

Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie e.V.

M I T T E I L U N G E N

INHALTSVERZEICHNIS

Spezielle Klinisch-chemische Methoden

K. Horn, J. Henner und P. C. Scriba: Klinisch-chemische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik	29
II. Automatisierter T ₃ - in vitro-Test R. Wepler und H. Burkhardt: Die Bestimmung von Hydroxyprolin im Urin und in Geweben	34

Tagungsberichte

Bericht über die Tagung „Biochemie und Klinische Chemie angeborener und erworbener Stoffwechseldefekte“ vom 22. - 24. Oktober 1970 in Bad Neuenahr	37
Bericht über das Merck-Symposium 1970 in Zusammenarbeit mit der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie: Auftrag der Klinik an das klinisch-chemische Laboratorium	38

Nachrichten für die Mitglieder der Gesellschaft

Meßtemperatur 25°C bei Enzymaktivitätsbestimmungen	40
Ringversuch der Laboratorien	40
Ausschreibung des Schöller-Junkmann-Preises und des Marius-Tausk-Förderpreises	41
Ständige Kommissionen, Änderung der Kommission Fachnormenausschuß Medizin	41
„Analytical Quality Control Services“ der „Internationalen Atomenergie-Behörde“	41
Stellenausschreibung	XXIII

Wer bestimmt was?	42
-------------------	----

Neues aus der Industrie

Aquademat der Fa. Hecht, Sondheim	
Ionen-selektive Elektroden der Fa. Günter Schmidt, Hamburg	
Knauer-Dampfdruck-Osmometer	44

Tagungskalender	IV
-----------------	----

Zeitschriftenübersicht	IX - XIV u. XXVII - XXXVIII
------------------------	-----------------------------

Current Contents Schmunzelecke	XXXIX
--------------------------------	-------

Herausgeber: Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie

Schriftleitung: Prof. Dr. H. Schivelbein, 8 München 15, Nussbaumstraße 20,
Telefon (08 11) 53 99 11 / 632

Verlag und Anzeigen-Verwaltung: Karl Demeter, 8032 Gräfelfing, Würmstr. 13,
Tel. (08 11) 85 23 33, Telex 05-24 068 delta d

Druck: Wegele & Sohn, 8032 Gräfelfing, Irminfriedstraße 1, Tel. (08 11) 85 21 51

Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie e.V.

Mitteilungen Heft 2/1971

SPEZIELLE KLINISCH-CHEMISCHE METHODEN

Klinisch-chemische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik

II. Automatisierter T₃- in vitro-Test *

Von K. Horn, J. Henner und P. C. Scriba

Laboratorien für Klinische Chemie und Endokrinologie der II. Medizinischen Klinik der Universität München

1. Prinzip der Methode

Die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T₃) und Thyroxin (T₄) sind im Serum zu über 99 % proteingebunden, aber nur der Anteil der freien Hormone, der nur einen Bruchteil von 1 % ausmacht, ist biologisch aktiv. Zur direkten Messung dieses freien Schilddrüsenhormonanteils wurden Dialyse-, Präzipitations- und Ultrazentrifugationstechniken beschrieben. Diese Verfahren sind aber technisch aufwendig und wurden bisher routinemäßig kaum eingesetzt. Zur indirekten Erfassung der Proteinbindung der Schilddrüsenhormone werden heute hauptsächlich die T₃- in vitro-Tests benutzt. Diese Bestimmung wird als Ergänzung zur Messung des Gesamtschilddrüsenhormongehaltes im Serum (PB¹²⁷I oder Gesamt-Thyroxinbestimmung) unbedingt benötigt, wenn die schilddrüsenhormonbindenden Serumproteine verändert sind (1, 2), wie z. B. bei Antiovalantienbehandlung etc. Allen T₃- in vitro-Tests ist gemeinsam, daß nicht die tatsächliche Konzentration an freiem Trijodthyronin im Serum gemessen wird, sondern vielmehr die Verteilung des radioaktiv markierten Hormons zwischen den Serumproteinen einerseits und Ionenaustauschern, Dextrangel oder anderen Adsorbentien andererseits. Bei uns hat sich die Dextrangelfiltration zur Bestimmung des proteingebundenen und sog. freien T₃- ¹²⁵J bewährt (1, 3). Wegen der ständig steigenden Zahl der Anforderungen und zur besseren Standardisierung haben wir diese Methode automatisiert. Hierdurch wurde es bei uns möglich, wirtschaftlich günstig mehr als 100 Bestimmungen täglich von einer Technischen Assistentin durchführen zu lassen.

