

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 19, 1981, pp. 911–918

## Bestimmung von Triiodthyronin im Serum mit einem heterogenen Enzymimmunoassay: Ergebnisse einer gemeinsamen Erprobung

Von *S. L. Braun, W. Vogt*

*Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München,*

*K. Borner*

*Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz,*

*R. Delcourt*

*Institut Médico Chirurgical Arthur Gailly, Charleroi, Belgien,*

*O. Eber*

*Innere Abteilung des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder, Graz, Österreich,*

*A. B. Ederveen*

*Psych. Centrum St. Servatius, Venray, Niederlande,*

*H. Haas*

*Zentrallabor der Städt. Krankenanstalten, Esslingen,*

*B. Kågedal*

*Universität Linköping, Schweden,*

*F. Kaltwasser*

*Zentrallaboratorium Marienhospital, Stuttgart,*

*H. Lüönd*

*Institut Bachema, Zürich, Schweiz,*

*M. Oellerich, H. Haindl*

*Institut für Klinische Chemie und Institut für Nuklearmedizin, Medizinische Hochschule Hannover,*

*H. Wagner und K. Hengst*

*Med. Klinik und Poliklinik der Westf. Wilhelms-Universität Münster*

(Eingegangen am 3. November 1980/4. Februar 1981)

**Zusammenfassung:** Die vorliegende Arbeit berichtet über die Ergebnisse einer Erprobung eines heterogenen Enzymimmunoassays in antikörperbeschichteten Röhrchen zur Bestimmung von Triiodthyronin durch eine Gruppe von 11 Laboratorien. Die Testdurchführung entspricht der des seit einiger Zeit eingeführten heterologen Thyroxin-Enzymimmunoassay.

Die Erprobung zeigte, daß

1. die Spezifität des Tests sowie dessen Meßbereich von 0,46 bis 9,2 nmol/l den diagnostischen Anforderungen entspricht,
2. die ermittelten Präzisionen in der Serie und von Serie zu Serie in der für Radioimmunoassays üblichen Größenordnung liegen,
3. die Wiederfindung von zugesetzter Reinsubstanz zwischen 90 und 103% beträgt,

4. die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit selbst aufgebauten Radioimmunoassays gut und mit kommerziellen RIAs ausreichend ist,
5. keine Beeinträchtigung der T<sub>3</sub>-Bestimmung durch Hyperbilirubinämie und hohe Gallensäurekonzentrationen erfolgt, jedoch bei starker Hämolyse und Lipämie eine Störung auftreten kann.

Der wesentliche Vorteil des T<sub>3</sub>-Enzymimmunoassays gegenüber den Radioimmunoassays liegt im Wegfall der für den Umgang mit radioaktiven Substanzen erforderlichen Genehmigungen und Einschränkungen.

#### *Determination of triiodothyronine in serum with a heterologous enzyme immunoassay: Results of a group survey*

**Summary:** This paper summarises the results of the evaluation of a heterologous enzyme immunoassay in antibody coated tubes for the determination of triiodothyronine (T<sub>3</sub>) by a group of 11 laboratories. The assay procedure is analogous to an established heterologous thyroxine enzyme immunoassay.

The evaluation demonstrated that

1. the specificity of the assay and its analytical range between 0.46 and 9.2 nmol/l meet diagnostic requirements,
2. the intra- and interassay precision was in accordance with that commonly found in radio immunoassays,
3. the recovery of added T<sub>3</sub> was between 90 and 103%,
4. the results agreed well with those of self-established radio immunoassays and were comparable with commercial RIA kits,
5. there was no interference by hyperbilirubinaemia or by high concentrations of bile acids, but interference can occur in very haemolytic and lipaemic samples.

The great advantage of T<sub>3</sub> enzyme immunoassays lies in the absence of restrictions and any authorization needed for working with radioactive substances.

#### Einleitung

Enzymimmunoassays haben inzwischen zunehmend Verbreitung gefunden, weil sie mit den in klinisch-chemischen Laboratorien üblichen Geräten durchführbar sind, die Reagenzien wesentlich länger haltbar sind und durch den Wegfall radioaktiver Isotope Auflagen für deren Umgang und Beseitigung fehlen. Die Bestimmung der Schilddrüsenhormone gehört zweifellos zu den am häufigsten durchgeführten Hormonuntersuchungen. Sowohl homologe als auch heterologe Enzymimmunoassays zur Thyroxin (T<sub>4</sub>)-Bestimmung sind beschrieben (1, 2) und seit einiger Zeit auf dem Markt. Desweiteren ist ein heterologer Enzymimmunoassay zur Bestimmung der Thyroxinbindungskapazität (TBI) kommerziell erhältlich. Diese Tests haben sich in der Praxis bereits bewährt (3, 4).

In neuerer Zeit kamen heterogene Enzymimmunoassays für Thyrotropin (TSH) (5) und Triiodthyronin (T<sub>3</sub>) (2, 6) hinzu, wovon jetzt ein T<sub>3</sub>-Enzymimmunoassay (T<sub>3</sub>-ELISA<sup>1</sup>) in antikörperbeschichteten Röhrchen kommerziell zugänglich ist<sup>2</sup>.

Diese Arbeit berichtet über die Ergebnisse einer Erprobung dieses T<sub>3</sub>-ELISA durch eine Gruppe von Laboratorien mit verschiedener apparativer Ausstattung und

unterschiedlicher Erfahrung im Umgang mit Enzymimmunoassays.

