulin, cortisol and progesterone concentrations in blood samples from cows. *Journal of Animal Science* 1983; 57: 683-91.

Reimers TJ, Lamb SV, Bartlett SA, Matamoros RA, Cowan RG, Engle JS. Effects of hemolysis and storage on quantification of hormones in blood samples from dogs, cattle, and horses. *American Journal of Veterinary Research* 1991; 52: 1075-80.

Rongen H, Hoetelmans R, Bult A, Van Bennekom W. Chemiluminescence and immunoassays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1994; 12: 433-62.

Roswell DF, White EH. The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods in Enzymology* 1978; 57: 409-23.

Rutland BE, Nachreiner RF, Kruger JM. Optimal testing for thyroid hormone concentration after treatment with methimazole in healthy and hyperthyroid cats.

Journal of Veterinary Internal Medicine 2009; 23: 1025-30.

Schroeder HR, Yeager FM. Chemiluminescence yields and detection limits of some isoluminol derivatives in various oxidation systems. *Analytical Chemistry* 1978; 50: 1114-20.

Shiel RE, Mooney CT. Testing for hyperthyroidism in cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2007; 37: 671-91.

Singh AK, Jiang Y, White T, Spassova D. Validation of nonradioactive chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats, and horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1997; 9: 261-8.

Smith DS, Pourfarzaneh M, Kamel RS. Linear regression analysis by Deming's method. *Clinical Chemistry* 1980; 26: 1105-6.

Wayne P. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline. 3rd edition. CLSI document C28-A3c. Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.

Williams TL, Archer J. Validation of an automated enzyme immunoassay for the measurement of serum total thyroxine in cats. *Veterinary Clinical Pathology* 2016; 45: 148-53.

Wood WG. "Matrix effects" in immunoassays. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplement* 1991; 205: 105-12.

Yalow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 1959; 184: 1648-9.

VIII. DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in meiner Zeit als Doktorand und bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ralf S. Müller, herzlich für die Unterstützung und Betreuung während des Verfassens meiner Doktorarbeit bedanken. Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann, die es mir ermöglicht hat, meine Dissertation in der Medizinischen Kleintierklinik zu schreiben und als Tierarzt in der Klinik tätig zu sein.

Mein besonderer Dank geht an meine Betreuerin Frau Dr. Astrid Wehner für ihre allgegenwärtige und herausragende Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit. Ihre Ideen und Korrekturen waren mir eine unermessliche Hilfe.

Besonders möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Sven Reese für seine Unterstützung und seinen Einsatz bei der statistischen Auswertung bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an meine ehemaligen Kollegen für ihre Unterstützung und die gemeinsame Zeit in der Klinik. Ohne eure Hilfe beim Sammeln und Bearbeiten der Proben wäre mir die Arbeit wesentlich schwerer gefallen.

Zu guter Letzt gilt mein Dank allen nicht namentlich Erwähnten, die mit vielen kleineren Hilfestellungen und Gesprächen zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.