*) Teil I (Bestimmung des proteingebundenen Jods im Serum (PB¹²⁷I) s. Heft 5/1970

**) Gerät demnächst lieferbar (Fa. Sartorius, Membranfilter GmbH, Göttingen)

2. Reagenzien:

1. Trijodthyronin-¹²⁵Jod-Arbeitsstandard:
0,2 mCi Liothyronine-¹²⁵I (Radiochemical Center Amersham, England) in ca. 1 ml 50%iger wäßriger Propylenglycol-Lösung, spezifische Aktivität 20–50 mCi/mg T₃, werden mit 0,06 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf 250 ml verdünnt. Diese Standardlösung wird in Portionen im Kühlraum bei +4 °C aufbewahrt.
2. 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4.
3. Sephadex G-25 fine (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden).
4. Nachwaschserum: Rinderserum oder Serum von gesunden Personen.

3. Untersuchungsmaterial:

Wie zur Bestimmung des PB¹²⁷I (2) wird in jodfreien Einmalröhrchen abgenommenes Blut nach vollständiger Gerinnung zentrifugiert. Das gewonnene Serum kann sofort oder später untersucht werden; bei – 25 °C kann es mehrere Monate aufbewahrt werden.

4. Geräte:

Die Geräteanordnung ist schematisch in Abb. 1 dargestellt. *) Mit Hilfe einer Proportionierpumpe (25-canal micro-pump der Fa. Ismatec, Zürich, Schweiz) wird simultan aus 20 Eppendorfgefäßen bzw. einem Vorratsgefäß Probe oder Elutionslösung angesaugt und im geschlossenen System über 20 Sephadex-Säulen (s. u.) gepumpt. Die Säulen stehen jeweils fest in Kupferhülsen, die mit Hilfe eines Umwälzthermostaten von Wasser (27 °C) umspült und temperiert werden (Thermoblock). Die Säuleneuate können jetzt über eine Abflußrinne verworfen oder fraktioniert, d. h. zeitgesteuert in Einmalplastikröhrchen (22 x 100 mm) gesammelt werden. Nach Ende der Chromatographie können die Röhrchen ohne einen Pipettierschritt gleich am automatischen Gammameßplatz (Gammaguard, Fa. Tracerlab, Köln) gezählt werden.

5. Durchführung der Bestimmung:

- I. Bereitung der Säulen: 5 ml-Einmalspritzen (Fa. Braun, Melsungen), vor deren durch Zentralverschluß verschlossenen Auslauf ein feinporiges Filtrierpapier (Fa. Sartorius, Göttingen) liegt, werden mit 1 g über Nacht in Wasser gequelltem Sephadex G-25 fine gefüllt. Nach Sedimentation des Gels wird die Oberfläche mit einem weiteren Filtrierpapier bedeckt. Die Säulen werden nun durch Anpressen der Deckplatte über Nadeln an die Pumpenschläuche angeschlossen (Abb. 1) und mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 äquilibriert und stabilisiert. Vor der ersten Chromatographie werden die jeweiligen Säulenüberstände abgesaugt. Die Säulen sind jetzt über mehrere Wochen verwendbar.
- II. Inkubationsgemisch: 0,2 ml Serumprobe, 0,2 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und 0,2 ml T₃-¹²⁵J-Arbeitsstandard werden 15 min in Eppendorf-Gefäßen bei Zimmertemperatur im Rotationsmischer (Netheler und Hinz, Hamburg) inkubiert.
- III. Chromatographie und Fraktionssammeln:
Von dem Inkubationsgemisch ($\Sigma V = 0,6$ ml) werden mit der Proportionierpumpe jeweils in 1 min 0,42 ml ($\pm 0,02$) angesaugt. Danach wird 10 min mit Puffer nachgespült. Auf den Säulen erfolgt jetzt die Auftrennung des Inkubationsgemisches in 3 Fraktionen (3): a) Der proteingebundene Anteil des T₃-¹²⁵J und b) der ¹²⁵Jodidanteil – als Verunreinigung des T₃-¹²⁵J, dessen prozentualer Anteil je nach Alter