#### Material und Methoden

##### Prinzip der T<sub>3</sub>-Bestimmung

Der von Kleinhammer et al. (2, 7) beschriebene Test beruht auf der von Catt & Tregear (8) eingeführten Technik in antikörperbeschichteten Röhrchen. Das bei Radioimmunoassays zur T<sub>3</sub>-Bestimmung übliche <sup>125</sup>I als Markierungsmittel ist hier durch das Indikatorenzym Meerrettich-Peroxidase (EC 1.11.1.7) ersetzt.

Der Test wird in der gleichen Weise wie der bereits seit einiger Zeit eingeführte T<sub>4</sub>-ELISA durchgeführt und umfaßt folgende Teilschritte:

1. Trennung des Triiodthyronins von den Trägerproteinen im Serum durch Inkubation mit 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure in Barbituratpuffer. Im ersten Inkubationsschritt konkurrieren Serum-T<sub>3</sub> und Peroxidase-markiertes T<sub>3</sub> um die vor-gegebene, an die Röhrchenwand gebundene Menge an Antikörpern.
2. Abtrennung von ungebundenem T<sub>3</sub> und T<sub>3</sub>-Peroxidase-Konjugat durch Absaugen des Inkubationsgemisches mit anschließendem Waschschrift.
3. Im zweiten Inkubationsschritt (Indikatorreaktion) entsteht nach Zusatz von Substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Chromogen (ABTS)<sup>3</sup> ein Farbstoff, dessen Konzentration der an der Röhrchenwand gebundenen Enzymaktivität entspricht.
4. Photometrische Messung nach 45–60 Minuten bei 405 nm.

Tabelle 1 enthält die Konzentrationen der rekonstituierten Testreagenzien.

<sup>1</sup>) ELISA: enzyme linked immunosorbent assay, heterogener Enzymimmunoassay.

<sup>2</sup>) Enzymun-Test® T<sub>3</sub>, Fa. Boehringer Mannheim.

<sup>3</sup>) 2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulfonsäure(6)]-diammoniumsalz.

Tab. 1. Konzentrationen der gebrauchsfertigen Lösungen.

1. Bindungsreaktion		
Natriumbarbituratpuffer	120	mmol/l
Natriumphosphatpuffer, pH 8,6	17,6	mmol/l
Rinderserumalbumin	2,0	g/l
8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure	1,27	mmol/l
T <sub>3</sub> -Peroxidase-Konjugat	etwa 12	U/l
2. Standards		
Triiodthyronin in Humanserum	0–9,22	nmol/l
3. Indikatorreaktion		
Natriumphosphat/-citratpuffer, pH 5	100	mmol/l
Natriumperborat	1,47	mmol/l
ABTS <sup>3</sup> )	9,1	mmol/l

Die einzelnen Teilnehmer werden im folgenden durch die Kennbuchstaben A bis K bezeichnet. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die von den Erprobern verwendeten Dosier- und Meßgeräte. Die klinischen Untersuchungsproben (Humanseren) stammten aus den Routinelaboratorien der jeweiligen Erprober. Für die Ermittlung der Präzision von Serie zu Serie wurde vom Hersteller ein Kontrollserum bereitgestellt.

Abweichend vom Erprobungsprotokoll führte ein Teilnehmer ein Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von Natriumazid durch (9).

Die bis Dezember 1979 abgeschlossenen Versuche wurden mit einer einheitlichen Produktionscharge des T<sub>3</sub>-ELISA durchgeführt, die noch nicht für den allgemeinen Verkauf bestimmt war. Der Test ist nach Auskunft des Herstellers identisch mit dem inzwischen im Handel befindlichen Test. Neben selbst aufgebauten Radioimmunoassays (10, 11, 12) wurden Assays der folgenden Hersteller verwendet: Abbott, Amersham Buchler, Behring-Werke, Byk-Mallinckrodt, Corning und Henning.

Tab. 2. Für den Test verwendete Instrumentierungen.

Labor	Pipettiersystem	Photometer
A	Digital Dilutor, Hamilton	PMC Automatic Riele
B	manuell (Eppendorf Pipetten)	Eppendorf Digital 6115 Mikroküvette
C	manuell (Eppendorf Pipetten) Dispensor (Labora)	Eppendorf Digital 6115 Absaugküvette
D	Dispensor (Labora, Hamilton, General Diagnostic)	Vitatron DPC 100*
E	manuell (Eppendorf Pipetten)	Eppendorf 1001 M Absaugküvette
F	Pipettor (Oxford) Seripettor (Labora)	Zeiss PM 2
G	manuell (Eppendorf Pipetten)	Eppendorf 1101 M Absaugküvette
H	Dilutor (Hamilton)	Eppendorf Digital 6115 Absaugküvette
I	Dilutor (Eppendorf)	Eppendorf 1101 M Absaugküvette
J	Dilutor (Micromedic)	Eppendorf Digital 6115
K	manuell (Eppendorf Pipetten)	Eppendorf 1101 M Absaugküvette

Anmerkung: Die Auflistung der Meßergebnisse ist nicht identisch mit der alphabetischen Reihenfolge der Teilnehmer.

## Statistische Methoden

1. Vorzeichentest nach Dixon & Mood (13).
2. Bivariate Regressionsanalyse (14).

## Ergebnisse

### Meßbereich und Bezugskurve

Abbildung 1 zeigt eine typische Bezugskurve ohne Koordinatentransformation. Eingetragen sind die Mittelwerte der Standards aus 10-facher Bestimmung.

Die untere Nachweisgrenze wurde berechnet aus der Summe der mittleren Absorption des T<sub>3</sub>-freien Standards und seiner 3-fachen Standardabweichung (15). Dieser unterste, von Null signifikant zu unterscheidende Wert liegt danach bei 0,46 nmol/l.

### Präzision

Die Präzision in der Serie wurde mit nativen Humansammelseren im mittleren (1,5–3 nmol/l) und hohen (> 4 nmol/l) Konzentrationsbereich in verschiedenen Meßserien bestimmt.

Tabelle 3 zeigt die ermittelten Präzisionen in der Serie für T<sub>3</sub> im mittleren Konzentrationsbereich. Bei Dreifachanalysen beträgt der Variationskoeffizient (VK) minimal 3,3 und maximal 11,9%. Bei Doppelanalysen schwanken die VK von 4,1 bis 12,1%.

Ausreichend Probenmaterial mit hohen T<sub>3</sub>-Konzentrationen zur Präzisionsbestimmung stand nur drei Erprobern zur Verfügung. Die dabei ermittelten VK für Dreifachanalysen (Tab. 4) reichten von 2,9 bis 5,4%, bei Doppelbestimmungen von 3,6 bis 6,6%. Die Erprobung

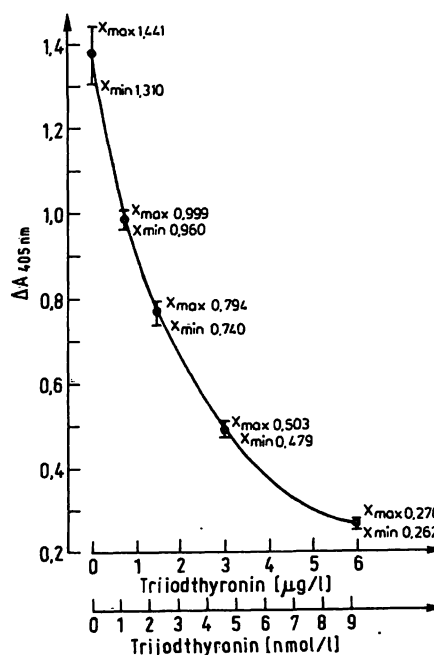


Abb. 1. Beispiel einer Bezugskurve. Eingetragen sind die Mittelwerte der Standards aus 10-facher Bestimmung.

Tab. 3. Präzision in der Serie. Humanseren mit T<sub>3</sub> im Bereich von 1,5–2,9 nmol/l.

Labor	3-fach N = 20			2-fach N = 20		
	$\bar{x}$ (nmol/l)	s (nmol/l)	VK (%)	$\bar{x}$ (nmol/l)	s (nmol/l)	VK (%)
A	2,61	0,11	4,2	2,61	0,20	7,8
B	2,86	0,17	5,8	2,86	0,18	6,4
C	1,80	0,06	3,3	1,79	0,08	4,1
	2,37	0,09	3,9	2,35	0,11	4,2
D	2,04	0,12	5,7	2,03	0,11	5,3
F	2,41	0,14	5,8	2,41	0,17	7,3
G	2,73	0,32	11,9	2,72	0,31	11,2
H*	1,54	0,14	9,5	1,51	0,18	12,1
I	1,90	0,17	9,2	1,90	0,12	6,3
J*	1,69	0,06	3,9			

\* N = 10.

Tab. 4. Präzision in der Serie. Humanseren mit T<sub>3</sub> > 4,0 nmol/l.

Labor	3-fach N = 20			2-fach N = 20		
	$\bar{x}$ (nmol/l)	s (nmol/l)	VK (%)	$\bar{x}$ (nmol/l)	s (nmol/l)	VK (%)
A	4,29	0,23	5,4	4,33	0,29	6,6
B	6,64	0,18	2,9	6,64	0,23	3,6
E	5,09	0,15	3,1	5,18	0,29	5,7

zeigte, daß Anwender mit längerer Erfahrung in der Durchführung von Enzymimmunoassays bessere Präzisionen erzielten und bei Erprobern ohne entsprechende Praxis ein deutlicher Lerneffekt während der Erprobung zu beobachten war.

Die Präzision von Tag zu Tag wurde mit einer einheitlichen Kontrollprobe an mindestens 5 Tagen in Dreifachanalysen bestimmt (Tab. 5). Die Mittelwerte reichten von 1,51 bis 1,89 nmol/l, die Variationskoeffizienten von 3,7 bis 11,7%. Die Streuung der von den einzelnen Laboratorien gefundenen Werte des Kontrollserums betrug 7,35% bei einem gefundenen Mittelwert von  $\bar{x} = 1,65$  nmol/l und einer Standardabweichung von 0,12 nmol/l.

### Richtigkeit

Wegen des Fehlens einer anerkannten Referenzmethode kann die Richtigkeit der T<sub>3</sub>-Bestimmungsmethoden nur bedingt angegeben werden.

Ein Teilnehmer führte Zusatz-Versuche zu T<sub>3</sub>-freiem Serum an 4 verschiedenen Tagen durch und fand dabei 90–103% der Einwaage wieder (Tab. 6).