der Lösung zwischen 2 und 5 % liegt, – werden in den ersten Röhrchen (I) gesammelt; c) Das Dextrangel-gebundene T_3 - ^{125}J (sog. freies T_3 - ^{125}J) wird durch Nachwaschen mit einem Überschuß von Rinder- oder Humanserum (2 min entsprechend 0,84 ml) quantitativ von den Säulen eluiert und in den dritten Röhrchen (III) aufgefangen. Zur Kontrolle der ausreichenden Trennung der Gipfel wird das nahezu aktivitätsfreie Intervall zwischen den beiden Fraktionen gesammelt (Röhrchen II). Die Zeit zwischen Start und Ende dieses gesamten Chromatographieschrittes liegt bei 25 min.

IV. Berechnung: Die Proben werden bei einer Zeitvorwahl von 30 sec gezählt. Der statistische Zählfehler kann wegen der jeweiligen Impulsraten von über 10 000 ausreichend niedrig gehalten werden. Das sog. freie T_3 - ^{125}J wird nun in Prozent des Gesamt- T_3 - ^{125}J berechnet; dieses ergibt sich aus der Summe der Impulsraten von Röhrchen I, II und III unter Subtraktion des errechneten ^{125}J Jodidanteils, der in einem getrennten Versuch ermittelt wurde (3). Aus Zeitersparnisgründen wird zur Berechnung bei uns ein programmierbarer Tischcomputer (Programma P 102, Fa. Olivetti) eingesetzt. Neben der Qualitätskontrolle (s. u.) können durch Vergleich der jeweiligen Gesamtaktivitäten und Kontrolle der nahezu aktivitätsfreien Intervalle zwischen den Peaks Fehlbestimmungen auf Grund technischer Fehler nahezu ausgeschlossen werden.

6. Ergebnisse:

Die Präzision der Methode wurde über ein Jahr lang mit einem gepoolten Kontrollserum geprüft. Bei einem Mittelwert $\bar{x} = 38,0\%$ und einer Standardabweichung $s = 1,32\%$ berechnet sich ein Variationskoeffizient von $VK = 3,47\%$.

Der Normalbereich ($x \pm 2s$) gesunder Probanden ($N = 130$) zeigt eine Normalverteilung und liegt zwischen 32 und 42 % (Abb. 2).

Die diagnostische Wertigkeit des beschriebenen T_3 -in vitro-Tests wurde an einem ausgewählten Kollektiv von Hypo- und Hyperthyreosen untersucht und ist in Abb. 2 aufgezeigt.

7. Störfaktoren:

Die Störfaktoren bei den T_3 -in vitro-Tests sind aus der Literatur hinreichend bekannt (1, 2). Ein erniedrigtes sog. freies T_3 - ^{125}J ohne Vorliegen einer Hypothyreose findet sich hauptsächlich bei Gravidität, unter Östrogen- oder Antiovalantienbehandlung. Die Ursache falsch erhöhter Werte sind vor allem Dysproteinämien und Behandlung mit bestimmten Medikamenten (Salicylate, Diphenylhydantoin, Phenylbuzaton etc.). Durch gleichzeitige Bestimmung des $PB^{127}I$ und des sog. freien T_3 - ^{125}J läßt sich durch Multiplikation dieser beiden Werte der Index der freien Schilddrüsenhormone berechnen, der in den meisten Fällen die richtige Diagnose der Schilddrüsenfunktion erlaubt. Das ist der sog. Clark-Horn-Index (4), dessen Normalbereich bei uns zwischen $1,33 \mu g/100 \text{ ml}$ und $2,50 \mu g/100 \text{ ml}$ liegt. Dieser Wert verhält sich mit hinreichender Genauigkeit analog zum gemessenen Wert des absoluten freien Thyroxins (5).