Die gemessenen T<sub>3</sub>-Konzentrationen von verschiedenen Verdünnungsstufen eines Patientenserums mit extrem hohen T<sub>3</sub>-Werten zwischen 25 und 28 nmol/l lagen alle auf einer Geraden mit einem linearen Korrelationskoeffizienten von 0,992. Verdünnt wurde mit einem Serum mit 0,9 nmol/l.

Tab. 5. Präzision von Tag zu Tag. Wiederfindung mit Kontrollseren (1,57 ± 0,23 nmol/l T<sub>3</sub>).

Labor	$\bar{x}$ (nmol/l)	s (nmol/l)	VK (%)	N (3-fach)
A	1,58	0,18	11,7	14
B	1,61	0,17	10,3	25
C	1,63	0,06	3,8	9
D	1,70	0,11	6,1	10
E	1,52	0,14	9,0	5
F	1,89	0,08	3,7	5
G	1,55	0,14	8,4	7
H	1,51	0,11	7,5	7
I	1,70	0,14	8,3	4
J	1,64	0,15	9,3	8
K	1,81	0,11	5,6	5

Tab. 6. Wiederfindung von L-Triiodthyronin.

T <sub>3</sub> , zugesetzt zu T <sub>3</sub> -freiem Serum (nmol/l)	T <sub>3</sub> , gefunden (nmol/l)	Wiederfindung (%)
0,76	0,69	90,7
1,53	1,58	103
3,07	2,98	97
6,14	6,22	101
7,68	7,52	97,9

### Methodenvergleich

Der T<sub>3</sub>-Enzymimmunoassay wurde von 3 Erprobern mit selbst aufgebauten Radioimmunoassays (10, 11, 12) verglichen. 7 Erprober verwendeten 6 verschiedene, kommerziell erhältliche Radioimmunoassays.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Die Abbildung 2 zeigt repräsentativ den Vergleich des T<sub>3</sub>-Enzymimmunoassays mit einem selbst entwickelten Radioimmunoassay.

Tab. 7. Methodenvergleich T<sub>3</sub>-ELISA (Boehringer Mannheim) mit Radioimmunoassays (y = RIA; x = ELISA).

Labor	Radioimmunoassay	Wert-Steigung und Achsenabschnitt der bivariaten Regressionsgeraden				Vorzeichen-test der Paardifferenzen
		n	a	b (nmol/l)	p	
A	eigene Methode	72	0,067	0,989	= 0,05	NS
B	Byk-Mallinckrodt	80	0,472	1,158	<0,01	
B	Henning	83	0,178	0,975	<0,01	
C	Corning	45	0,080	0,918	0	NS
D	eigene Methode	78	0,104	0,978	>0,05	NS
E	Corning	67	0,356	1,041	<0,01	
F	Amersham-Buchler	67	-0,224	1,339	>0,05	NS
G	Corning	38	0,255	0,986	<0,01	
H	eigene Methode	87	-0,036	1,012	>0,05	NS
I	Behring	112	0,054	0,846	<0,01	
I	Byk-Mallinckrodt	112	0,110	1,154	<0,01	

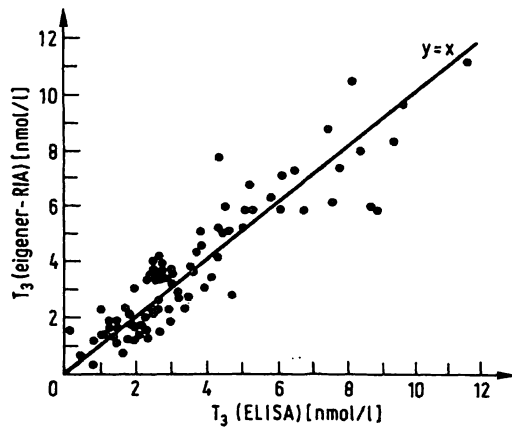


Abb. 2. Methodenvergleich Radioimmunoassay (eigene Methode, Teilnehmer H) mit dem Enzymimmunoassay n = 87,  $\bar{c}_{\text{ELISA}} = 2,43 \text{ nmol/l}$ ,  $\bar{c}_{\text{RIA}} = 2,42 \text{ nmol/l}$ ,  $p > 0,05$ .

## Interferenzen

### Hämolyse

Von einer Blutprobe wurde Serum gewonnen, der andere Teil hämolytisch und in verschiedenen Konzentrationen dem Serum zugesetzt. Abbildung 3 zeigt eine Verminderung der gemessenen T<sub>3</sub>-Konzentrationen bei starker Hämolyse.

### Hyperbilirubinämie

Ein Teilnehmer fand bei Patientenserum mit Bilirubin-konzentrationen von 25 bis 800  $\mu\text{mol/l}$  keinen Unterschied zwischen den enzymimmunologisch und den mit einem eigenen Radioimmunoassay ermittelten T<sub>3</sub>-Werten (16).

### Gallensäuren

Zu normalen Patientenserum wurden Chenodesoxyolithocholsäure und Ursocholsäure<sup>4)</sup> in Konzentrationen bis

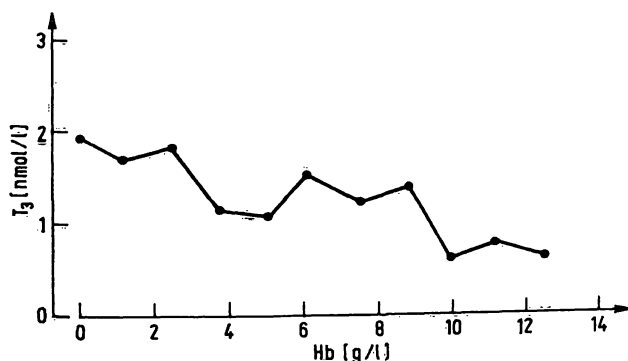


Abb. 3. Abhängigkeit der mit dem Enzymimmunoassay gemessenen T<sub>3</sub>-Konzentrationen von zugesetztem Hämoglobin.

<sup>4)</sup> Für die Überlassung der Gallensäuren danken wir der Fa. Diamalt AG, Werk Pharmazell, D-8201 Raubling.

zu 300  $\mu\text{mol/l}$  zugesetzt. Die gemessenen T<sub>3</sub>-Konzentrationen waren 1,8 nmol/l im Nativserum, nach Zugabe von Gallensäuren lagen die T<sub>3</sub>-Konzentrationen im Bereich zwischen 1,5 und 1,7 nmol/l.

### Hyperlipidämie

Ein Erprober fand bei lipämischen Seren mit einem Triglyceridgehalt bis zu 70 mmol/l keinen signifikanten Unterschied der T<sub>3</sub>-Konzentrationen im Vergleich zum RIA. Drei andere Erprober fanden bei lipämischen Seren zum Teil voneinander abweichende Ergebnisse zwischen verschiedenen RIA's und dem T<sub>3</sub>-ELISA. Die Zahl der untersuchten Proben reichte jedoch für eine statistisch gesicherte Aussage nicht aus.

### Arzneimittel

Bei 39 häufig verwendeten Pharmaka konnte nach Angaben des Herstellers mit doppelt toxischen Dosen in vitro keine Beeinflussung der Ergebnisse festgestellt werden.

### Einfluß der Konzentration von Thyroxin-bindendem Globulin (TBG)

Zwei Teilnehmer verglichen in Schwangerenserum die enzymimmunologisch mit den radioimmunologisch bestimmten T<sub>3</sub>-Werten. Ein Vergleich mit 25 Schwangerenserum (TBG zwischen 7,8 und 40 mg/l) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen ELISA und einem eigenen RIA (Doppelantikörpertechnik, Thiomersal zur Verdrängung des T<sub>3</sub> von den Bindungsproteinen im Serum). Die Verteilung der gefundenen Werte zeigt Abbildung 4.

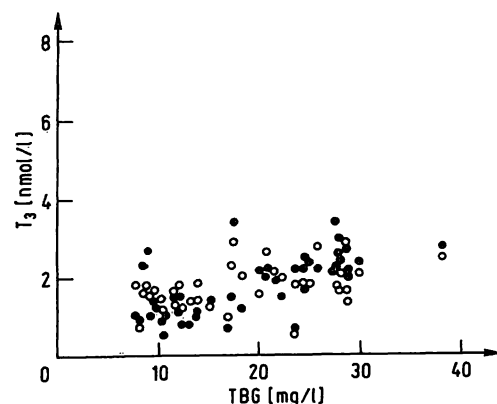


Abb. 4. Abhängigkeit der T<sub>3</sub>-Konzentration von der Konzentration von Thyroxin-bindendem Globulin (TBG). Gefüllte Kreise: radioimmunologisch gemessene T<sub>3</sub>-Werte. Offene Kreise: enzymimmunologisch gemessene T<sub>3</sub>-Werte. Teilnehmer H, n = 45.

Beim Vergleich mit 2 kommerziellen RIA's fanden sich bei 15 Schwangerenserum (TBG zwischen 25,4 und 60,2 mg/l) in einem Assay keine unterschiedlichen Werte. Der zweite Radioimmunoassay brachte jedoch durchgehend wesentlich niedrigere T<sub>3</sub>-Werte als der Enzymimmunoassay. Dieser Radioimmunoassay liefert offenbar bei hohen TBG-Konzentrationen zu niedrige Werte, da beim Vergleich von Seren mit normalen TBG-Konzentrationen keine Unterschiede auftraten.

Ausführliche Erörterungen zur Problematik des Einflusses von TBG auf die T<sub>3</sub>-Bestimmung finden sich bei Horn (17).

## Diskussion

### Spezifität

Die Eigenschaften des verwendeten Antikörpers sind nach Angaben des Reagenzienherstellers in Tabelle 8 wiedergegeben. Eine Beeinflussung der im Patientenserum gemessenen T<sub>3</sub>-Konzentrationen durch Iod-Thyronine oder Iod-Tyrosine ist vernachlässigbar. Abb. 5 zeigt die Kreuzreaktion mit L-Thyroxin.

### Nachweisgrenze und Meßbereich

Der Meßbereich von 0,46–9,2 nmol/l entspricht den diagnostischen Anforderungen. Eine Ausweitung unter den experimentell ermittelten Grenzbereich ist nicht notwendig, da die Bedeutung der T<sub>3</sub>-Bestimmung in erster Linie in der Erkennung von Patienten mit T<sub>3</sub>-Hyperthyreose liegt und T<sub>3</sub>-Konzentrationen keine wesentlichen Informationen beim Nachweis oder Aus-

Tab. 8. Eigenschaften des T<sub>3</sub>-Antikörpers nach Angaben des Herstellers.