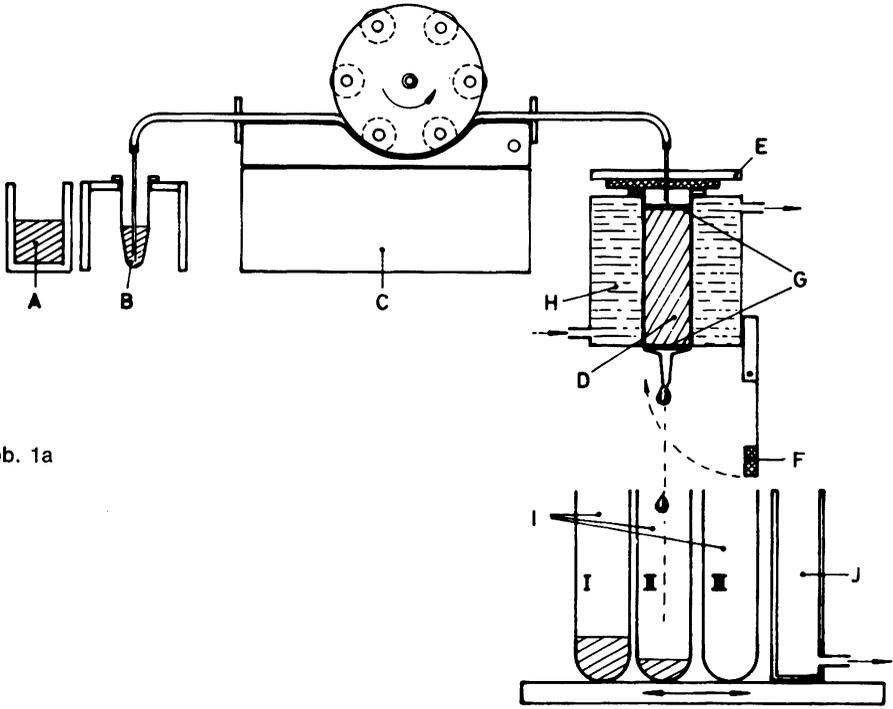


Abb. 1a

Abb. 1b

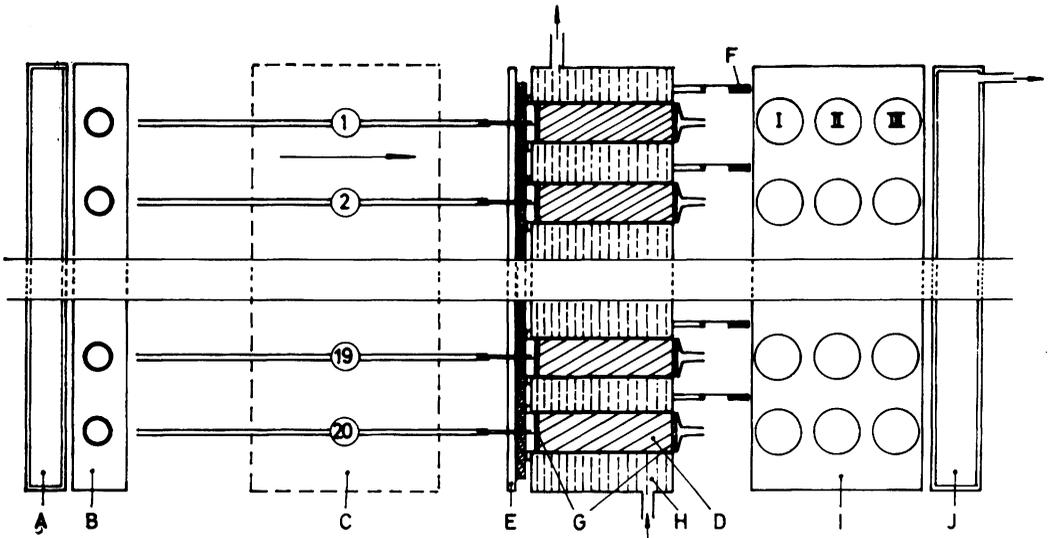


Abbildung 1 a und b: Schematische Darstellung des automatisierten T₃-in vitro-Testgerätes, a: Seitenansicht, b: von oben