Tierspezies:	Schaf		
Bindungskapazität:	284 fmol bzw. 250 pg T <sub>3</sub> /Röhrchen		
Effektive Bindungskonstante:	4,5 · 10 <sup>10</sup> l/mol		
Spezifität:	Kreuzreaktion in %	erforderliche Konzentrationen (nmol/l) um 2,7 nmol/l T <sub>3</sub> vorzutauschen	Richtwerte im Serum bzw. therapeut. Konzentration (nmol/l)
L-Triiodthyronin	100	2,7	1,1– 2,5
D-Triiodthyronin	3,6	69	nicht bekannt
L-Thyroxin	0,02	1737	51 –148
D-Thyroxin	0,13	174	nicht bekannt
3,5-Diiod-L-tyrosin	nicht meßbar	> 2300	20
3-Monoiod-L-tyrosin	nicht meßbar	> 300	40
Reverse-T <sub>3</sub>	nicht meßbar	> 150	0,3– 2,4
L-Tetraiodthyroacetat	0,15	1470	1,0– 3,8

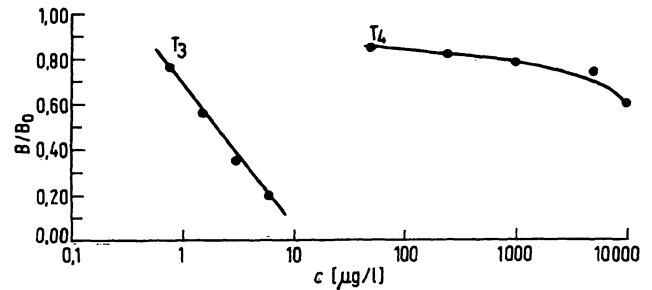


Abb. 5. Kreuzreaktion zwischen Triiodthyronin und Thyroxin.

schluß einer Hypothyreose liefern (18). Erniedrigte, jedoch noch über der unteren Nachweisgrenze liegende T<sub>3</sub>-Konzentrationen bei klinisch euthyreoten Patienten können bei dekompensierter Lebercirrhose (19), schweren Allgemeinerkrankungen, bei Fasten und Proteinmangelernährung (20) sowie physiologisch bei Neugeborenen und im höheren Lebensalter auftreten.

### Präzision

Die ermittelten Präzisionen in der Serie (Tab. 3 und 4) und von Serie zu Serie (Tab. 5) liegen in der für Radioimmunoassays üblichen Größenordnung. In zwei 1977 (21) bzw. 1978 (22) veröffentlichten Übersichten über kommerzielle Radioimmunoassays werden insgesamt 54 Tests zur Bestimmung von T<sub>3</sub> aufgeführt. Die Extremwerte für die Präzision in der Serie werden von 1,8 bis 10,9% angegeben, für die Präzision von Tag zu Tag mit 2,9 bis 15%.

Die Erprobung zeigte, daß eine Verbesserung der Präzision einerseits durch zunehmende Erfahrung im Umgang mit Enzymimmunoassays und andererseits durch Verwendung von qualitativ hochwertigen Pipettierhilfen bzw. durch Mechanisierung erreicht werden kann. Außerdem sollte nach Absaugen der Inkubationslösung die Zugabe von Indikatorreagenz umgehend erfolgen, damit die gebundene Enzymaktivität nicht durch Trocknen geschädigt wird.

Das von einem Erprober durchgeführte Abstoppen der Farbreaktion mit Natriumazid war ohne Einfluß auf die Präzision. Der Vorteil liegt in der Möglichkeit, die photometrische Messung nach dem Abstoppen unterbrechen zu können, nachteilig ist jedoch der zusätzliche Pipettierschritt. Nach allgemeiner Übereinstimmung sollten Standard- und Patientenproben auf jeden Fall in Doppelbestimmungen untersucht werden.

### Richtigkeit

Die Überprüfung der Richtigkeit einer neu eingeführten Methode durch Vergleich mit einer bestehenden Methode ist nur dann aussagekräftig, wenn die Vergleichsmethode auch tatsächlich „wahre Werte“ liefert. Da es jedoch für die Bestimmung von Schilddrüsenhormonen bisher keine anerkannte Referenzmethode gibt, ist eine Aussage über die Richtigkeit durch Methodenvergleich derzeit nur

bedingt möglich. Wiederfindungsversuche erlauben eine Abschätzung der Richtigkeit durch Angabe der Abweichung vom erwarteten Wert. Die mit dem T<sub>3</sub>-ELISA gefundenen Ergebnisse entsprechen den für immunologische Tests üblichen Werten. Die Ergebnisse von Verdünnungsversuchen zeigen, daß der T<sub>3</sub>-ELISA-Test in sich richtig ist. Von den Testherstellern ist zu fordern, daß die einmal gewählte Standardisierung gleichbleibt, um so die Kontinuität der Meßwerte zu gewährleisten.

### Vergleichbarkeit

Die T<sub>3</sub>-Bestimmung wird bis heute radioimmunologisch durchgeführt. Anhand von Patientenserum und einem Kontrollserum sollte untersucht werden, inwieweit mit dem neuen Enzymimmunoassay für T<sub>3</sub> vergleichbare Ergebnisse gegenüber den üblichen Radioimmunoassays zu erzielen sind. Beiden Verfahren, dem Enzymimmunoassay, wie dem Radioimmunoassay, liegt das gleiche analytische Prinzip zugrunde.

Die Problematik der immunologischen Bestimmung von Triiodthyronin im Serum ergibt sich aus der hohen Bindung an Plasmaproteine und der im Vergleich zu T<sub>4</sub> ca. 60-fach niedrigeren Konzentrationen. Die Ergebnisse von Ringversuchen (23, 24) zeigen besonders deutlich diese Schwierigkeiten.

Zusätzlich wird der Methodenvergleich durch die ungleichmäßige Verteilung der Analytkonzentrationen über den Meßbereich erschwert. Die Mehrzahl der Proben enthielt T<sub>3</sub>-Konzentrationen zwischen 1,0 und 2,5 nmol/l, bei einem Meßbereich von 0,46 bis 9,2 nmol/l. Zwei der 11 Teilnehmer hatten eine relativ gleichmäßige Verteilung der T<sub>3</sub>-Konzentrationen in den klinischen Proben zur Verfügung. Sie fanden auch die beste Übereinstimmung der enzymimmunologisch gemessenen T<sub>3</sub>-Konzentrationen mit ihren eigenen RIA-Methoden. Ein Beispiel davon zeigt die Abbildung 2.

Nahezu durchgehend höhere T<sub>3</sub>-Werte im Vergleich zum Enzymimmunoassay wurden nur bei einem der 6 kommerziellen Radioimmunoassays gemessen. Die Meßwerte dieses Assays lagen auch im Vergleich zu zwei anderen Radioimmunoassays signifikant höher.

Alle übrigen untersuchten Radioimmunoassays zeigten eine Übereinstimmung mit den Meßwerten des T<sub>3</sub>-Enzymimmunoassays im Bereich der für solche immunologischen Tests bekannten Toleranzen.

### Interferenzen

Da Natriumazid die Farbentwicklung in allen mit Peroxidase markierten Enzymimmunbestimmungen bei Benutzung von ABTS als Protonendonator inhibiert, dürfen Natriumazid-haltige Kontrollseren aus diesem Grund nicht verwendet werden.

Im Gegensatz zum T<sub>4</sub>-ELISA wird die T<sub>3</sub>-Bestimmung überraschend durch starke Hämolyse deutlich gestört. Der Grund für diese Störung ist bisher unbekannt. Bei leichter Hämolyse kann dieser Effekt vernachlässigt werden.

Eine Störung durch Hyperbilirubinämie ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht anzunehmen. Es existieren Hinweise (25), daß bei ikterischen Erkrankungen falsche Ergebnisse erzielt werden, die nicht auf die hohen Bilirubinkonzentrationen selbst zurückzuführen sind. Deshalb wurde auch der Einfluß von Gallensäuren, die bei obstruktiven Lebererkrankungen erhöht sind und möglicherweise aufgrund ihrer Detergentien-Eigenschaft eine Störung der Antigen-Antikörper-Reaktion oder der Enzym-Reaktion verursachen, überprüft. Die Zugabe von hohen Konzentrationen an Ursocholsäure und Chenodesoxyolithocholsäure führte jedoch zu keiner deutlichen Beeinträchtigung der T<sub>3</sub>-Bestimmung.

Lipämische Seren sollten nicht zur T<sub>3</sub>-Bestimmung verwendet werden, da der Einfluß der Hyperlipidämie bisher noch nicht eindeutig geklärt ist. Ebenso wie der Radioimmunoassay kann selbstverständlich auch der Enzymimmunoassay durch Antikörper gegen Schilddrüsenhormone gestört werden (26).

### Praktikabilität

Genauso wie beim identisch aufgebauten T<sub>4</sub>-ELISA sind nach Angaben des Herstellers alle Reagenzien bei geschlossener Packung und Lagerung im Kühlschrank (2–8 °C) etwa 1 Jahr haltbar. Die Haltbarkeit ist somit wesentlich länger als diejenige von <sup>125</sup>I-markierten Radioimmunoassays. Mit den Reagenzien einer Packung sind etwa 3 Ansätze im Zeitraum bis zu 4 Wochen möglich. Die Inkubationslösung muß täglich frisch angesetzt und darf nicht eingefroren werden.

Außer einem Kühlschrank wird an apparativer Ausstattung ein leistungsfähiges Photometer, am besten mit Absaugküvette und Drucker benötigt. Ebenso ist die Verwendung eines präzisen Pipettiersystems hilfreich. Damit kann bei entsprechender Übung in sehr kurzen Zeitabständen (z. B. 10 s) pipettiert und gemessen werden. Bei Photometern, deren Bedienung mehrere Handgriffe erfordert, kann man entweder die Pipettierintervalle verlängern oder die Enzymreaktion mit Natriumazid abstoppen und ohne Zeitdruck messen. Des Weiteren ist eine vollmechanisierte Durchführung des T<sub>3</sub>-ELISA möglich, die die Präzision steigern kann.

Die Auswertung der nichtlinearen Bezugskurve kann entweder manuell oder rechnerunterstützt erfolgen. Verschiedene mathematische Verfahren zur Kurvenanpassung (27, 28) wurden verwendet und haben sich als leistungsfähig erwiesen. Unterschiedliche Ergebnisse sind dabei im wesentlichen nicht zu erwarten.

Der Zeitaufwand bei manueller Technik ist dem T<sub>4</sub>-ELISA vergleichbar und beträgt von der Serumgewinnung bis zum Ergebnis weniger als 6 Stunden. Damit liegt man in der Größenordnung von vollmechanisierten T<sub>3</sub>-RIA-Automaten und unter den üblichen manuellen Radioimmunoassays.