- A = Puffer-Vorratsgefäß
- B = Inkubationsgefäß
- C = Proportionierpumpe
- D = Dextrangelsäule
- E = Zentralverschluss (Zulauf)

- F = Zentralverschluss (Auslauf)
- G = Filtrierpapier
- H = Thermoblock
- I = Fraktionsröhrchen
- J = Abflußrinne (Spülen)

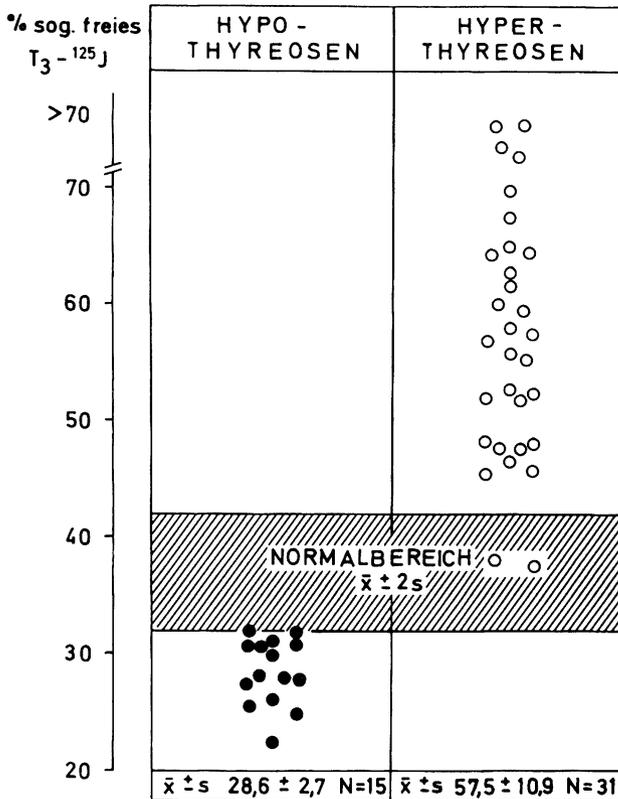


Abbildung 2: Diagnostische Wertigkeit des automatisierten T_3 -in vitro-Tests

8. Literatur:

1. Scriba, P. C.: Schilddrüsenkrankheiten. In: K. Schwarz und P. C. Scriba, Endokrinologie für die Praxis, Lehmann, München, 1970
2. Horn, K., P. C. Scriba: Klinisch-chemische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik. I. Bestimmung des proteingebundenen Jods im Serum (PB¹²⁷I). Dtsch. Ges. Klin. Chem., Mitteilungen 1970 (5) 3
3. Scriba, P. C., R. Landgraf, H. G. Heinze, K. Schwarz: Bestimmung der Bindung von Trijodthyronin an Serumprotein mittels Dextrangelfiltration. Klin-Wschr. 44 (1966) 69
4. Clark, F., D. B. Horn: Relationship between serum protein bound iodine and resin uptake of ¹³¹I-triiodothyronine. J. clin. Endocr. 26 (1966) 352
5. Rosenbaum, J. M., A. F. Krieg, J. B. Henry, J. M. Mozley, J. G. Mc Afee: Thyroid function evaluation in patients with increased or decreased thyroxine-binding protein. Amer. J. clin. Pathol. 50 (1968) 336

Anschrift der Verfasser:
 Dr. med. Klaus Horn
 Jürgen Henner
 PD Dr. med. Peter C. Scriba
 II. Medizinische Klinik der Universität
 8 München 15, Ziemssenstraße 1