Bei gleicher Leistungsfähigkeit zeigt der T<sub>3</sub>-ELISA gegenüber dem RIA den klaren Vorteil, daß nicht mit radioaktivem Material gearbeitet werden muß. Damit entfallen alle für den Umgang mit radioaktiven Substanzen erforderlichen Genehmigungen und Einschränkungen

sowie das wachsende Problem der Abfallbeseitigung.

### Schlußfolgerung

Der Vergleich des neuen T<sub>3</sub>-ELISA-Tests mit einer Reihe derzeit gebräuchlicher Radioimmunoassays erbrachte Werte, die in dem für diese Bestimmung üblichen Toleranzbereich liegen. Der Test schließt eine Lücke in der bereits seit einiger Zeit mit Erfolg eingesetzten Reihe der enzymimmunologischen Schilddrüsenhormonbestimmungen und ist eine Alternative zu den üblichen radioimmunologischen T<sub>3</sub>-Bestimmungsmethoden.

### Literatur

- Ullman, E. F., Blakemore, J., Leute, R. K. & Eimstad, W. (1975), *Clin. Chem.* 21, 1011.
- Kleinhammer, G., Lenz, H., Linke, R. & Staehler, F. (1978), *Enzymimmunoassay – Grundlagen und praktische Anwendung* (Vogt, W., ed.) Thieme Verlag Stuttgart, 42–51.
- Oellerich, M., Haindl, H. & Haeckel, R. (1979), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 483–488.
- Abraham, K., Kessler, A.-C., Munz, E. & Rösler-Engelhardt, A. (1980), *Lab. Med.* 4, 235–239.
- Tanswell, P., Albert, W., Glatz, C., Treffert, C., Linke, R. & Staehler, F. (1979), *Praktische Anwendung des Enzymimmunoassays in klinischer Chemie und Serologie* (Vogt, W. ed.) G. Thieme Verlag, Stuttgart, 91–97.
- O'Sullivan, M. J., Gnemmi, E., Morris, D., Al-Bassam, M. N., Simmons, M., Bridges, J. W. & Marks, V. (1978), *Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs* (Pal, S. B. ed.) Verlag de Gruyter, Berlin–New York, p. 301–310.
- Albert, W. H. W., Kleinhammer, G., Linke, R., Tanswell, P. & Staehler, F. (1978), *Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs*, (Pal, S. B. ed.) Verlag de Gruyter, Berlin–New York, p. 153–174.
- Catt, K. & Tregear, G. W. (1967), *Science* 158, 1570.
- Persijn, J. P. & Jonker, K. M. (1978), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 16, 531–532.
- Gharib, H., Ryan, R. J., Mayberry, W. E. & Hockert, T. (1971), *J. Clin. Endocrinol.* 33, 509.
- Meinhold, H. & Wenzel, K. W. (1974), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 12, 477–486.
- Oellerich, M. & Haindl, H. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* in press.
- Sachs, L. (1974), *Angewandte Statistik*, Springer-Verlag, Berlin, 4. Aufl.
- Averdunk, R. & Borner, K. (1970), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 8, 263–268.
- Kaiser, H. (1965), *Z. Analyt. Chem.*, 209, 1–18.
- Oellerich, M. & Haindl, H. (1980), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 718.
- Horn, K. (1976), *T<sub>3</sub> – Zur Bestimmung und pathophysiologischen Bedeutung*. Urban & Schwarzenberg, München.
- Pfannenstiel, P., Börner, W., Droese, M., Emrich, D., Erhardt, F., Hackenberg, K., Heinze, H. G., Herrmann, J., Hesch, R. D., Horn, K., Horster, F. A., Joseph, K., Klein, E., Krüskemper, H. L., von zur Mühlen, A., Oberhausen, E., Reinwein, D., Rudorff, K. H., Schatz, H., Schleusener, H., Scriba, P. C. & Wenzel, K. W. (1979) *Empfehlungen der Sektion Schilddrüse der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Der Nuklearmediziner* 2, 52–64.
- Yamanaka, T., Ido, K., Kimura, K. & Saito, T. (1980), *Clin. Chim. Acta* 101, 45–55.
- Chopra, J. J., Chopra, U., Smith, S. R., Reza, M. & Solomon, D. H. (1975), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41, 1043–1049.
- Hopkins, J. A. C., Edwards, L., Herner, A. E. & van Dreal, P. (1977), *Clin. Chem.* 23, 403–446.
- Broughton, A. (1978), *Clin. Chem.* 24, 1221–1280.
- Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. *Protokolle der Ringversuche*.
- Wood, W. G., Bauer, M., Horn, K., Marschner, I., van Thiel, D., Wachter, C. & Scriba, P. C. (1980), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 511–519.
- Borner, K., Colombo, J. P., Bachmann, C., Haeckel, R., Oellerich, M., Westernick, D., Fischer, M., Wimmer, P., Vogt, W., Tausch, A., Knedel, M., Minder, W., Blim, J. & Portenhauser, R. (1979), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 471–481.
- Schatz, H., Teuber, J., Helmke, K., Grebe, S. & Federlin, K. (1980), *Lab. Med.* 4, 47–55.
- Sandel, P. & Vogt, W. (1977), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15, 183.
- Porth, A., & Oellerich, M., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* in prep.

Dr. S. L. Braun  
Institut für Klinische Chemie  
Klinikum Großhadern  
Marchioninstr. 15  
D-8000 München 70